



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 068**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01)

C07D 417/12 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/5355 (2006.01)

A61K 31/541 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06748900 .5**

96 Fecha de presentación : **29.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1869020**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Derivados de heteroaril urea útiles para inhibir Chk1.**

30 Prioridad: **29.03.2005 US 666026 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.04.2011

73 Titular/es: **ICOS CORPORATION**
22021 20th Avenue S.E
Bothell, Washington District of Columbia 98201,
US

72 Inventor/es: **Diaz, Frank;**
Farouz, Francine, S.;
Holcomb, Ryan;
Kesicki, Edward, A.;
Ooi, Hua, Chee;
Rudolph, Alexander;
Stappenbeck, Frank;
Thorsett, Eugene;
Gaudino, John, Joseph;
Fisher, Kimba, L. y
Cook, Adam, Wade

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 068 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

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos útiles para inhibir enzimas que mantienen y reparan la integridad del material genético. Más particularmente, la presente invención se refiere a 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea y sus sales farmacéuticamente aceptables, y a su uso como agentes terapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades caracterizadas por defectos en la replicación de ácido desoxirribonucleico (ADN), segregación cromosómica y división celular.

Antecedentes de la invención

10 Una gran variedad de enfermedades, afecciones y trastornos (en adelante, en la presente memoria, "indicaciones") están caracterizadas porque implican células con proliferación aberrante. Tal como se usa en la presente memoria, "células con proliferación aberrante" (o "proliferación celular aberrante") significa una proliferación celular que se desvía del curso normal, apropiado o esperado. Por ejemplo, la proliferación celular aberrante incluye la proliferación inapropiada de células, en las que el ADN u otros componentes celulares han sido dañados o son defectuosos. La
15 proliferación celular aberrante se caracteriza también por indicaciones clínicas causadas por, mediadas por, o resultantes de unos niveles inapropiadamente altos de división celular, unos niveles inapropiadamente bajos de muerte celular (por ejemplo, apoptosis), o ambos. Dichas indicaciones pueden estar caracterizadas, por ejemplo, por proliferaciones locales anormales, únicas o múltiples, de células, grupos de células o tejido o tejidos, e incluyen indicaciones cancerosas (benignas o malignas) e indicaciones no cancerosas.

20 Por definición, todos los cánceres (benignos o malignos) implican alguna forma de proliferación celular aberrante. Algunas indicaciones no cancerosas implican también proliferación celular aberrante. Los ejemplos de indicaciones no cancerosas que implican proliferación celular aberrante incluyen artritis reumatoide, psoriasis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y lupus sistémico.

25 Un enfoque para el tratamiento de indicaciones que implican células con proliferación aberrante implica el uso de agentes perjudiciales para el ADN. Estos agentes se diseñan para eliminar las células con proliferación aberrante, mediante la interrupción de procesos celulares vitales, tales como metabolismo de ADN, síntesis de ADN, transcripción de ADN y formación de huso microtubular. Pueden funcionar también, por ejemplo, introduciendo lesiones en el ADN que perturban la integridad estructural cromosómica. Los agentes perjudiciales para el ADN se diseñan y se administran en maneras que intentan inducir el máximo daño y la consecuente muerte celular en las células con proliferación
30 aberrante, con un mínimo daño para las células normal, sanas.

Una gran variedad de agentes perjudiciales para el ADN han sido desarrollados hasta la fecha, incluyendo sustancias quimioterapéuticas y radiación, y hay otros en desarrollo. Desafortunadamente, la efectividad de los agentes perjudiciales para el ADN en el tratamiento de afecciones que implican proliferación celular aberrante ha sido menor de la deseada, particularmente en el caso del cáncer. La selectividad de dichos agentes para células con proliferación
35 aberrante sobre células sanas (referida algunas veces como índice terapéutico) es, frecuentemente, marginal.

Además, todas las células tienen mecanismos de detección y de reparación que pueden trabajar con objetivos opuestos a los de los agentes perjudiciales para el ADN. Dichos mecanismos de detección, denominados puntos de verificación del ciclo celular, ayudan a mantener el orden de las diversas etapas de replicación celular y a asegurar que cada etapa es ejecutada con alta fidelidad (Hartwell et al., Science, 246:629-634 (1989); Weinert et al., Genes Dev., 8:652 (1994)). Cuando las células detectan daños en el ADN, incluyendo daños inducidos a propósito mediante agentes perjudiciales para el ADN, ciertas rutas de señalamiento activan los puntos de verificación del ciclo celular y el ciclo de replicación celular se detiene temporalmente ("detenciones"). Esta detención deja a las células tiempo para reparar su
40 ADN, frecuentemente a un grado suficiente para permitirles continuar para que sobrevivan y proliferen. En el caso de las células con proliferación aberrante, esta reparación es indeseada, ya que puede minar los esfuerzos para inducir un daño suficiente en el ADN para eliminar dichas células.

Por ejemplo, el agente quimioterapéutico denominado GEMZAR™ (gemcitabina, o 2',2'-difluoro-2'-desoxicidina) daña el ADN incorporándose, él mismo, al ADN durante la síntesis. Si se deja sin reparar, el ADN dañado se vuelve incapaz, generalmente, de mantener la vida. En muchas células diana, sin embargo, los puntos de verificación del ciclo celular detectan el ADN creado de manera inapropiada (o dañado). Los puntos de verificación del ciclo celular activados desencadenan la detención del ciclo celular durante un tiempo suficiente para permitir la reparación del ADN dañado. Esta es una manera en la que las células con proliferación aberrante resisten, en teoría, el efecto de eliminación celular de los agentes perjudiciales para el ADN, tales como sustancias quimioterapéuticas, radiación y otras terapias.

Otros agentes perjudiciales para el ADN hacen que las células tumorales se detengan en la fase S. Se ha observado que las células tumorales resisten a ciertas sustancias quimioterapéuticas simplemente deteniéndose en la fase S, mientras se está administrando el agente quimioterapéutico. Entonces, en cuanto el fármaco es retirado, el
55 daño en el ADN es reparado, cesa la detención de la célula y las células progresan a lo largo del resto del ciclo celular

(Shi et al., *Cancer Res.* 61:1065-1072, 2001). Otras sustancias terapéuticas hacen que el ciclo celular se detenga en otros puntos de verificación, incluyendo G1 y G2. Por lo tanto, se espera que la inhibición de varios puntos de verificación de daños en el ADN ayude a prevenir que las células reparen el daño en el ADN inducido terapéuticamente y para hacer sensibilizar las células diana a los agentes perjudiciales para el ADN. A su vez, se espera que dicha sensibilización incremente el índice terapéutico de estas terapias.

El ciclo celular es igual estructural y funcionalmente, en sus procesos básicos y en el modo de regulación, en todas las especies eucariotas. El ciclo celular mitótico (somático) consiste en cuatro fases: la fase G1 (hueco), la fase S (síntesis), la fase G2 (hueco) y la fase M (mitosis). A las fases G1, S y G2 se les denomina, colectivamente, interfase del ciclo celular. Durante la fase G1, las actividades biosintéticas de la célula progresan a una tasa alta. La fase S empieza cuando empieza la síntesis de ADN, y termina cuando el contenido de ADN del núcleo de la célula ha sido replicado y se han formado dos conjuntos idénticos de cromosomas.

A continuación, la célula entra en la fase G2, que continúa hasta que empieza la mitosis. En la mitosis, los cromosomas se emparejan y separan, se forman dos nuevos núcleos y ocurre la citoquinesis, en la que la célula se divide en dos células hijas, recibiendo cada una un núcleo que contiene uno de los dos conjuntos de cromosomas. La citoquinesis termina la fase M y marca el comienzo de la interfase del siguiente ciclo celular. La secuencia en la que proceden los eventos del ciclo celular está estrictamente regulada, de manera que el comienzo de un evento del ciclo celular depende de la finalización del evento anterior del ciclo celular. Esto permite la fidelidad en la duplicación y la segregación del material genético de una generación de células somáticas a la siguiente.

Se ha informado de que los puntos de verificación del ciclo celular comprenden al menos tres clases distintas de polipéptidos, que actúan secuencialmente en respuesta a las defectos o señales del ciclo celular en los mecanismos cromosómicos (Carr, *Science*, 271:314-315, 1996). La primera clase es una familia de proteínas que detectan o perciben anomalías o daños en el ADN en el ciclo celular. Estos detectores incluyen la proteína Ataxia-telangiectasia mutada (Atm) y la proteína Ataxia-Telangiectasia relacionada con Rad (Atr). La segunda clase de polipéptidos amplifican y transmiten la señal detectada por el detector y se ejemplifican mediante Rad53 (Alen et al. *Genes Dev.* 8:2416-2488, 1994) y Chk1. Una tercera clase de polipéptidos incluyen efectores del ciclo celular, tales como p53, que median una respuesta celular, por ejemplo, detención de mitosis y apoptosis.

Gran parte de la comprensión actual de la función de los puntos de verificación del ciclo celular ha sido derivada del estudio de líneas celulares derivadas de tumores. En muchos casos, las células tumorales han perdido puntos de verificación clave del ciclo celular (Hartwell et al., *Science* 266: 1821-28, 1994). Se ha informado de que una etapa clave en la evolución de las células a un estado neoplásico es la adquisición de mutaciones que inactivan las rutas de los puntos de verificación del ciclo celular, tales como las que implican p53 (Weinberg, *Cell* 81:323-330, 1995; Levine, *Cell* 88:3234-331, 1997). La pérdida de estos puntos de verificación del ciclo celular resulta en la replicación de las células tumorales, a pesar del daño en el ADN.

El tejido no canceroso, que tiene puntos de verificación del ciclo celular intactos, es aislado típicamente de una interrupción temporal de la ruta de un único punto de verificación. Sin embargo, las células tumorales tienen defectos en las rutas que controlan el progreso del ciclo celular, de manera que la perturbación de puntos de verificación adicionales las hace particularmente más sensibles a los agentes perjudiciales para el ADN. Por ejemplo, las células tumorales que contienen P53 mutante son defectuosas tanto en el punto de verificación de daños en el ADN en G1 como en la capacidad de mantener el punto de verificación de daños en el ADN en G2 (Bunz et al., *Science*, 282:1497-501, 1998). Se espera que los inhibidores de puntos de verificación, que tienen como objetivo el comienzo del punto de verificación en G2 o el punto de verificación en la fase S, inutilicen adicionalmente la capacidad de estas células tumorales para reparar el daño en el ADN y, por lo tanto, son candidatos para mejorar el índice terapéutico tanto de la radiación como de la quimioterapia sistémica (Gesner, Abstract at SRI Conferencia: Protein Phosphorylation and Drug Discovery World Summit, Marzo 2003).

En presencia de daño en el ADN o cualquier impedimento para la replicación de ADN, las proteínas de punto de verificación Atm y Atr comienzan una ruta de transducción de señales que lleva a la detención del ciclo celular. Se ha mostrado que Atm juega un papel en el punto de verificación de daño en el ADN en respuesta a radiación ionizante (IR). Atr es estimulado por agentes que causan roturas de ADN de doble hebra, roturas de ADN de una hebra y agentes que bloquean la radiación de ADN.

Chk1 es una proteína quinasa situada aguas debajo de Atm y/o Atr en la ruta de transducción de señales del punto de verificación de daños en el ADN (Sanchez et al., *Science*, 277:1497-1501, 1997; Patente US No. 6.218.109). En células de mamífero, Chk1 es fosforilada en respuesta a agentes que causan daño en el ADN, incluyendo radiación ionizante (IR), luz ultravioleta (UV) e hidroxiduroa (Sanchez et al., *supra*; Lui et al., *Genes Dev.*, 14:1448-1459, 2000). Esta fosforilación, que activa Chk1 en las células de mamífero, depende de Atm (Chen et al., *Oncogene*, 18:249-256, 1999) y Atr (Lui et al., *supra*). Además, se ha mostrado que Chk1 fosforila tanto wee1 (O'Connell et al., *EMBO J.*, 16:545-554, 1997) como Pds1 (Sanchez et al., *Science*, 286:1166-1171, 1999), productos génicos que se conoce que son importantes en el control del ciclo celular.

Estos estudios demuestran que Chk1 de mamífero juega un papel en el punto de verificación de daños en el ADN, dependiente de Atm, que lleva a la detención en la fase S. Recientemente, se ha aclarado un papel de Chk1 en la

fase S de células de mamífero (Feijoo et al., *J. Cell Biol.*, 154:913-923, 2001; Zhao et al., *PNAS U.S.A.*, 99:14795-800, 2002; Xiao et al., *J Biol Chem.*, 278(24): 21767-21773, 2003; Sorensen et al., *Cancer Cell*, 3(3):247-58, 2003) resaltando el papel de Chk1 en la supervisión de la integridad de la síntesis de ADN. Chk1 invoca una detención en la fase S mediante la fosforilación de Cdc25A, que regula la actividad ciclina A/cdk2 (Xiao et al., *supra* and Sorensen et al., *supra*). Chk1 invoca también una detención en G2 mediante la fosforilación e inactivación de Cdc25C, la fosfatasa de especificidad dual que desfosforila normalmente la ciclina-B/cdc2 (también conocida como Cdk1) conforme las células progresan de G2 a la mitosis (Fernery et al., *Science*, 277:1495-7, 1997; Sanchez et al., *supra*; Matsuoka et al., *Science*, 282:1893-1897, 1998; y Blasina et al., *Curr. Biol.*, 9:1-10, 1999). En ambos casos, la regulación de la actividad Cdk induce una detención del ciclo celular para prevenir que las células entren en la mitosis en presencia de daño en el ADN o de ADN no replicado.

Clases adicionales de inhibidores de puntos de verificación del ciclo celular operan en la fase G1 o la fase G2/M. UCN-01, o 7-hidroxiestaurosporina, fue aislada originalmente como un inhibidor no específico de quinasa, que tiene su efecto principal sobre la proteína quinasa C, pero recientemente se ha encontrado que inhibe la actividad de Chk1 y abroga el punto de verificación del ciclo celular en G2 (Shi et al., *supra*). De esta manera, debido a que UCN-01 es un inhibidor no selectivo de Chk1, es tóxico para células a dosis altas. A dosis bajas, inhibe, de manera no específica, muchas proteínas quinasas e inhibe también el punto de verificación en G1 (et al., *Curr. Med Chem. AntiCancer Agents*, 3:35-46, 2003).

UCN-01 ha sido usada en conjunción con terapias anti-cáncer, tales como radiación, el agente anti-cáncer camptotecina (Tenzer et al., *supra*) y gemcitabina (Shi et al., *supra*), con éxito limitado. Además, UCN-01 ha sido usada para potenciar los efectos de la reparación de desemparejamientos (MMR) de ADN inducida por temozolomida (TMZ) en células de glioblastoma (Hirose et al., *Cancer Res.*, 61:5843-5849, 2001). En la clínica, UCN-01 no es un agente quimioterapéutico tan efectivo como se esperaba, posiblemente debido a un fallo en la planificación de los tratamientos y una carencia de identificación de dianas moleculares clave particulares (Grant et al., *Drug Resistance Updates*, 6:15-26, 2003). De esta manera, Mack et al. Informan de una potenciación, dependiente del ciclo celular, de cisplatina por UCN-01 en una línea celular cultivada de carcinoma pulmonar de células no pequeñas, pero no identifican con especificidad el punto o los puntos de verificación clave del ciclo celular objetivo de UCN-01 (Mack et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 51(4):337-348, 2003).

Existen varias estrategias diferentes para sensibilizar las células tumorales al tratamiento con agentes quimioterapéuticos que afectan al ciclo celular. Por ejemplo, la administración de 2-aminopurina abroga múltiples mecanismos de punto de verificación del ciclo celular, tales como detención en G1 inducida por mimosina o detención en fase S inducida por hidroxurea, permitiendo que la célula progrese a y a través de la mitosis (Andreassen et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 86:2272-2276, 1992). La cafeína, una metilxantina, ha sido usada también para mejorar la citotoxicidad de agentes perjudiciales para el ADN, tales como cisplatina y radiación ionizante, mediante la mediación en la progresión a través del punto de verificación en G2 e induciendo, de esta manera, la muerte celular (Bracey et al., *Clin. Cancer Res.*, 3:1371-1381, 1997). Sin embargo, la dosis de cafeína usada para conseguir la abrogación del ciclo celular excede los niveles clínicamente aceptables y no es una opción terapéutica viable. Además, se han usado nucleótidos antisentido con respecto a la quinasa Chk1 para incrementar la sensibilidad al inhibidor de topoisomerasa BNP1350 (Yin et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295:435-44, 2002), pero muestran problemas asociados, típicamente, con el tratamiento antisentido y la terapia génica.

Se han divulgado inhibidores de Chk1, incluyendo compuestos aril y heteroaril- urea sustituidos, descritos en la solicitud de patente US No. 10/087.715 y las solicitudes provisionales de patente US Nos. 60/583.080, 60/585.292 y 60/602.968; los compuestos diaril urea descritos en la publicación de patente US No. 2004/0014765, la publicación de patente US No. US2003/199511, la publicación de patente US No. 2004/0014765 y WO 03/101444; metilxantinas y compuestos relacionados descritos en Fan et al., *Cancer Res.* 55:1649-54. 1995; ureidotifenos descritos en WO 03/029241 y WO 03/028731; N-pirrolopiridinil carboxamidas, descritas en WO 03/028724; oligonucleótidos Chk1 antisentido descritos en WO 01/57206 y la patente US No. 6.211.164; antagonistas de receptor de Chk1, descritos en WO 00/16781; derivados heteroaromáticos de carboxamida, descritos en WO 03/037886; aminotiofenos descritos en WO 03/029242; (indazolil)benzimidazoles descritos en WO 03/004488; benzimidazol quinolonas, descritas en la publicación de patente US No. 20040092535 y WO 04/018419; hidroxiimino-fluorenos-heterocíclicos descritos en WO 02/16326; derivados de escitoneman, tales como escitonemina, descritos en la patente US No. 6.495.586; heteroarilbenzamidas descritas en WO 01/53274; indazoles descritos en WO 01/53268; indolacarbazoles descritos en Tenzer et al., *supra*; derivados de cromano descritos en WO 02/070515; paulonas descritas en Schultz et al., *J. Med. Chem.*, Vol:2909-2919, 1999; indenopirazoles descritos en WO 99/17769; flavonas descritas en Sedlacek et al., *Int J. Oncol.*, 9:1143-1168, 1996; derivados peptídicos de bucle peptídico de serina treonina quinasas descritos en WO 98/53050, oxindoles descritos en WO 03/051838; diazepinoindolones descritos en WO 2004/063198; pirimidinas descritas en WO 2004/048343; compuestos de urea descritos en WO 2004/014876; y pirrolocarbazoles, benzofuroisindoles y azaciclopentafluorenos descritos en WO 2003/091255.

Sin embargo, persiste una necesidad en la técnica de inhibidores efectivos y selectivos de Chk1. La presente invención aborda esta y otras necesidades.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores potentes y selectivos de los puntos de verificación de quinasa Chk1 que exhiben propiedades inesperadas en ensayos bioquímicos y/o basados en células. Los presentes inhibidores de Chk1 son útiles en el tratamiento de indicaciones que implican proliferación celular aberrante, y como agentes quimiosensibilizadores y radiosensibilizadores en el tratamiento de indicaciones relacionadas con daño en ADN o lesiones en la replicación de ADN.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un compuesto que es 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea y sus sales farmacéuticamente aceptables. Entre otras cosas, estos compuestos son útiles en un procedimiento de inhibición de Chk1 que comprende una etapa de administrar una cantidad efectiva de 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma a un individuo que lo necesita.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el uso de las composiciones en un tratamiento terapéutico de una indicación, en el que la inhibición de Chk1, *in vivo* o *ex vivo*, proporciona un beneficio terapéutico o es de interés diagnóstico o de investigación.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de sensibilización de células en un sujeto que es sometido a un tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico para una indicación, que comprende la administración de 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con un agente quimioterapéutico, un agente radioterapéutico, o ambos, al individuo. Una indicación no limitativa tratada mediante este procedimiento es un cáncer.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de inhibición o de prevención de una proliferación celular aberrante. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una población celular que comprende células con proliferación aberrante con al menos un activador de Chk1, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para sincronizar sustancialmente una detención del ciclo celular entre las células con proliferación aberrante. Tras conseguir una sincronización sustancial de la detención del ciclo celular en la población celular, la población celular se pone en contacto con al menos un inhibidor de Chk1 de la invención, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para abrogar sustancialmente la detención de ciclo celular.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano que comprende:

- (a) una composición farmacéutica que comprende 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
- (b) un material impreso dentro del paquete que indica que la composición es útil en el tratamiento de indicaciones que implican proliferación celular aberrante; y
- (c) un contenedor.

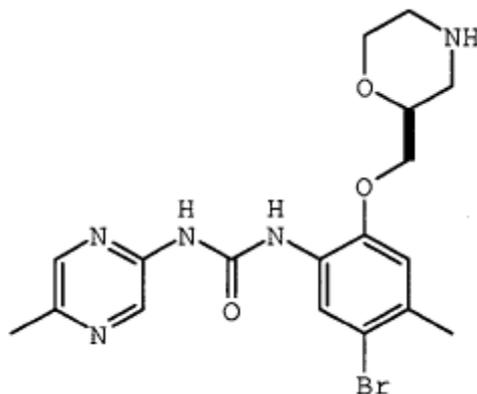
Otro aspecto de la presente invención es proporcionar:

- (a) una composición farmacéutica que comprende 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
- (b) un material impreso dentro del paquete que indica que la composición es útil como quimiosensibilizador o radiosensibilizador en un tratamiento de una indicación relacionada con lesiones en el ADN o replicación de ADN;
- (c) un contenedor.

Estos aspectos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

Descripción detallada

El compuesto de la presente invención, 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metilpirazin-2-il)-urea, tiene la fórmula estructural siguiente:



5

10 Los agentes perjudiciales para el ADN que activan los puntos de verificación del ciclo celular se denominan, en general, en la presente memoria, “activadores de punto de verificación”. Los agentes perjudiciales para el ADN, que activan el punto de verificación denominado “Chk1” (pronunciado “check-one”), se denominan, en la presente memoria, “activadores de Chk1”. Igualmente, los inhibidores de dichos puntos de verificación se denominan, en la presente memoria, “inhibidores de punto de verificación” e “inhibidores de Chk1”, respectivamente.

15 Tal como se usan en la presente memoria, los inhibidores de Chk1 son compuestos que son capaces de abrogar, al menos parcialmente, al menos una actividad de punto de verificación del ciclo celular de la proteína Chk1. La abrogación de un punto de verificación del ciclo celular se consigue cuando el mecanismo de punto de verificación del ciclo celular es superado suficientemente para dejar que la célula pase de la fase del ciclo celular en la que está detenida a la siguiente fase en el ciclo celular o para permitir que la célula pase directamente a muerte celular. La abrogación de un punto de verificación del ciclo celular permite que las células pasen material genético dañado o imperfecto a las subsiguientes fases del ciclo celular, induciendo o promoviendo, de esta manera, la muerte celular. La muerte celular puede ocurrir mediante cualquier mecanismo, incluyendo apoptosis y catástrofe mitótica. Los compuestos de la invención son inhibidores de Chk1.

25 El activador de Chk1 incluye cualquier agente conocido o descubierto con posterioridad que tenga la capacidad de activar la actividad quinasa Chk1, y, de esta manera, inducir una detención, al menos parcial, del ciclo celular. Los activadores de Chk1 incluyen agentes capaces de detener el ciclo celular en cualquier fase del ciclo celular, cuya fase puede denominarse en la presente memoria como la “fase diana” para ese activador. Las fases diana incluyen cualquiera de las fases del ciclo celular excepto la mitosis, es decir, cualquiera de entre las fases G1, S y G2. Los activadores de Chk1 útiles en la invención incluyen agentes perjudiciales para el ADN, tales como agentes quimioterapéuticos y/o radiación. Los activadores de Chk1 por radiación incluyen, pero no se limitan a, radiación ionizante. La radiación ionizante incluye radiación electromagnética o de partículas capaz de producir pares de iones al interactuar con la materia. La radiación ionizante incluye rayos X y gamma, partículas alfa y beta, neutrones y núcleos cargados. La radiación incluye luz ultravioleta, luz visible, radiación infrarroja, radiación de microondas y sus mezclas. Ensayos tales como el descrito en el Ejemplo 8 pueden ser usados para determinar si un agente es o no un activador de Chk1.

35 “Inhibir la proliferación celular aberrante” significa retardar la tasa a la que proliferan las células con proliferación aberrante o eliminar completamente dicha proliferación. Esta inhibición puede ser el resultado de una menor tasa de replicación, una mayor tasa de muerte celular o ambas. La muerte celular ocurre mediante cualquier mecanismo, incluyendo apoptosis y catástrofe mitótica.

40 “Prevenir la proliferación celular aberrante” significa inhibir la proliferación celular aberrante antes de que ocurra, o inhibir su recurrencia.

“*In vivo*” significa dentro de un sujeto vivo, tal como dentro de un animal o de un ser humano. En este contexto, los agentes pueden ser usados terapéuticamente *in vivo* para retardar o eliminar la proliferación de células con replicación aberrante. Los agentes pueden ser usados también *in vivo* como profiláctico para prevenir la proliferación celular aberrante o la manifestación de síntomas asociados a la misma.

45 “*Ex vivo*” significa fuera de un sujeto vivo. Los ejemplos de poblaciones celulares *ex vivo* incluyen cultivos celulares y muestras biológicas, tales como muestras de fluidos y tejidos de seres humanos o animales. Dichas muestras pueden obtenerse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las muestras ejemplares de fluidos biológicos incluyen sangre, fluido cerebrospinal, orina, saliva. Las muestras tisulares ejemplares incluyen tumores y biopsias. En este contexto, los presentes compuestos pueden estar en numerosas aplicaciones, tanto terapéuticas como experimentales.

50 “Radiosensibilizador”, tal como se usa en la presente memoria, significa un compuesto, administrado a un ser humano u otro animal, en una cantidad terapéuticamente efectiva para incrementar la sensibilidad de las células a radiación electromagnética y/o para promover el tratamiento de enfermedades tratables con radiación electromagnética.

“Radiación”, tal como se usa en la presente memoria, incluye, pero sin limitarse a, radiación que tiene longitudes de onda comprendidas en el intervalo de 10^{-20} a 100 metros.

El término “contenedor” significa cualquier receptáculo y cierre para el mismo adecuado para almacenar, enviar, dispensar y/o manipular un producto farmacéutico.

5 El expresión “material impreso dentro del paquete” significa información que acompaña al producto y que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y eficacia requeridos para permitir al médico, farmacéutico y paciente tomar una decisión informada en relación al uso del producto. El material impreso dentro del paquete se considera, generalmente, como la “etiqueta” para un producto farmacéutico.

10 El compuesto de la invención puede obtenerse mediante resolución del producto final o mediante síntesis estereoespecífica a partir de un material de inicio isoméricamente puro o el uso de un reactivo quirál auxiliar, por ejemplo, véase Z. Ma et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(6), 883-888 (1997). La resolución del producto final, un intermedio, o un material de inicio puede conseguirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Tal como se demuestra más adelante, los estereoisómeros específicos pueden exhibir una capacidad excepcional para inhibir Chk1 en combinación con los tratamientos quimioterapéuticos o radioterapéuticos.

15 La 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea puede existir como sales. Las sales de 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea farmacéuticamente aceptables son preferentes, generalmente, en los procedimientos de la invención. Tal como se usa en la presente memoria, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales o formas zwitteriónicas del compuesto. Las sales pueden ser preparadas durante el aislamiento o la purificación final del compuesto o separadamente, haciendo reaccionar el compuesto con un ácido que tiene un catión adecuado. Los cationes farmacéuticamente aceptables y adecuados incluyen cationes de metales alcalinos (por ejemplo, sodio o potasio) y de metales alcalino térreos (por ejemplo, calcio o magnesio). Además, las sales de 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea farmacéuticamente aceptables son sales de adición ácida formadas con ácidos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos que pueden ser empleados para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos, tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos, tales como oxálico, maleico, succínico, malónico y cítrico. Los ejemplos no limitativos de sales de compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, sales clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato, sulfato, bisulfato, 2-hidroxietanosulfonato, fosfato, fosfato de hidrógeno, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, digluconato, glicerolfosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formato, succinato, malonato, fumarato, maleato, metanosulfonato, metilensulfonato, naftelensulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tricloroacetato, trifluoroacetato, glutamato, bicarbonato, paratoluensulfonato, undecanoato, lactato, citrato, tartrato, gluconato, benceno sulfonato y p-toluensulfonato. Además, los grupos amino disponibles presentes en el compuesto de la invención pueden ser cuaternizados con cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y esterilo; y bromuros de bencilo y fenetilo. A la luz de lo expuesto anteriormente, cualquier referencia a los compuestos de la presente invención, que aparezca en la presente memoria, pretende incluir 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados terapéuticamente como agente químico neto, pero es preferente administrar los compuestos como una composición o formulación farmacéutica. De esta manera, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. También se proporciona un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

45 Consiguientemente, la presente invención proporciona adicionalmente formulaciones farmacéuticas que comprenden 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Los portadores son “aceptables” en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el recipiente del mismo.

50 Los compuestos de la invención exhiben inesperadamente una alta potencia. La potencia se expresa, típicamente, como la concentración de un compuesto requerida para conseguir un determinado resultado. Cuando mayor es la potencia, menor es el compuesto requerido para realizar su función pretendida. La potencia in vitro se expresa, típicamente, en términos de valores IC_{50} y se mide usando un ensayo de respuesta a dosis. Los valores IC_{50} pueden medirse poniendo en contacto un sistema de ensayo sensible con un compuesto de interés sobre un intervalo de concentraciones, incluyendo concentraciones a las que no se observa ningún efecto o se observa un efecto mínimo. Teóricamente, dichos ensayos de efecto con respuesta a dosis de los compuestos inhibidores pueden describirse como una curva sigmoideal que expresa un grado de inhibición como una función de la concentración cuando se representa en una escala logarítmica. También teóricamente, la curva pasa a través de un punto en el que la concentración es

suficiente para reducir la actividad de la enzima de punto de verificación a un nivel que es el 50% de la diferencia entre la actividad enzimática mínima y máxima observada en el ensayo. Esta concentración se define como la Concentración inhibidora a una inhibición del 50% o valor IC_{50} .

5 Los valores IC_{50} pueden ser determinados usando técnicas de ensayo bioquímico (acelulares) convencionales o técnicas de ensayo basadas en células, bien conocidas por las personas con conocimientos ordinarios en la materia. Un ejemplo de dicho ensayo se proporciona en el Ejemplo 1, más adelante.

10 Preferentemente, los valores IC_{50} se obtienen realizando el ensayo relevante al menos dos veces, con el valor IC_{50} expresado como la media (media aritmética o “promedio”) de los valores individuales obtenidos. Más preferentemente, el ensayo es repetido de 3 a 10 (o más) veces, con el valor IC_{50} expresado como la media de los valores obtenidos. Más preferentemente, el ensayo es realizado un número de veces suficiente para generar un valor IC_{50} medio estadísticamente fiable, usando procedimientos estadísticamente conocidos por las personas con conocimientos en la materia.

Los compuestos de la invención exhiben inesperadamente valores IC_{50} bajos, que corresponden a una potencia in vitro inesperadamente alta.

15 Los compuestos de la invención exhiben selectividad para inhibir Chk1 sobre otras proteínas quinasas. La selectividad puede ser ventajosa reduciendo los efectos secundarios adversos y/o incrementando el índice terapéutico.

20 La “selectividad” se expresa, en la presente memoria, como “factor de selectividad”. En general, el factor de selectividad, tal como se usa en la presente memoria, es el IC_{50} de un compuesto de ensayo para una enzima de comparación dividido por el valor IC_{50} de una enzima comparadora. En particular, el factor de selectividad para un inhibidor de Chk1, tal como se usa en la presente memoria, es el IC_{50} de un inhibidor de Chk1 (un compuesto de ensayo) para Chk1 (la enzima de comparación) dividido por el valor IC_{50} para una enzima comparadora. Las enzimas comparadoras contra las que pueden medirse los compuestos de la invención incluyen, al menos, las siguientes proteínas quinasas: Cdc2, Chk2, CTAK, EphA1, EphA2, Erk1, FGFR1, FGFR4, IR, JNK1, c-Kit, p38alfa, p38beta, p38delta, Ros, Rse, Rsk2, TrkA, TrkB, proteínas quinasas A, proteínas quinasas C, pp60v-src, proteína quinasa B/Akt-1, p38MapK, p70S6K, quinasa II dependiente de calcio calmodulina y tirosina quinasa ab1.

25 Los ensayos para determinar los valores IC_{50} para un compuesto de ensayo contra una enzima comparadora se describen en el Ejemplo 2 y son bien conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia.

30 Los compuestos de la invención exhiben inesperadamente alta potencia en un ensayo basado en células. Para medir la potencia basada en células de un inhibidor de Chk1, se desarrolló un ensayo que permite medir la concentración de inhibidor de Chk1 requerida para incrementar los efectos inhibidores de crecimiento de un agente perjudicial para el ADN en un modelo basado en células, que implica células con proliferación aberrante. Esta medición de potencia basada en células se expresa, en la presente memoria, como un valor “ EC_{TFS} ”, donde “ EC_{TFS} ” es la Concentración Efectiva de inhibidor de Chk1 que produce un factor de Sensibilización igual a dos de una población de células con proliferación aberrante a los efectos inhibidores de crecimiento de un agente perjudicial para el ADN. El valor EC_{TFS} se calcula para que sea la concentración de inhibidor de Chk1 que reduce a la mitad la cantidad de agente perjudicial para el ADN requerida para una inhibición del 90% del crecimiento celular. Los presentes solicitantes han encontrado que los compuestos de la invención exhiben inesperadamente bajos valores de EC_{TFS} , que corresponden a una potencia basada en células inesperadamente alta.

40 Otro parámetro que puede medirse en el factor de sensibilización conseguido al valor LD_{50} (la dosis del compuesto solo que inhibe el crecimiento del 50% de las células) para el compuesto inhibidor de Chk1. Estos dos valores, EC_{TFS} y el factor de sensibilización al valor LD_{50} , permiten valorar directamente tanto la potencia como la toxicidad de los inhibidores de Chk1, unos con respecto a los otros.

45 Un ejemplo de un ensayo útil para medir los valores EC_{TFS} se describe en el Ejemplo 3, más adelante. Brevemente, este ensayo usa células HT29 de carcinoma de colon humano como la población de células con proliferación aberrante, gemcitabina como el agente perjudicial para el ADN/activador de Chk1, y un compuesto de la invención como el inhibidor de Chk1. La población de células con proliferación aberrante es cultivada y se deja crecer en un medio de crecimiento adecuado. Subsiguientemente, las células son sometidas al agente perjudicial para el ADN sobre un intervalo de concentraciones. Después de una cantidad de tiempo predeterminada, el agente perjudicial para el ADN es retirado, y las células son sometidas a un inhibidor de Chk1 sobre un intervalo de concentraciones y durante un periodo de tiempo predeterminado. A continuación, las placas de células cultivadas son recogidas y se hace un recuento del número relativo de células supervivientes. Los datos son normalizados contra el inhibidor de Chk1 solo como control, y son representados, a continuación, en un gráfico log/log de concentración de agente perjudicial para el ADN vs. supervivencia celular relativa (siendo el 100% igual a 1). El factor de sensibilización se deriva de la diferencia entre la cantidad de agente perjudicial para el ADN requerida para conseguir una inhibición de crecimiento del 90%, con y sin inhibidor de Chk1 para cada concentración de inhibidor de Chk1 usada. A continuación, estos datos son representados en un gráfico de concentración de inhibidor de Chk1 vs. factor de sensibilización, a partir del cual se calcula EC_{TFS} .

55 Preferentemente, los valores EC_{TFS} se obtienen realizando el ensayo al menos dos veces, con el valor EC_{TFS}

expresado como la media de los valores individuales obtenidos. Más preferentemente, el ensayo es repetido de 3 a 10 (o más) veces, con el valor EC_{TFS} expresado como la media de los valores obtenidos. Más preferentemente, el ensayo es realizado un número de veces necesario para generar un valor EC_{TFS} medio estadísticamente fiable, usando procedimientos estadísticos conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia.

5 Los compuestos de la invención que fueron sometidos a un ensayo EC_{TFS} exhibieron valores EC_{TFS} inferiores a 1000 nM. Por el contrario, los compuestos estructuralmente similares conocidos previamente exhibieron valores EC_{TFS} de aproximadamente 11.000 nM.

10 Los compuestos y las composiciones farmacéuticas adecuados para su uso en la presente invención incluyen aquellos en los que el ingrediente activo es administrado en una cantidad efectiva para conseguir su propósito deseado. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para tratar un individuo que padece una indicación, o para aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de las personas con conocimientos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada divulgada y proporcionada en la presente memoria.

15 Además del inhibidor de Chk1 (1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metilpirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma), las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser formuladas para incluir agentes biológicamente activos, tales como citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento, otros factores hematopoyéticos o sus mezclas, para reducir los efectos secundarios adversos que puedan surgir de, o estar asociados con, la administración de la composición farmacéutica individualmente. Como alternativa, dichos agentes biológicamente activos pueden ser incluidos en la composición farmacéutica de la invención para promover un efecto terapéutico deseado. Los agentes adyuvantes biológicamente activos en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, factor de células madre, eritropoyetina, angiopoyetinas, incluyendo Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y y/o el polipéptido similar a angipoyetina humana, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiogenina, proteína morfogenética ósea-1 (BMP-1), BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, receptor de BMP de tipo IA, receptor de BMP de tipo IB, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citoquina receptor de factor neutrófico ciliar, factor 2 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citoquina, factor 2 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citoquina, factor de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, atrayente de neutrófilos derivado de epitelio, factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) 4, FGF 5, FGF 6, FGF 7, FGF 8, FGF 8b, FGF 8c, FGF 9, FGF 10, FGF ácido, FGF básico, receptor 1 de factor neutrófico derivado de línea celular glial, receptor 2 de factor neurotrófico derivado de línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento similar a la insulina I, receptor de factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento similar a la insulina II, proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento del nervio, receptor de factor de crecimiento del nervio, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulador del crecimiento de células pre-B, factor de células madre, receptor de factor de células madre, factor de crecimiento transformador (TGF), TGF, TGF 1, TGF 1.2, TGF 2, TGF 3, TGF 5, TGF 1 latente, proteína de unión a TGF I proteína de unión a TGF II, proteína de unión a TGF III, receptor de tipo I de factor de necrosis tumoral, receptor de tipo II de factor de necrosis tumoral, receptor de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, factor de crecimiento endotelial vascular y proteínas quiméricas o sus fragmentos biológica o inmunológicamente activos.

50 La 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, puede ser conjugada o unida también a fracciones auxiliares que promueven una propiedad beneficiosa (o mitigan una propiedad no deseada) de los compuestos en un procedimiento de uso terapéutico. Dichos conjugados pueden mejorar el suministro de los compuestos a un sitio anatómico particular o a una región de interés (por ejemplo, un tumor), pueden permitir concentraciones terapéuticas mantenidas de los compuestos en las células diana, pueden alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos, y/o pueden mejorar el índice terapéutico o el perfil de seguridad de los compuestos. Las fracciones auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, aminoácidos, oligopéptidos o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos artificiales, y ligandos naturales o sintéticos para receptores en células o tejidos diana. Otros auxiliares adecuados incluyen ácido graso o fracciones lipídicas que promueven la biodistribución y/o la captación del compuesto por las células diana (véase, por ejemplo, Bradley et al., Clin. Cancer Res. 7:3229, 2001).

60 Las formulaciones de la presente invención pueden ser administradas en una manera estándar para el tratamiento de las enfermedades indicadas, tal como oralmente, parenteralmente, tranmucosalmente (por ejemplo,

sublingualmente o vía administración bucal), tópicamente, transdérmicamente, rectalmente, vía inhalación (por ejemplo, nasal o inhalación pulmonar profunda). La administración parenteral incluye, pero no se limita a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular. La administración parenteral puede conseguirse también usando una técnica de alta presión, tal como POWDERJECT™ (Powderject Pharmaceuticals, Plc, Oxford, Inglaterra).

Para la administración oral y la administración bucal, la composición puede estar en forma de comprimidos o pastillas, formulados en una manera convencional. Por ejemplo, comprimidos y cápsulas que contienen excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón o polivinilpirrolidona), cargas (por ejemplo, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio o sorbitol), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol o sílice), desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón y sodio), o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden ser recubiertos según los procedimientos bien conocidos en la materia.

Como alternativa, los compuestos de la presente invención pueden ser incorporados en preparaciones líquidas orales, tales como suspensiones, soluciones, emulsiones acuosas u oleosas, siropes o elixires, por ejemplo. Además, las formulaciones que contienen estos compuestos pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, por ejemplo, agentes suspensores, tales como sirope de sorbitol, metilcelulosa, sirope de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsificantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitan o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

Las preparaciones pueden ser formuladas también como supositorios, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales, tales como manteca de coco u otros glicéridos. Las composiciones para inhalación pueden ser proporcionadas, típicamente, en forma de una solución, suspensión o emulsión que puede ser administrada como un polvo seco o en forma de un aerosol usando un propelente convencional, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano.

Las formulaciones tópicas y transdérmicas comprenden vehículos acuosos o no acuosos convencionales, tales como gotas para los ojos, cremas, ungüentos, lociones y pastas, o están en forma de una escayola, parche o membrana medicada.

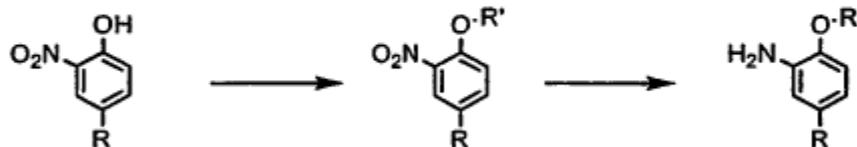
Además, las composiciones de la presente invención pueden ser formuladas para la administración mediante inyección o infusión continuada. Las formulaciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos) antes del uso.

Una composición de la presente invención puede estar formulada también como una preparación "depot". Dichas formulaciones de acción prolongada pueden ser administradas mediante implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Consiguientemente, los compuestos de la invención pueden ser formulados con materiales poliméricos adecuados (por ejemplo polímeros solubles en agua), materiales hidrófobos (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable), resinas de intercambio de iones o derivados moderadamente solubles (por ejemplo, una sal moderadamente soluble).

Para un uso veterinario, 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, es administrada como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y la ruta de administración más apropiada para un animal particular. Los animales que pueden ser tratados con los presentes compuestos y procedimientos incluyen, pero no se limitan a, mascotas, ganado, animales usados en espectáculos y especímenes de zoos.

Procedimientos sintéticos

Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados mediante los esquemas sintéticos siguientes. Primero, las alcoxiarilaminas usadas para preparar los inhibidores de Chk1 descritos en la presente memoria pueden ser preparadas mediante diferentes esquemas sintéticos generales. Por ejemplo, el Esquema General 1 resume la reacción de un nitrofenol con una forma activada de un alcohol, formado in situ o preparado y aislado independientemente, para proporcionar un producto éter de nitrofenilo. La reducción del éter bajo condiciones estándar proporciona una arilamina que es usada para producir un compuesto de la invención.

Esquema General 1

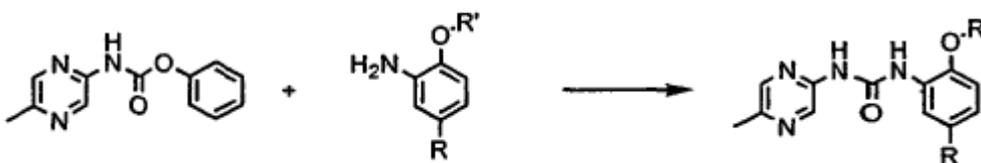
5 Como alternativa, una reacción de un halo nitrobenzeno con un alcohol en presencia de una base fuerte, tal como hidruro de sodio o bis(trimetilsilil)amida de potasio, proporciona también ésteres de nitroarilo, tal como se ilustra en el Esquema General 2. A continuación, estos ésteres son reducidos, tal como se indica en el Esquema General 1.

Esquema General 2

10

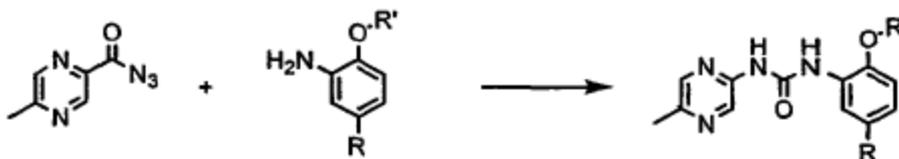
15

La conversión de una arilamina a una urea puede conseguirse mediante uno de entre varios esquemas sintéticos. Por ejemplo, una arilamina puede hacerse reaccionar con un carbamato de piracina para proporcionar una urea, tal como se ilustra en el Esquema General 3.

Esquema General 3

20

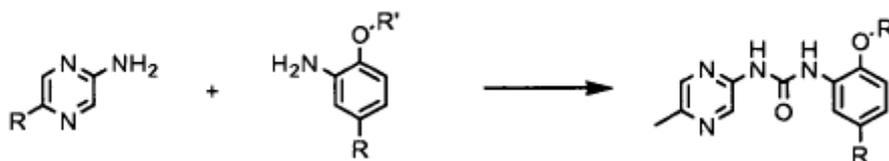
Como alternativa, tal como se indica en el Esquema General 4, una descomposición de una azida de acilo inducida por calor produce un isocianato de arilo reactivo que se deja reaccionar, a continuación, con una arilamina para proporcionar la urea deseada.

Esquema General 4

25

30

Otro enfoque, ilustrado en el Esquema General 5, utiliza fosgeno o un equivalente de fosgeno para acoplar dos arilaminas y proporcionar una urea.

Esquema General 5

35

40

Las abreviaturas usadas en las síntesis descritas en la presente memoria son: h (h), min (min), pascales (Pa), saturado (sat), agua (H₂O), desionizado (DI), alcohol isopropílico (iPrOH), platino sobre carbono (Pt/C), nitrógeno (N₂), hidrógeno (H₂), paladio sobre carbono (Pd/C), óxido de platino (Pt₂O), sulfato de magnesio (MgSO₄), ácido clorhídrico (HCl), azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), cloruro de metileno (CH₂Cl₂), cloroformo (CHCl₃), metanol (MeOH), hidróxido de amonio (NH₄OH), tetrahidrofuran (THF), N-metilpirrolidona (NMP), ácido acético (AcOH), NaOH (NaOH), EtOAc (EtOAc), etanol (EtOH), sulfóxido de dimetilo (DMSO), sulfóxido de dimetilo deuterado (d₆-DMSO), carbonato de sodio (Na₂CO₃), cloroformo deuterado (CDCl₃), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), hidruro de sodio (NaH), TEA (TEA),

carbonato de sodio (CS_5CO_3), dióxido de carbono (CO_2), hidróxido de paladio ($\text{Pd}(\text{OH})_2$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido nítrico (HNO_3), cloruro de sodio (NaCl), sulfato de sodio (Na_2SO_4) y dimetilformamida (DMF).

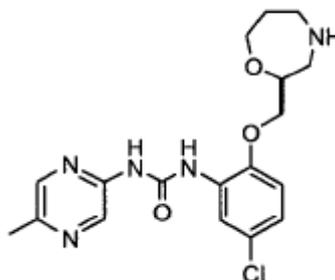
Preparación de los compuestos

Los compuestos siguientes fueron preparados usando los esquemas generales divulgados anteriormente.

5

Compuesto de Referencia 1

10



1-[5-cloro-2-S-([1,4]oxazepan-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea

15

Etapa 1: 2-amino-5-metilpirazina. Se combinaron sal de amino-malononitrilo p-toluenosulfonato (20,0 g, 79 mmol) y piruvaldehído 1-oxima (6,88 g, 79 mmol) en un matraz. Se añadió iPrOH (140 mL) y la suspensión acuosa amarilla resultante se dejó agitando a temperatura ambiente durante 18 h, tiempo durante el cual se acumuló un precipitado amarillo. La mezcla fue filtrada y el precipitado fue lavado con iPrOH (2 x 50 mL) y DI H₂O (20 mL), a continuación, fue liofilizado para proporcionar N-óxido de 2-amino-3-ciano-metilpirazina (10,7 g).

20

El N-óxido de pirazina fue suspendido en MeOH (22 mL) y AcOH (5 mL). A esto, se añadieron cuidadosamente 5% Pt/C (1,6 g) y Darco KB-B (8 g). Se dejó que la mezcla absorbiera H₂ a 413685 Pa (60 psi) durante 18 h. La reacción fue enfriada con 25% NaOH (34 mL) y fue purgada con N₂ durante 30 min. La mezcla fue filtrada a través de un lecho de celite húmedo y fue lavada con MeOH (4 x 100 mL). El filtrado fue concentrado in vacuo a un cuarto del volumen. El filtrado fue diluido con EtOAc (150 mL) y fue lavado con 5% NaOH (30 mL) y fue extraído de nuevo con EtOAc (2 x 70 mL). Las capas orgánicas fueron combinadas y lavadas con NaCl (20 mL), saturado, fueron filtradas y concentradas in vacuo para proporcionar un sólido naranja pegajoso (5,16 g).

25

30

Etapa 2: Fenil éster de ácido (5-metilpirazin) carbámico. Se disolvió 2-amino-5-metilpirazina (5,16 g, 47 mmol) en CH₂Cl₂ (52 mL), se agitó y enfrió a 0°C bajo N₂. A esto, se añadió piridina (4,8 mL, 59 mmol) seguido de clorofornato de fenilo (6,2 mL, 59 mmol), gota a gota, durante 15 min, haciendo que se forme un precipitado. La mezcla fue agitada a 0°C durante 1 h. A continuación, la reacción fue enfriada con 0,25 M HCl (40 mL) y éter anhidro (50 mL), y fue agitada a 0°C durante 30 min. El precipitado fue aislado mediante filtración, fue lavado con DI H₂O (20 mL) y éter (2 x 25 mL), y fue secado bajo vacío para proporcionar el producto (7,4 g) como un polvo suave blanco.

35

Etapa 3: Tert-butil éster de ácido (S)-2-hidroxi-metil-[1,4]oxacepan-4-carboxílico. A un matraz de fondo redondo, de 250 mL, se añadieron glicidil éter de (S)-(+)-bencilo, (1,31 g, 7,9 mmol), 3-bencilamino-propan-1-ol (1,3 g, 7,9 mmol) y 10 mL de EtOH. La mezcla fue calentada a 40°C durante 15 h. La reacción fue enfriada y concentrada in vacuo y el producto oleoso resultante fue usado sin purificación adicional. El diol fue colocado en un matraz de fondo redondo, de 250 mL, y fue disuelto en 75 mL de piridina seca. La solución fue enfriada a 0°C y se añadió cloruro de toluensulfonilo (5,27 g, 27,7 mmol) en una porción. La mezcla fue agitada durante 6 h, manteniendo cuidadosamente la temperatura de reacción a 0°C. La reacción fría fue enfriada con 50 mL de una solución acuosa saturada de NaHCO₃. Se añadieron 20 mL adicionales de agua y la mezcla fue extraída tres veces con porciones de 100 mL de EtOAc. Los orgánicos combinados fueron secados sobre Na₂SO₄ y fueron concentrados in vacuo. A continuación, el alcohol fue purificado mediante cromatografía de columna usando un gradiente de 25-50% de EtOAc y hexanos como eluyente. Esto proporcionó 1,39 g de alcohol de tosilo como un aceite amarillo.

40

45

El alcohol fue disuelto en 50 mL de DMF y fue enfriado a 0°C. A la mezcla agitada, fría, se añadió cuidadosamente NaOH al 95% en peso (0,29 g, 11,5 mmol). La reacción fue agitada a 0°C durante 15 min, a continuación, se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 6 h. La reacción fue enfriada cuidadosamente con 50 mL de agua y fue extraída tres veces con porciones de 50 mL de EtOAc. Los orgánicos combinados fueron secados sobre Na₂SO₄ y fueron concentrados bajo vacío. El producto crudo fue recogido en EtOH y fue colocado en un aparato de hidrogenación Parr. También se añadió a la solución Pd/C al 10% en peso (0,426 g, 0,30 mmol) y 2M HCl (2,1 mL). La hidrogenación se realizó a 344737 Pa (50 psi) durante 2 días, momento en el que se consideró, mediante análisis LCMS, que la reacción había finalizado. La solución fue neutralizada con una solución

50

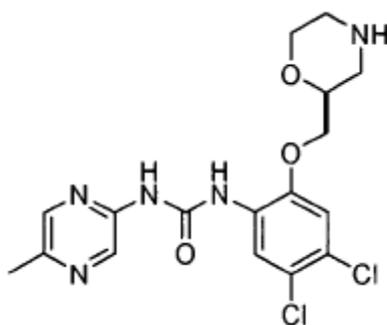
NaHCO₃ acuosa saturada y fue extraída usando una mezcla 3:1 de CHCl₃:iPrOH. Los orgánicos combinados fueron concentrados bajo vacío y el producto crudo fue pasado a la siguiente etapa.

El alcohol amino crudo fue disuelto en 100 mL de CH₂Cl₂ seco. A esta solución se añadieron TEA (1,59 mL, 11,5 mmol) y dicarbonato de di-tert-butilo (5,74 g, 5,74 mmol). La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 18 h, a continuación, fue enfriada con una solución de NaHCO₃ acuosa saturada y fue extraída tres veces usando porciones de 50 mL de CH₂Cl₂. Los orgánicos combinados fueron secados sobre Na₂SO₄ y fueron concentrados in vacuo. El producto fue purificado mediante cromatografía de columna, usando un gradiente 25-50% de EtOAc/hexanos. Esto proporcionó 0,240 g del alcohol de oxazapan como un aceite amarillo.

Etapa 4: Tert-butil éster de ácido (S)-2-(4-cloro-2-nitro-fenoximetil)-[1,4]oxazepan-4-carboxílico. A un matraz de fondo redondo, de 50 mL, se añadieron alcohol de oxazapan (0,240 g, 1,03 mmol), TEA (0,21 mL, 1,545 mmol) y 10 mL de CH₂Cl₂ seco. La solución fue enfriada a 0°C y se añadió, gota a gota, cloruro de metano sulfonilo (0,10 mL). La mezcla fue agitada durante 1,5 h a 0°C y, a continuación, fue enfriada con agua fría. Las capas fueron separadas y la capa acuosa fue extraída una vez con 20 mL de CH₂Cl₂. Los orgánicos combinados fueron secados sobre Na₂SO₄ y fueron concentrados bajo vacío. A continuación, el mesilato crudo fue disuelto en 5 mL de DMF seco. A esta solución se añadió CS₂CO₃ (0,671 g, 2,06 mmol) y 4-cloro-2-nitrofenol (0,215 g, 1,24 mmol). A continuación, esta solución amarilla brillante fue calentada a 100°C durante la noche. La reacción fue enfriada a temperatura ambiente, fue enfriada con 50 mL de agua y fue extraída tres veces con porciones de 50 mL de EtOAc. El producto fue purificado mediante cromatografía flash usando un gradiente 10-35% de EtOAc/hexanos. Esta secuencia de etapas proporcionó 0.120 g del nitrofenil oxazapan, como un aceite amarillo brillante.

Etapa 5: 1-[5-cloro-2-([1,4]oxazepan-2-(S)-ilmethoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea. En un matraz de fondo redondo, de 25 mL, se colocaron nitrofenil oxazapan (0,120 g, 0,31 mmol) y Pt₂O (0,007 g, 0,03 mmol) en 5 mL de MeOH. Se fijó un globo de helio, el matraz fue evacuado usando un aspirador, y fue rellenado tres veces con H₂, a continuación, se dejó bajo agitación bajo H₂ durante 2 h. La reacción fue filtrada a través de celite, lavando dos veces la almohadilla de celite con porciones de 20 mL de MeOH. La solución fue concentrada in vacuo. La anilina cruda fue disuelta en 5 mL de DMF seco. A esta solución se añadieron TEA (0,005 mL, 0,34 mmol) y fenil éster de ácido (5-metilpirazin-2-il)carbámico (0,07 g, 0,31 mmol). Esta mezcla fue agitada durante 18 h a temperatura ambiente. El solvente fue retirado bajo vacío y el residuo fue redisolto en 10 mL de EtOAc y fue lavado con una solución acuosa saturada de NaHCO₃. Los orgánicos fueron secados sobre Na₂SO₄ y fueron concentrados a presión reducida. El residuo gris/marrón fue cubierto con 3 mL de CH₂Cl₂ y a esto se añadió 1 mL de ácido trifluoroacético concentrado. Tras la adición del ácido, todos los sólidos fueron disueltos. La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 4 h, momento en el que se añadió una solución de NaHCO₃ saturada acuosa hasta que la solución alcanzó un pH de 8. La mezcla fue extraída tres veces con porciones de 10 mL de una mezcla 3:1 de ChCl₃:iPrOH. A continuación, los orgánicos combinados fueron secados sobre Na₂SO₄ y fueron concentrados bajo vacío. Los sólidos blancuzcos fueron triturados en EtOAc y fueron filtrados a través de un filtro con porosidad media y fueron lavados con 50 mL de EtOAc. El sólido blanco fue secado concienzudamente bajo vacío. Esta secuencia proporcionó 0,020 g de la urea deseada, como un polvo blanco fino. ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 10,83 (br s, 1H), 8,39 (dd, 1H), 8,18 (s, 1H) 8,04 (br s, 1H), 6,99 (dd, 1H), 6,82 (d, 1H), 4,25-3,98 (m, 2H), 3,90-3,76 (m, 1H), 3,38 (d, H), 3,13-3,06 (m, 2H), 3,00 (dd, 1H), 2,54 (s, 3H), 2,06-1,89 (m, 3H), LCMS (ES, positivo) m/e 392,3 (M+1).

Compuesto de Referencia 2



1-[4,5-dicloro-2-(S-morfolin-2-ilmethoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea

Etapa 1: Tert-butil éster de ácido (S)-2-hidroximetil-morfolin-4-carboxílico. En un matraz de 500 mL se combinaron glicidil éter de (S)-bencilo (15 g, 91,4 mmol), MeOH (10 mL) y NaOH al 50% en peso (30 mL, 365 mmol). A esta mezcla se añadió 2-aminoetilsulfato (25,8 g, 183 mmol) en porciones. Esta mezcla heterogénea fue calentada a 40°C, momento en el que la solución se convirtió en homogénea. La temperatura se mantuvo a 40°C durante 4 h. La reacción fue enfriada ligeramente y se añadió NaOH sólido adicional (14,6 g, 365 mmol) junto con 50 mL de tolueno. A continuación, la solución bifásica fue calentada a 65°C durante 12 h. La reacción fue enfriada a temperatura ambiente,

las capas fueron separadas y la capa acuosa fue extraída una vez con 75 mL de tolueno. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas tres veces con porciones de 75 mL de 1M HCl. El pH de las capas acuosas combinadas fue ajustado a un pH de 12 con una solución acuosa de NaOH y se extrajo cuatro veces con porciones de 70 mL de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre Na₂SO₄ y fueron concentradas in vacuo para proporcionar 10,084 g de la morfolina deseada, como un aceite opaco.

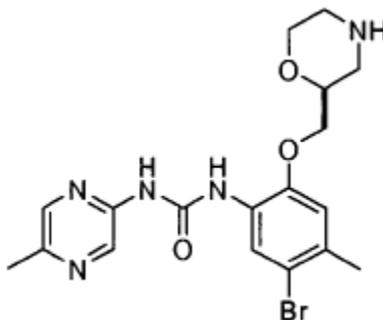
El producto morfolina cruda fue disuelto en CH₂Cl₂ (100 mL) y TEA (12,1 mL, 87,5 mmol) y dicarbonato de di-tert-butilo (15,9 g, 73 mmol) fueron añadidos, acompañados por la generación de gas CO₂. La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 18 h, a continuación, fue enfriada con 35 mL de solución acuosa saturada de NaHCO₃. Se añadieron 50 mL adicionales de agua y las capas fueron separadas. La capa orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidrido, fueron concentradas in vacuo y fueron purificadas mediante cromatografía flash (20% EtOAc/hexano) para proporcionar la N-boc-O-bencil morfolina deseada, como un aceite amarillo pálido (5,536 g).

La morfolina diprotegida purificada fue disuelta en 50 L de EtOH absoluto y se añadió Pd(OH)₂ (1,26 g, 20% en peso, 1,8 mmol). Se fijó un globo de hidrógeno y el matraz fue evacuado usando un aspirador y fue rellenado tres veces con H₂. La reacción fue agitada bajo H₂ durante 30 h. La mezcla fue filtrada sobre celite, aclarando concienzudamente la almohadilla de celite con EtOH. Se redujo, bajo vacío, la concentración de la solución filtrada para proporcionar el alcohol de N-boc-morfolina deseado, como un sólido blanco pálido (3,918 g).

Etapa 2: 4,5-dicloro-2-nitro-fenol. Un matraz de fondo redondo, de 250 mL, fue cargado con 3,4-diclorofenol (3,053 g, 18,7 mmol) en 50 mL de CH₂Cl₂, fue enfriado a 0°C en un baño de hielo. A la solución agitada se añadió H₂SO₄ concentrado (1,56 mL, 28,1 mmol). La solución se tornó turbia. A esta mezcla se añadió HNO₃ concentrado (1,2 mL, 18,7 mmol), gota a gota, y lentamente, para mantener una temperatura inferior de 5°C. La reacción fue agitada durante 30 min a 0°C, a continuación, fue enfriada con un baño de hielo y fue enfriada con 150 mL de H₂O. Las capas fueron separadas y la capa acuosa fue extraída una vez con 35 mL de CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre Na₂SO₄ anhidro, fueron concentradas bajo vacío y fueron purificadas usando cromatografía flash (10% EtOAc/hexanos como eluyente) para proporcionar el nitrofenol deseado, como un sólido amarillo brillante (1,793 g).

Etapa 3: 1-[4,5-dicloro-2-(S-morfolin-2-ilmethoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea. Preparada según el procedimiento para el Compuesto de Referencia 1, Etapas 4 y 5, usando 4,5-dicloro-2-nitro-fenol y tert-butil éster de ácido (S)-2-benciloximetil-morfolin-4-carboxílico. ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 10,42 (s, 1H), 10,29 (s, 1H), 8,93 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 4,18-3,41 (m, 5H), 3,03-2,66 (m, 4H), 2,38 (s, 3H) LRMS (ES, positivo) m/e 412,2 (M+1).

Compuesto 1



1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea

Preparada según el procedimiento para el Compuesto de Referencia 2, usando 4-bromo-5-metil-2-nitro-fenol, preparado usando el procedimiento para el Compuesto de Referencia 2, Etapa 2. ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 10,31 (br s, 1H), 10,19 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 4,13-3,94 (m, 3H), 3,87-3,74 (m, 2H), δ 3,52 (td, 1H), 3,00 (d, 1H), 2,69 (t, 2H), 2,42 (s, 1H), 2,25 (s, 1H), LRMS (ES, positivo) m/e 438,2,0 (M+1).

Procedimientos terapéuticos

Los compuestos de la invención pueden ser usados para tratar afecciones que implican proliferación celular aberrante. Por ejemplo, los compuestos pueden ser usados para potenciar los efectos terapéuticos de la radiación y/o un agente quimioterapéutico usado en el tratamiento de cánceres y otras indicaciones de proliferación celular que implican células eucariotas, incluyendo las del ser humano y otros animales. En general, los presentes compuestos inhiben las células con proliferación aberrante, tanto cancerosas como no cancerosas. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser usados para mejorar el tratamiento de tumores tratados normalmente con un antimetabolito, por ejemplo, metotrexato, gemcitabina o 5-fluorouracilo (5-FU).

El uso de los compuestos de la presente invención puede resultar en un regresión parcial o completa de las

células con proliferación aberrante, es decir, la reducción o eliminación de dichas células de la población de células. Por ejemplo, cuando la población de células con proliferación aberrante son células tumorales, los compuestos de la invención pueden ser usados para retardar la tasa de crecimiento tumoral, reducir el número de tumores y/o inducir una regresión tumoral parcial o completa.

5 Los compuestos de la presente invención pueden ser usados *in vivo* o *ex vivo* cuando no se ha identificado una proliferación celular aberrante o cuando no hay proliferación celular aberrante en curso, pero cuando se sospecha o espera una proliferación celular aberrante. Los compuestos de la presente invención pueden ser usados también cuando una proliferación celular aberrante ha sido tratada previamente, para prevenir o inhibir la recurrencia de la misma.

10 Un procedimiento de la presente invención comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un inhibidor de Chk1 de la presente invención, en combinación con un agente quimioterapéutico, a un individuo que lo necesita. Como alternativa, un procedimiento de la presente invención comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un inhibidor Chk1 de la presente invención a un individuo que lo necesita, en combinación con un anticuerpo, por ejemplo, herceptina, que tiene actividad en la inhibición de la proliferación de células cancerosas.

15 Por lo tanto, los cánceres son susceptibles de mejora de tratamiento mediante la administración de un inhibidor de Chk1 de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o un anticuerpo. Los cánceres tratables mediante la presente invención incluyen carcinomas y sarcomas que están caracterizados por tumores sólidos, y cánceres de los sistemas mieloide y linfoide, incluyendo leucemias, linfomas y otros cánceres que carecen, típicamente, de masa tumoral, pero que están distribuidos en los sistemas vasculares o linforreticulares. Estos cánceres incluyen, por ejemplo, cánceres colorrectales, cánceres de cabeza y cuello, cánceres pancreáticos, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres de vejiga, cánceres vulvares, leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas de células renales, cánceres de ovario, cánceres de cerebro, osteosarcomas y cánceres de pulmón.

20 Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son útiles en cánceres mediados por la actividad Chk1. Más particularmente, la actividad Chk1 está asociada con formas de cáncer que incluyen, pero no se limitan a, oncología adulta y pediátrica, crecimiento de tumores/malignidades sólidos, carcinoma mixoide y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastático, sarcomas de tejido blando humano, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis cancerosa, incluyendo metástasis linfática, carcinoma de células escamosas, particularmente de la cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas esofágicas, carcinoma oral, malignidades de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia antilinfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica y leucemia de célula pilosa, linfomas de efusión (linfomas basados en cavidades corporales), cáncer de pulmón de linfoma tímico (incluyendo carcinoma de células pequeñas, linfoma de células T cutáneas, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, cáncer de la corteza adrenal, tumores productores de ACTH, cánceres de células no pequeñas, cáncer de pecho, incluyendo carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal), cánceres gastrointestinales (incluyendo cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados con neoplasia colorrectal), cáncer pancreático, cáncer de hígado, cánceres urológicos (incluyendo cáncer de vejiga, tal como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células transicionales invasivas de la vejiga y cáncer de vejiga invasivo muscular), cáncer de próstata, malignidades del tracto genital femenino (incluyendo carcinoma de ovario, neoplasmos epiteliales peritoneales primarios, carcinoma cervical, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo del ovario), malignidades del tracto genital masculino (incluyendo cáncer testicular y cáncer de pene), cáncer de riñón (incluyendo carcinoma de célula renal), cáncer de cerebro (incluyendo tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas e invasión de células tumorales metastásicas en el sistema nervioso central), cánceres de hueso (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos de piel humana, y cáncer de célula escamosa), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, efusión peritoneal, efusión pleural maligna, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de vesícula biliar, neoplasmas trofoblásticos, hemangiopericitoma y sarcoma de Kaposi.

25 Un compuesto de la presente invención puede ser usado también para radiosensibilizar células. Las enfermedades tratables con radiación incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos, y células cancerosas. El tratamiento con radiación emplea radiación electromagnética, tal como radiación gamma (de 10^{-20} a 10^{-13} m), radiación de rayos X (10^{-12} a 10^{-9} m), luz ultravioleta (10 nm a 400 nm), luz visible (400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (700 nm a 1,0 mm) y radiación de microondas (1 mm a 30 cm).

30 En la actualidad, algunos protocolos de tratamiento de cáncer emplean radiosensibilizadores activados mediante radiación electromagnética, por ejemplo, rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiaurea, cisplatino y sus análogos y derivados terapéuticamente efectivos.

35 La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como el activador de radiación del agente

sensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: derivados de hematoporfirina, PHOTOFRIN[®], derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño (SnET2), feoborbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de zinc y sus análogos y derivados terapéuticamente efectivos.

5 Los radiosensibilizadores pueden ser administrados en conjunción con una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos además del inhibidor de Chk1, incluyendo dichos compuestos, pero sin limitarse a, compuestos que promueven la incorporación de los radiosensibilizadores a las células diana, compuestos que controlan el flujo de sustancias terapéuticas, nutrientes y/u oxígeno a las células diana, agentes quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional, u otros compuestos terapéuticamente efectivos para tratar cáncer u otra enfermedad. Los ejemplos de procedimientos o agentes terapéuticos adicionales que pueden ser usados en conjunción con los radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, oxígeno, carbógeno, transfusiones de glóbulos rojos, perfluorocarbonos (por ejemplo FLUOSOLW[®]-DA), 2,3-DPG, BW12C, bloqueadores de canales de calcio, pentoxifilina, compuestos antiangiogénesis, hidralazina y L-BSO.

15 Los agentes quimioterapéuticos que pueden ser usados en combinación con un compuesto de la presente invención para tratar un cáncer incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y sus antagonistas, radioisótopos, anticuerpos, así como productos naturales y sus combinaciones. Por ejemplo, un compuesto inhibidor de la presente invención puede ser administrado con antibióticos, tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas nitrogenadas, tales como ciclofosfamida, análogos de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo, cisplatina, hidroxurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de mezclas de tumores, tales como adenocarcinoma de pecho, en los que los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina y células independientes de gonadotropina, el compuesto puede ser administrado en conjunción con leuprolida o goserelina (análogos peptídicos sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto inhibidor con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía o radiación, denominadas también, en la presente memoria, como “modalidades antineoplásicas adjuntas”. Los agentes quimioterapéuticos adicionales útiles en la invención incluyen hormonas y sus antagonistas, radioisótopos, anticuerpos, productos naturales y sus combinaciones. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos útiles en los procedimientos que emplean los compuestos de la presente invención se exponen en la tabla siguiente.

TABLA 1

TABLA 1	
<p>A) <u>Agentes alquilantes</u></p> <p>i) <u>Mostazas nitrogenadas</u></p> <p>mecloretamina</p> <p>ciclofosfamida</p> <p>ifosfamida</p> <p>melfalán</p> <p>cloroambucil</p> <p>ii) <u>Nitrosoureas</u></p> <p>carmustina (BCNU)</p> <p>lomustina (CCNU)</p> <p>semustina (metil-CCNU)</p> <p>iii) <u>etilenimina/metil-melamina</u></p> <p>trietilnelmelamina (TEM)</p> <p>trietileno tiofosforamida (tiotepa)</p> <p>hexametilmelamina (HMM, altretamina)</p> <p>iv) <u>Alquil sulfonatos</u></p> <p>busulfán</p> <p>v) <u>triazinas</u></p>	<p>G) <u>Productos naturales</u></p> <p>i) <u>Fármacos antimetabólicos</u></p> <p>ii) <u>Taxanos</u></p> <p>paclitaxel</p> <p>alcaloides de la vinca</p> <p>vinblastina (VLB)</p> <p>vincristina</p> <p>vinorelbina</p> <p>Taxotere[®] (docetaxel)</p> <p>estramustrina</p> <p>fosfato de estramustina</p> <p>iii) <u>Epipodofilotoxinas</u></p> <p>etopósido</p> <p>tenipósido</p> <p>iv) <u>Antibióticos</u></p> <p>actimomicina D</p> <p>daunomicina (rubidomicina)</p> <p>doxorubicina (adriamicina)</p>

<p>dacarbazina (DTIC)</p>	<p>mitoxantoneidarrubicina bleomicina esplicamicina (mitramicina) mitomicina C dactinomicina afidicolina v) <u>Enzimas</u> L-asparaginasa L-arginasa</p>
<p>B) <u>Antimetabolitos</u></p> <p>i) <u>Análogos de ácido fólico</u></p> <p>metotrexato trimetrexato pemetrexed (antofolato multidiana)</p> <p>ii) <u>Análogos de pirimidina</u></p> <p>5-fluorouracilo fluorodesoxiuridina gemcitabina arabinósido de citosina (AraC, citarabina) 5-azacitidina 2,2'-difluorodesoxi-citidina</p> <p>iii) <u>Análogos de purina</u></p> <p>6-mercaptopurina 6-tioguanina azatioprina 2'-desoxicoformicina (pentostatina) eritrohidroxinonil-adenina (EHNA) fosfato de fludarabina 2-clordesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)</p>	<p>H) <u>Radiosensibilizadores</u></p> <p>metronidazol misonidazol desmetilmisonidazol pimonidazol etanidazol nimorazol RSU 1069 E09 RB 6145 SR4233 nicotinamida 5-bromodesoxiuridina 5-yododesoxiuridina bromodeoxicitidina</p>
<p>C) <u>Inhibidores de topoisomerasa de tipo I</u></p> <p>camptotecina topotecán irinotecán</p>	<p>I) <u>Agentes de diversos tipos</u></p> <p>i) <u>Complejos de coordinación de platino</u></p> <p>cisplatino carboplatino oxaliplatino antracenediona</p>

	<p>mitoxantrona</p> <p>ii) <u>Urea sustituida</u></p> <p>hidroxiurea</p> <p>iii) <u>Derivados de metilhidrazina</u></p> <p>N-metilhidrazina (MIH)</p> <p>procarbazina</p> <p>iv) <u>Supresor adrenocortical</u></p> <p>mitotano (o,p'-DDD)</p> <p>aminoglutetimida</p>
<p>D) <u>Modificadores de la respuesta biológica</u></p> <p>G-CSF</p> <p>GM-CSF</p>	<p>J) <u>Citoquinas</u></p> <p>interferón (α, β, γ)</p> <p>interleuquina-2</p>
<p>E) <u>Agentes de diferenciación</u></p> <p>derivados de ácido retinoico</p>	<p>K) <u>Fotosensibilizadores</u></p> <p>derivados de hematoporfirina</p> <p>Photofrin®</p> <p>derivados de benzoporfirina</p> <p>Npe6</p> <p>etioporfirina de estaño (SnET2)</p> <p>feborida-a</p> <p>bacterioclorofila-a</p> <p>naftalocianinas</p> <p>ftalocianinas</p> <p>ftalocianinas de zinc</p>
<p>F) <u>Hormonas y antagonistas</u></p> <p>i) <u>Adrenocorticosteroides/antagonistas</u></p> <p>prednisona y equivalentes</p> <p>dexametasona</p> <p>ainoglutetimida</p> <p>ii) <u>Progestinas</u></p> <p>caproato de hidroxiprogesterona</p> <p>acetato de medroxiprogesterona</p> <p>acetato de megestrol</p> <p>iii) <u>Estrógenos</u></p> <p>dietilestilbestrol</p> <p>etinil estradiol y equivalentes</p> <p>iv) <u>Antiestrógeno</u></p>	<p>L) <u>Radiación</u></p> <p>rayos X</p> <p>luz ultravioleta</p> <p>radiación gamma</p> <p>luz visible</p> <p>radiación infrarroja</p> <p>radiación de microondas</p>

<p>tamoxifen</p> <p>v) <u>Andrógenos</u></p> <p>propionato de testosterona</p> <p>fluoximesterona y equivalentes</p> <p>vi) <u>Antiandrógenos</u></p> <p>flutamida</p> <p>análogos de hormona de liberación de gonadotropina</p> <p>leuprolida</p> <p>vii) <u>Antiandrógenos no esteroideos</u></p> <p>flutamida</p>	
--	--

5 Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos que son particularmente útiles en conjunción con radiosensibilizadores incluyen, por ejemplo, camptotecina, carboplatina, cisplatina, daunorrubicina, doxorubicina, interferón (alfa, beta, gamma), irinotecán, hidroxiurea, clorambucil, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, 2-cloroadenosina, fludarabina, azacitidina, gemcitabina, pemetrexed, interleuquina 2, irinotecán, docetaxel, paclitaxel, topotecán y sus análogos y derivados terapéuticamente efectivos.

10 Según la presente invención, los compuestos de la presente invención son útiles en combinación con gemcitabina, solo o además con paclitaxel. Los compuestos de la presente invención son útiles también en combinación con pemetrexed, solo o además con cisplatino, carboplatino u otros platinos. Un inhibidor de Chk1 de la presente invención puede ser administrado también en combinación con gemcitabina y pemetrexed.

15 Un inhibidor de Chk1 de la presente invención, administrado en combinación con gemcitabina, puede ser útil en el tratamiento, por ejemplo, de carcinoma pancreático, leiomiomas del útero, sarcoma óseo, cáncer de pulmón metastático de células no pequeñas, sarcoma de tejido blanco de extremidad o tronco, cáncer de células renales, adenocarcinoma y enfermedad de Hodgkin. Un inhibidor Chk1 de la presente invención, administrado con pemetrexed, puede ser útil en el tratamiento de mesotelioma.

20 Los compuestos de la presente invención pueden potenciar también la eficacia de fármacos usados en el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos inflamatorios caracterizados por proliferación celular aberrante. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias que pueden ser tratadas con los compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (RA), psoriasis, vitíligo, granulomatosis de Wegener, artritis crónica sistémica de inicio en la juventud (JCA) y lupus eritematoso sistémico (SLE). El tratamiento de artritis, granulomatosis de Wegener y SLE implica, frecuentemente, el uso de terapias inmunosupresoras, tales como radiación ionizante, metotrexato y ciclofosfamida. Dichos tratamientos inducen, típicamente, bien directa o indirectamente, daño en el ADN. La inhibición de la actividad Chk1 dentro de las células inmunes ofensivas hace que las células sean más sensibles a un control mediante estos tratamientos estándares. La Psoriasis y el vitíligo son tratados comúnmente con radiación ultravioleta (UV) en combinación con psoraleno. Los compuestos de la presente invención mejoran el efecto eliminador de UV y psoraleno, e incrementan el índice terapéutico de este régimen de tratamiento. En general, los compuestos de la presente invención potencian el control de las células de enfermedades inflamatorias, cuando se usan en combinación con fármacos inmunosupresores.

30 El compuesto de la presente invención puede ser usado también en procedimientos de tratamiento de otras afecciones no cancerosas caracterizadas por células con proliferación aberrante. Dichas condiciones incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, restenosis, vaculitis, nefritis, retinopatía, enfermedad renal, trastornos de piel proliferativos, psoriasis, cicatrización queloides, queratosis actínica, Síndrome de Stevens-Johnson, osteoporosis, enfermedades hiperproliferativas del ojo, que incluyen crecimiento epitelial hacia abajo, vitreorretinopatía proliferativa (PVR), retinopatía diabética, enfermedades hemangio-proliferativas, ictiosis y papilomas.

35 Un procedimiento preferente de administración de un inhibidor de Chk1 de la presente invención se describe en Keegan et al., solicitud PCT No. PCT/US2004/30806, presentada el 17 de Septiembre de 2004, que está basada en la solicitud provisional US No de serie 60/503.925, presentada el 17 de Septiembre de 2003, cuya divulgación completa se incorpora, por referencia. Dichos procedimientos para inhibir la proliferación celular aberrante implican planificar la administración planificada de un activador de Chk1 (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) y un inhibidor de Chk1

según la presente invención. En este procedimiento, al menos un activador de Chk1 es administrado en una dosis y durante un tiempo suficientes para inducir una sincronización sustancial de la detención del ciclo celular en las células proliferativas. Tras conseguir una sincronización de fase sustancial, al menos un inhibidor de Chk1 es administrado para abrogar la detención del ciclo celular e inducir la muerte celular terapéutica. El procedimiento es útil con cualquier activador de Chk1, y encuentra aplicación en el tratamiento o en la prevención de condiciones cancerosas y no cancerosas, que implican proliferación celular aberrante.

Una población de células con proliferación aberrante puede ser puesta en contacto con uno o más inhibidores de Chk1 de la invención. Si se usan más de un inhibidor de Chk1, los inhibidores de Chk1 pueden ponerse en contacto con las células usando el mismo procedimiento o diferentes procedimientos (por ejemplo, simultánea o secuencialmente, durante las mismas o diferentes duraciones, o mediante las mismas o diferentes modalidades) según lo determine la persona con conocimientos en la materia, por ejemplo, un médico de atención (en el caso de pacientes humanos) o un experimentalista de laboratorio (en el caso de un procedimiento *in vitro* o *ex vivo*).

Una población de células con proliferación aberrante puede ponerse en contacto también con uno o más activadores de Chk1. Si se usan más de un activador de Chk1, los activadores de Chk1 pueden ponerse en contacto con las células usando los mismos o diferentes procedimientos, generalmente, tal como se ha descrito anteriormente en el contexto de los inhibidores de Chk1.

Los compuestos de la presente invención pueden ser aplicados a poblaciones celulares *ex vivo*. Por ejemplo, los presentes compuestos pueden ser usados *ex vivo* para obtener información relacionada con la planificación y/o dosis óptimas para la administración de un inhibidor de Chk1 para una indicación, tipo de célula, paciente y/u otro parámetro de tratamiento, determinados. Esta información puede ser usada para propósitos experimentales o en una clínica para determinar protocolos para un tratamiento *in vivo*. Otros usos *ex vivo* para los compuestos de la presente invención serán evidentes para las personas con conocimientos en la materia.

Tal como apreciarán las personas con conocimientos en la materia, pueden usarse agentes auxiliares o activos adicionales en los procedimientos descritos en la presente memoria. Tal como apreciarán también las personas con conocimientos en la materia, la referencia, en la presente memoria, a tratamiento, se extiende a profilaxis, así como a tratamiento de enfermedades o síntomas establecidos.

La cantidad de un compuesto de la invención requerida para su uso en un tratamiento varía con la naturaleza de la afección a tratar, y con la edad y la condición del paciente, y se determinada finalmente por el médico de atención o el veterinario. Sin embargo, generalmente, las dosis administradas para un tratamiento de un ser humano adulto están comprendidas en el intervalo de 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg por día. La dosis puede ser administrada en una única dosis, o como múltiples dosis administradas en intervalos apropiados, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más subdosis por día. En la práctica, el médico determina el régimen de dosificación adecuado para un paciente individual, y la dosis varía con la edad, el peso, y la respuesta del paciente particular. Las dosis anteriores son ejemplares para los casos promedio, pero existen casos individuales en los que se necesitan dosis más altas o más bajas, y las mismas están dentro del alcance de la presente invención.

El contacto de la población de células con un inhibidor de Chk1 de la presente invención, a cualquier dosis, es durante un tiempo suficiente para conseguir una abrogación sustancial del punto de verificación del ciclo celular. Típicamente, aunque no necesariamente, dichos tiempos incluyen hasta aproximadamente 72 horas a aproximadamente 96 horas, dependiendo de varios factores. En algunas realizaciones, es deseable o necesario administrar un inhibidor de Chk1 durante un periodo de hasta aproximadamente varias semanas o más, según lo determine el médico o el técnico de atención. De esta manera, un inhibidor de Chk1 de la presente invención puede ser administrado, típicamente, durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas o aproximadamente 72 horas. Las personas con conocimientos en la materia apreciarán que los intervalos de tiempo expresados en la presente memoria son solamente ejemplares y que los intervalos y subintervalos dentro y fuera de los expresados están también dentro del alcance de la invención.

Los inhibidores de Chk1 de la presente invención pueden ser administrados sobre una pluralidad de dosis. Por ejemplo, el inhibidor de Chk1 puede ser suministrado a una frecuencia de: cuatro dosis suministradas a una dosis por día, a intervalos de 4 días (q4d x 4), cuatro dosis suministradas como una dosis por día a intervalos de 3 días (q3d x 4); una dosis suministrada por día a intervalos de cinco días (qd x 5); una dosis por semana durante tres semanas (qw3), cinco dosis diarias, con dos días de descanso, y otras cinco dosis diarias (5/2/5); o cualquier régimen de dosificación considerado apropiado para las circunstancias.

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación de los valores IC₅₀ de los inhibidores de Chk1

El ADNc de Chk1 humana fue identificado y clonado, tal como se ha descrito anteriormente en la publicación de

solicitud internacional No. WO 99/11795, presentada el 4 de Septiembre de 1998. Se insertó una etiqueta FLAG[®] en marco con el extremo amino de Chk1 de longitud completa. El cebador 5' contiene un sitio EcoRI, una secuencia Kozak, y codifica también una etiqueta FLAG[®] para purificación por afinidad usando el anticuerpo M2 (Sigma, St. Louis, MO). El cebador 3' contiene un sitio Sall. El fragmento amplificado mediante PCR fue clonado en pCI-Neo, como un fragmento EcoRI.Sall (Invitrogen, Carlsbad, CA), a continuación, fue subclonado como un fragmento EcoRI-NotI en pFastBacI (Gibco-BRL, Bethesda, MD). Se preparó un baculovirus recombinante, tal como se describe en el manual Gibco-BRL Bac-to-Bac y se usó para infectar células Sf-9 cultivadas en medio CCM3 (HyClone Laboratories, Logan, UT) para la expresión de proteína Chk1 etiquetada con FLAG[®].

La Chk1 etiquetada con FLAG[®] fue purificada a partir de pelets congelados de células SF9 infectadas con vaculovirus. Los pelets de células congeladas fueron mezclados con igual volumen de 2x tampón de lisis que contenía 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 50 mM B-glicerofosfato, 25 mM NaF, 4 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,2% TWEEN[®]-20, 2 mM vanadato de sodio, 2 mM DTT y un cóctel de inhibidores de proteasa (Complete mini, Boehringer Mannheim 2000 catalog #1836170). A continuación, las células fueron homogeneizadas 20 veces con el mortero libre de un homogeneizador de tipo dounce y fueron centrifugadas a 48.400 x g durante 1 hora. La afinidad de M2 fue prelavada con 10 volúmenes de columna de 50 mM de glicina pH 3,5, seguido por 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl alternando tres veces y terminando con un lavado con Tris NaCl. A continuación, la columna fue lavada con 25 volúmenes de columna de 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% TWEEN[®]-20, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA y 1 X comprimidos de proteasas mini completa. A continuación, el lisato aclarado fue unido a resina de afinidad M2 en un lote a 4°C durante 4 h. La mezcla de resina y lisato fue vertida, a continuación, en una columna y se recogió el flujo que la traspasó. La resina fue lavada con 10 volúmenes de columna de 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, y 3 mM N-octil glucósido. A continuación, la Chk1 etiquetada con FLAG[®] fue eluida de la columna con 6 volúmenes de columna de 20 mM Tris frío, pH 7,5, 150 mM NaCl, 3 mM N-octil glucósido que contenía 0,5 mg/ml de péptido FLAG[®] (Sigma, 2000 # de CatálogoF-3290). Tres fracciones fueron recogidas y analizadas para la presencia de Chk1 etiquetada con FLAG.

El ensayo para la actividad quinasa Chk1 que incluye 100 ng de Chk1-FLAG[®] purificada (150 pmol de ATP/min), 20 μm péptido Cdc25C (H-leu-tyr-arg-ser-pro-ser-met-pro-glu-asn-leu-asn-arg-arg-arg-arg-OH) (SEQ ID NO: 1), 4 μm ATP, 2 μCi [³²P]γ-ATP, 20 mM Hepes pH 7.2, 5 mM MgCl₂, 0.1% NP40, y 1 mM DTT. Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición de una mezcla de reacción que contenía ATP y se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 10 min. Las reacciones fueron detenidas mediante la adición de ácido fosfórico (concentración final de 150 mM) y fueron transferidas a discos de fosfocelulosa. Los discos de fosfocelulosa fueron lavados cinco veces con 150 mM ácido fosfórico y fueron secados con aire. Se añadió fluido de centelleo y se realizó un conteo de los discos en un contador Wallac de centelleo. El ensayo fue incubado en presencia de un amplio rango de concentraciones de compuesto inhibidor de Chk1 y se calculó un valor IC₅₀ para el compuesto. Los compuestos de la invención sometidos al ensayo exhibieron unos valores IC₅₀ en el ensayo menores de aproximadamente 200 nM.

Ejemplo 2

Selectividad

Los inhibidores de Chk1 de la presente invención fueron ensayados para la selectividad, con Chk1 como enzima de comparación y las proteína quinasas siguientes como enzimas comparadoras: Cdc2, Chk2, CTAK, EphA1, EphA2, Erk1, FGFR1, FGFR4, IR, JNK1, c-Kit, p38alfa, p38beta, p38delta, Ros, Rse, Rsk2, TrkA, TrkB, proteína quinasa A, proteína quinasa C, pp60v-src, proteína quinasa B/Akt-1, p38MapK, p70S6K, quinasa II dependiente de calcio calmodulina y tirosina quinasa ab1.

El valor IC₅₀ de un compuesto versus Chk1 fue medido tal como se ha descrito anteriormente. El valor IC₅₀ del compuesto contra las enzimas comparadoras fue medido usando la plataforma de tecnología propietaria SelectSmart[™] (MDS Pharma Services, Bothell, Washington, USA) con un procedimiento ELISA modificado o polarización fluorescente. Los inhibidores ensayados mostraron al menos un factor de selectividad de 20 para la Chk1 sobre las enzimas comparadoras ensayadas.

Como alternativa, los ensayos para determinar IC₅₀ para cada una de estas quinasas han sido descritos anteriormente en la literatura, incluyendo la publicación de patente US No. 2002-016521 A1 y PCT/US95/00912, presentada el 23 de Enero de 1995.

Ejemplo 3

Ensayo basado en células para la determinación de los valores EC_{TFS} de los inhibidores de Chk1

La potencia basada en células de los inhibidores de Chk1 según la invención fue valorada midiendo la capacidad del compuesto para sensibilizar una línea de células HT29 de carcinoma humano a la gemcitabina. Un valor medio de EC_{TFS} fue derivado después de múltiples experimentos. De esta manera, un inhibidor de Chk1 según la invención fue sintetizado mediante los procedimientos descritos en la presente memoria. El compuesto fue disuelto en 100% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) a una concentración de almacén de 10 mM y fue almacenado a -70°C. Las células HT29 fueron obtenidas de ATCC y se mantuvieron en medio de crecimiento que consistía en RPMI que contenía 10% de suero bovino fetal (FCS), pen/strep, glutamina y otros suplementos. El hidrocloreuro de gemcitabina fue obtenido en

Qventas y fue disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 50 mM y fue almacenado a -20°C. Se obtuvo ³H-timidina de Perkin-Elmer.

5 Las células HT29 fueron colocadas en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Corning) a una densidad de 1,3x10³ por pocillo y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, la gemcitabina fue diluida 125 veces inicialmente, seguido por diluciones de 5 veces en Titer Tubes™ (BioRad) de 1,2 ml, en medio de crecimiento. Las concentraciones finales de la serie de diluciones eran: 11, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 6,4x10⁻³, 1,28 x10⁻⁴ y 5,12x10⁻⁵ nM. A continuación, la gemcitabina diluida fue añadida a las células durante 2 horas. A continuación, la gemcitabina fue lavada y el inhibidor de Chk1 diluido de la invención fue añadido a las células durante 24 horas. Después de una dilución inicial de 1000 veces en medio de crecimiento, 10 µM de un inhibidor de Chk1 (DMSO almacén) según la invención fueron diluidos en serie 3 veces en Titer Tubes™ de 1,2 ml, proporcionando una serie final de diluciones de: 2,5, 0,83, 0,28, 0,09 y 0,03 µM. Setenta y dos horas más tardes, las células en cada pocillo fueron etiquetadas con 1 µM ³H-timidina durante 12 horas, a continuación se congelaron a -70°C. A continuación, las placas fueron descongeladas y recogidas en placas de filtro de 96 pocillos (Millipore) usando un recogedor de placas Cell Mate™ (Perkin Elmer). A continuación se añadieron 30 µL de Microscint™ 20 (Perkin Elmer) y se realizó un conteo de las placas en un lector de placas Top Count (Perkin Elmer). Los datos fueron normalizados a células tratadas sólo con el inhibidor de Chk1 según la invención; a continuación, se representaron en un gráfico log/log de concentración de gemcitabina (µM) vs. crecimiento celular relativo (siendo el 100% igual a 1,0). El factor de sensibilización incrementado a una inhibición de crecimiento del 90% fue derivado para cada concentración de inhibidor de Chk1 usada, que se representó, a continuación, en un gráfico de concentración de inhibidor de Chk1 vs. factor de sensibilización: A continuación, se calculó el valor EC_{TF5}.

20 Los inhibidores de Chk1 de la presente invención que fueron sometidos al ensayo tenían valores EC_{TF5} medidos menores de 1000 nM.

Ejemplo 4

Los inhibidores de Chk1 de la presente invención mejoran la eliminación de células por los tratamientos anti-cáncer

25 Para demostrar que la inhibición de Chk1 por un compuesto de la presente invención sensibiliza las células diana al efecto eliminador de los agentes perjudiciales para el ADN, las células pueden incubarse en presencia de un inhibidor de Chk1 de la presente invención y expuesto a irradiación o a un agente químico dañino para el ADN. Células colocadas en platos a una densidad de 1000-2000 por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos fueron cultivadas en RMPI 1640, que contenía 10% FBS, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, durante 18 h a 37°C, en un incubador humidificado con 5% CO₂. Las células ensayadas pueden incluir cualquier célula o línea celular de interés, tales como HeLa, ACHN, 786-0, HCT116, HCT15, SW620, HT29, Colo205, SK-MEL-5, SK-MEL-28, A549, H322, OVCAR-3, SKOV-3, MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, HL-60, K562, Bx-PC3, Mia-PaCa2, H810, H226, H2126 y MOLT4. Todas las designaciones de las líneas celulares se refieren a las siguientes líneas celulares humanas:

HeLa	adenocarcinoma cervical
ACHN	adenocarcinoma renal
786-0	adenocarcinoma renal
HCT116	carcinoma de colon
SW620	carcinoma de colon, metástasis nodo linfático
HT-29	adenocarcinoma colonrectal
Colo205	adenocarcinoma de colon
SK-MEL-5	melanoma
SK-MEL-28	melanoma maligno
A549	carcinoma de pulmón
H322	carcinoma broncoalveolar
OVCAR-3	adenocarcinoma de ovario
SK-OV-3	adenocarcinoma de ovario
MDA-MB-231	adenocarcinoma de pecho
MCF-7	adenocarcinoma de pecho

PC-3	adenocarcinoma de próstata, de metástasis a hueso
HL-60	leucemia promielocítica aguda
K562	leucemia mielógena crónica
MOLT4	leucemia linfoblástica aguda; linfoblasto T

5 Las células son tratadas con medio que contiene solo fármacos quimioterapéuticos o fármacos quimioterapéuticos y un inhibidor de Chk1. Las células son incubadas durante aproximadamente 5 días antes de medir el crecimiento, mediante la determinación de los niveles de captación de 3H-timidina. Los fármacos quimioterapéuticos incluyen etopósido, doxorubicina, cisplatino, clorambucil, 5-fluorouracilo (5-FU). La concentración de fármaco necesaria para inhibir el crecimiento celular al 90% de células de control no tratadas se define como el valor GI₉₀.

10 Los compuestos de la presente invención pueden ser ensayados con antimetabolitos adicionales, incluyendo metotrexato, hidroxiourea, 2-cloroadenosina, fludarabina, azacitidina y gemcitabina para valorar en los mismos la capacidad de mejorar la capacidad eliminadora de los agentes. Los compuestos de la presente invención pueden ser comparados, unos con los otros, valorando la capacidad eliminadora mejorada de HT29 de carcinoma colorectal en combinación con gemcitabina.

Además, puede ensayarse la capacidad de los inhibidores de Chk1 de la invención para mejorar la capacidad eliminadora mediante radiación.

Ejemplo 5

Ensayo de sensibilidad para medir la actividad inhibidora de Chk1 en modelos animales

15 El ensayo de sensibilidad siguiente fue desarrollado para medir la actividad inhibidora de Chk1 en modelos roedores de tumores. En particular, el ensayo puede ser usado, *inter alia*, para medir la capacidad de un inhibidor de Chk1 para bloquear la función de Chk1 en el modelo de tumor, y para permitir la valoración de las condiciones que facilitan el acceso del inhibidor de Chk1 a la diana molecular.

20 La capacidad de los inhibidores selectivos de Chk1 de abrogar un punto de verificación inducido por quimioterapia es medida usando un ensayo inmunofluorescente cuantitativo que mide el índice mitótico mediante la supervisión de la fosforilación de histona H3 en serina 10 (H3-P), un evento específico de mitosis (Ajiro et al., J Biol Chem., 271:13197-201, 1996; Goto et al., J Biol Chem., 274: 25543-9, 1999). El protocolo de ensayo es tal como se indica a continuación. Tumores de roedores, tratados o no tratados con activador de Chk1 (en el presente estudio, agente quimioterapéutico) y/o inhibidor de Chk1, son extirpados y son incluidos en parafina. Los tumores son cortados en rodajas de 6 micrómetros de espesor y son montados en portaobjetos. La parafina es retirada de las rodajas mediante tratamientos sucesivos de 3 minutos con xileno, 100% etanol, 95% etanol, 70% etanol y agua desionizada. A continuación, las rodajas son calentadas a 95°C en 10 mM citrato de sodio durante 10 min, seguido por una etapa de enfriamiento de 20 minutos. Las rodajas son bloqueadas durante 30 min con tampón de bloqueo (20% suero humano normal y 2% albúmina de suero bovino en solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,05% Triton X-100 (PBST)). El anticuerpo antifosfo histona H3 (Upstate Biotech, Cat. #06-570) es diluido 1:200 en el tampón de bloqueo y es incubado con las rodajas durante una hora. Las rodajas son lavadas 3 veces durante 5 min en PBST. El anticuerpo de burro anti conejo secundario conjugado con rodamina (Jackson, cat #711-295-152) es añadido durante 30 min. A continuación, las rodajas son lavadas dos veces en PBST y 75 µM de 0,1 µM/ml DAPI (Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se deja tinter durante 30 min. A continuación, las rodajas son lavadas dos veces más en PBST y son montadas con Vectashield (Vector, cat #H-1400). Las rodajas son visualizadas usando microscopía de fluorescencia. El porcentaje de células tintadas con anticuerpo H3-P en relación al total de células (tintadas con DAPI) es cuantificado usando el software Metamorph (Universal Imaging Corporation, Versión 4.6).

Ejemplo 6

Los inhibidores selectivos de Chk1 abrogan los puntos de verificación G2 y Fase S inducidos por daños en el ADN

40 Estudios anteriores demostraron que los inhibidores selectivos de Chk1 abrogan sustancialmente los puntos de verificación de las fases G2/M y S inducidos por daños. En el primero, el daño en el ADN es inducido mediante radiación ionizante (IR), cuya fase diana es la fase G2. En el último, el daño en el ADN es inducido mediante agentes quimioterapéuticos cuya fase diana es la fase S. Véase la publicación de solicitud de patente US 2003/0069284 publicada y las referencias citadas en la misma.

45 En breve, la abrogación del inhibidor de Chk1 del punto de verificación en G2 de daños en el ADN inducidos por IR es ensayada mediante experimentos de índice mitótico. Aproximadamente, 1×10^6 células HeLa son irradiadas con 800 rads y son incubadas durante 7 horas a 37°C. Debido a que las células son funcionalmente p53 negativas, se detienen exclusivamente en G2. A continuación, se añade nocodazol a una concentración de 0,5 µg/mL y se incuba durante 15 h a 37°C. (La adición de nocodazol está diseñada para atrapar las células que progresaron a través de la

5 detención en G2 en la mitosis, previniendo de esta manera que progresen adicionalmente en G1 y permitiendo una
 10 cuantificación de las células de la fase M). Un inhibidor selectivo de Chk1 es añadido durante 8 h, y las células son
 15 recogidas mediante centrifugación, son lavadas una vez con PBS, y a continuación, son resuspendidas en 2,5 mL 75
 mM KCL y son centrifugadas otra vez. A continuación, las células son fijadas en 3 mL de ácido acético:MeOH (1:3) frío,
 recién preparado, y fueron incubadas en hielo durante 20 min. Las células son peletizadas, la solución fijada es aspirada
 y las células son resuspendidas en 0,5 mL de PBS. Se preparan extensiones mitóticas colocando en pipetas 100 μ L de
 las células fijadas en un portaobjetos de microscopio e inundando la muestra con 1 ml de solución de fijación. A
 continuación, las rodajas con secadas con aire, son tintadas con tinte Wright (Sigma, St. Louis, MO) durante 1 minuto,
 seguido por un lavado en agua y un lavado en 50% MeOH. La presencia de cromosomas condensados y la falta de
 envoltorio nuclear identificaron las células mitóticas. Los inhibidores de Chk1 resultan en un incremento en el número de
 células mitóticas en presencia de irradiación, demostrando, de esta manera, la abrogación del arresto en G2 inducido
 por IR. Esta abrogación del punto de verificación resulta en una mejora en la actividad de ciclina-B/cdc2, que es
 necesaria para la progresión de las células a la mitosis. Las células tratadas con IR, seguido por inhibidor de Chk1,
 progresan, de esta manera, a la mitosis con el ADN dañado., Estos experimentos confirman la hipótesis de que Chk1
 está implicada en G2 inducida por IR.

Ejemplo 7

El inhibidor de Chk1 es captado por la células tumorales en presencia de un activador de Chk1 en un modelo de xenoinjerto de tumor

20 En un modelo de xenoinjerto de tumor, ratones inmunodeficientes son injertados con tumores carcinoma colon
 HT29 en el flanco y se dejan crecer a 200 mm³. A continuación, los ratones son tratados con cualquiera de entre
 vehículo, 300 mg/kg de inhibidor de Chk1, 20 mg/kg gemcitabina o se les coadministra 300 mg/kg de inhibidor de Chk1
 y 20 mg/kg de gemcitabina dos veces, separadas tres días en los Días 1 y 4. El tratamiento de ratones que presentan
 tumores mediante la coadministración de inhibidor de Chk1 y gemcitabina resulta en un retraso de crecimiento de 4 días
 en los tumores en comparación con la gemcitabina sola.

25 Para valorar la difusión de los inhibidores de Chk1 en tejido tumoral, se miden los niveles del inhibidor de Chk1
 en plasma y tejido. Usando una bomba Alzet, se administran 500 mg/kg de inhibidor de Chk1 a ratones con tumor HT29
 en un sistema de suministro continuo durante un periodo de 24 h. Se toman muestras de plasma, a continuación, se
 recogen los tumores, riñón, hígado, bazo y pulmón. Los puntos temporales de recogida son a 1, 2, 4, 8 y 24 h. Los
 tejidos son extraídos y se cuantifican los niveles de inhibidor de Chk1. Este experimento demuestra que un inhibidor de
 30 Chk1 penetra en el tejido normal y tumoral, alcanza un nivel de aproximadamente 15 μ M en el tejido tumoral, y alcanza
 un pico de aproximadamente 20 μ M, en el tejido del bazo, a las 8 h. De esta manera, los inhibidores de Chk1 son
 captados fácilmente por las células proliferativas y son útiles, en conjunción con agentes quimioterapéuticos activadores
 de Chk1, como terapias para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

Ejemplo 8

Respuesta a dosis de tumores tratados con inhibidores de Chk1 y gemcitabina

35 Para determinar una dosis eficaz de inhibidor de Chk1 tras un tratamiento con gemcitabina y si la abrogación,
 dependiente de la dosis, del punto de verificación se correlaciona o no con la actividad antitumoral, se realiza un
 experimento de respuesta a dosis.

40 Ratones inmunodeficientes son injertados con células tumorales HT29 y se dejó que los tumores se desarrollaran
 durante 10 días. En el inicio, los tumores eran de aproximadamente 100 mm³. Los animales fueron tratados con
 gemcitabina en el MTD (160 mg/kg) seguido por inhibidor de Chk1 a 50 mg/kg, 200 mg/kg o 400 mg/kg. El tiempo de
 pretratamiento de gemcitabina es de 32 h en este experimento, según se determina por un ensayo basado en células
 que indicó que este punto temporal era óptimo para este tipo de tumor. Un análisis del volumen del tumor en cada
 45 régimen de tratamiento indicó que el tratamiento de los ratones con tumor HT29 con la terapia descrita ralentiza más el
 crecimiento tumoral que la gemcitabina sola, con el tratamiento con 200 mg/kg o 400 mg/kg de inhibidor de Chk1 más
 gemcitabina mostrando de nuevo efectos dependientes de la dosis del inhibidor de Chk1.

Ejemplo 9

Ensayo para determinar si un agente es o no un activador de Chk1

50 Para determinar si un agente es o no un activador de Chk1, el estado de fosforilación de Chk1 puede medirse
 usando anticuerpos fosfo-específicos para sitios de fosforilación específicos en Chk1. Las serinas 317 y 345 han
 mostrado ser fosforiladas tras un tratamiento de células con radiación ionizante, radiación ultravioleta, hidroxurea, N-
 metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (MNNG), temozolamida y gemcitabina. Liu et al., Genes Dev. 14:1448-1459, 2000; Zhao
 et al., Mol. Cell Biol. 21:4129-4139, 2001; Lopez-Girona et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:11289-11294, 2001;
 Guo et al., Genes Dev. 14:2745-2756, 2000; Gatei et al., J. Biol. Chem. 278:14806-14811, 2003; Ng et al., J Biol Chem.
 279(10): 8808-19, 2004; Wang et al., Natl Acad Sci U S A. 100(26):15387-92, 2003; Stojic et al., Genes Dev.
 18(11):1331-44, 2004. Estos sitios serina son fosforilados por las quinasas del punto de verificación aguas arriba., Atm y

Atr. Liu et al., Genes Dev. 14: 1448-1459, 2000; Zhao et al. Mol. Cell Biol., 21:4129-4139, 2001).

La fosforilación de estos sitios en respuesta a un candidato a activador de Chk1 puede ser supervisada mediante transferencia Western blot o inmunohistoquímica de las células tumorales. Por ejemplo, el procedimiento siguiente puede ser usado para demostrar que la gemcitabina resulta en la activación de Chk1 en las serinas 345 y 317. Las células HT29 son tratadas con 20 μ M de gemcitabina durante dos h. La gemcitabina es lavada del medio de crecimiento celular y las células son incubadas durante 22 h adicionales. Los lisatos proteínicos son preparados y separados mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas son transferidas a membranas PVDF y son ensayadas con antisuero (señalización de células) específico para cualquiera de las serinas fosforiladas 317 ó 345 (señalización de células). Una transferencia Western blot muestra que el tratamiento con gemcitabina de células HT29 de carcinoma de colon resulta en la fosforilación de ambas serinas 317 y 345.

Ejemplo 10

Ensayo para supervisar la actividad Chk1 en respuesta a un inhibidor de Chk1

Se ha encontrado que la fosforilación de Chk1 en la serina 296 es estimulada mediante el tratamiento de las células tumorales con gemcitabina, y que la fosforilación en este sitio es inhibida mediante inhibidores de Chk1. La fosforilación en este sitio no es inhibida mediante wortmannina, que inhibe Atm y Atr. Por lo tanto, la fosforilación de la serina 296 es distinta de la fosforilación en las serinas 317 y 345. Además, se ha encontrado que este sitio es fosforilado en preparaciones de Chk1 purificadas, lo que sugiere que la enzima purificada es capaz de autofosforilarse o de fosforilar otras moléculas de Chk1 en la serina 296. En conjunto, estos datos sugieren que la fosforilación en la serina 296 se realiza mediante la propia Chk1. Por lo tanto, este enfoque puede ser usado para supervisar la actividad de Chk1 en tumores, en respuesta a activadores de Chk1. Además, este enfoque puede ser usado para medir la inhibición de la activación de Chk1 por inhibidores de Chk1.

De esta manera, células HT29 son tratadas con 20 μ M de gemcitabina durante dos h. La gemcitabina es lavada del medio de crecimiento celular y las células son incubadas durante 22 h adicionales. Los lisatos proteínicos son preparados y separados mediante una electroforesis en gel SDS-poliacrilamida. Las proteínas son transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y son ensayadas con antisuero (señalización de células) específico para la serina fosforilada 296 (señalización de células). Una transferencia Western blot muestra que el tratamiento con gemcitabina de células HT29 de carcinoma de colon resulta en la fosforilación de la serina 296. Además, las células HT29, tratadas con un inhibidor selectivo de Chk1 durante 15 min, no muestran fosforilación de la serina 296. Estos datos sugieren que la fosforilación de la serina 296 es realizada por la quinasa Chk1.

Ejemplo 11

Modelos animales de tumor

Para ensayar para la capacidad de los inhibidores de Chk1 de la invención para mejorar la capacidad eliminadora de tumores mediante agentes perjudiciales para el ADN en ratones, se establecieron líneas de células con tumor de colon usando modelos de xenoinjerto de tumor. Pueden usarse 5-fluorouracilo (5-FU) o gemcitabina como agentes perjudiciales para el ADN. Pueden usarse células HT29 y Colo205 (carcinoma de colon humano) y H460 y Calu-6 (carcinoma de células pequeñas) para propagar los tumores de xenoinjerto en ratones Balb/c (nu/nu) tímicos, hembras, de 6-8 semanas de edad. Los ratones se mantienen en una cabina con flujo de aire laminar bajo condiciones libres de patógenos y se les alimenta con comida y agua estéril, *ad libitum*. Las líneas celulares se cultivan a subconfluencia en un entorno humidificado al 5% de CO₂. Las suspensiones celulares individuales son preparadas en CMF-PBS, y la concentración celular es ajustada a 1×10^8 células/mL. Los ratones son inoculados subcutáneamente (s.c.) en el flanco derecho o pierna derecha con un total de 1×10^7 células (100 μ L).

Los ratones son distribuidos aleatoriamente (5-15 ratones/grupo) en cuatro grupos de tratamiento y son usados cuando los tumores alcanzan un volumen de 75-100 cm³ (normalmente, 7-11 días tras la inoculación). Los tumores son medidos con calibres vernier y los volúmenes tumorales son estimados usando la fórmula derivada empíricamente: volumen tumoral (cm³) = longitud tumoral (cm) x ancho tumoral (cm) x profundidad tumoral (cm) / 3,3. El tratamiento consiste en i) 100 μ L inyección intraperitoneal (i.p) de gemcitabina a 160 mg/kg. Se observa un retraso en el crecimiento tumoral en los ratones tratados con gemcitabina. El tratamiento de ratones con 160 mg/kg gemcitabina en combinación con la administración oral de inhibidores de Chk1 se espera que reduzca los volúmenes tumorales y prolongue la vida. El tamaño tumoral se supervisa cada dos días durante la duración del experimento.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto, que es 1-[5-bromo-4-metil-2-S-(morfolin-2-ilmetoxi)-fenil]-3-(5-metil-pirazin-2-il)-urea o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
3. Compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.
- 10 4. Compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza o cuello, un cáncer pancreático, un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer vesical, un cáncer vulvar, una leucemia, un linfoma, un melanoma, un carcinoma de célula renal, un cáncer de ovario, un cáncer de cerebro, un osteosarcoma o un cáncer de pulmón.
- 15 5. Uso del compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza o cuello, un cáncer pancreático, un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer vesical, un cáncer vulvar, una leucemia, un linfoma, un melanoma, un carcinoma de célula renal, un cáncer de ovario, un cáncer de cerebro, un osteosarcoma o un cáncer de pulmón.