

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 558**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2009** **E 09768586 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013** **EP 2379532**

54 Título: **Compuestos útiles para la inhibición de Chk1**

30 Prioridad:

17.12.2008 US 138176 P

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

22.04.2013

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

FAROUZ, FRANCINE, S.;
HOLCOMB, RYAN, COATSWORTH;
KASAR, RAMESH y
MYERS, STEVEN, SCOTT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 401 558 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

Compuestos útiles para la inhibición de Chk1

La presente invención se refiere a un compuesto de aminopirazol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, que inhibe Chk1 y es útil para el tratamiento de cánceres caracterizados por defectos en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la segregación de cromosomas o la división celular.

Chk1 es una proteína quinasa que se encuentra aguas abajo de Atm y/o Atr en la ruta de transducción de la señal de punto de control de daños en el ADN. En las células de mamíferos, Chk1 se fosforila en respuesta a agentes que causan daños en el ADN, incluyendo radiación ionizante (IR), luz ultravioleta (UV) e hidroxiurea. Esta fosforilación, que activa Chk1 en células de mamífero, es dependiente de Atr. Chk1 desempeña un papel para que el punto de control de daños en el ADN dependiente de Atr se detenga en la fase S y en G2M. Chk1 se fosforila e inactiva Cdc25A, la fosfatasa de especificidad dual que normalmente desfosforila ciclina E/Cdk2, deteniendo la progresión a través de la fase S. Chk1 fosforila e inactiva también Cdc25C, la fosfatasa de especificidad dual que defosforila ciclina B/Cdc2 (también conocida como Cdk1) deteniendo la progresión del ciclo celular en el límite de G2 y la mitosis (Fernery et al, Science, 277: 1495-1, 1997). En ambos casos, la regulación de la actividad Cdk induce una detención del ciclo celular para prevenir que las células entren en mitosis en presencia de daños en el ADN o ADN no replicado.

Se ha informado acerca de diversos inhibidores de Chk1. Véase, por ejemplo, los documentos WO 05/066163, WO 04/063198, WO 03/093297 y WO 02/070494. Además, una serie de inhibidores de Chk1 de aminopirazol se divulgan en el documento WO 05/009435.

Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de inhibidores de Chk1 que sean inhibidores potentes de los puntos de control del ciclo celular que puedan actuar eficazmente como potenciadores de los agentes que dañan el ADN. La presente invención proporciona un nuevo compuesto de aminopirazol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o solvato de la sal, que es un potente inhibidor de Chk1. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, abroga potentemente una detención del ciclo celular mediada por Chk1 inducida por un tratamiento con agentes que dañan el ADN en cultivo tisular y *en vivo*. Además, el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención proporciona también inhibición de Chk2, lo que puede ser beneficioso para el tratamiento del cáncer. Además, la falta de inhibición de otras proteínas quinastas determinadas, tales como CDK1, puede proporcionar un beneficio terapéutico al minimizar los efectos no deseados. Además, el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención inhibe la proliferación celular de células cancerosas mediante un mecanismo dependiente de la inhibición Chk1.

La presente invención proporciona un nuevo compuesto de aminopirazol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, que es un antagonista de Chk1. Dichos nuevos compuestos podrían abordar la necesidad de tratamientos seguros y efectivos contra el cáncer.

La presente invención proporciona un compuesto que es 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal. Las realizaciones preferentes son 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, sal de ácido fórmico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, sal de cloruro de dihidrógeno de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo y sal de ácido metanosulfónico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo y 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il]amino] monohidrato monomesilato de 2-pirazinacarbonitrilo.

Como una realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo.

La presente invención proporciona las sales de ácido fórmico, cloruro de diácido y ácido metanosulfónico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo.

La presente invención proporciona también el compuesto que es 2-pirazinacarbonitrilo, 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il]amino] monohidrato monomesilato.

La presente invención proporciona 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il] amino] monohidrato monomesilato de 2-pirazinacarbonitrilo en forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos X que tiene picos en $2\theta \pm 0,02 = 12,64, 21,25$ y $26,15$.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o un solvato de la sal, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal. Además, la presente invención proporciona también un procedimiento de tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, y radiación ionizante. Además, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, y un agente de quimioterapia.

La presente invención proporciona el uso de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Además, la presente invención proporciona también el uso de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que dicho tratamiento comprende terapia de combinación con radiación ionizante. Además, la presente invención proporciona el uso de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer mediante terapia de combinación, en el que dicho tratamiento de terapia de combinación comprende la administración de dicho medicamento y la administración de uno o más agentes de quimioterapia al mismo paciente.

La presente invención proporciona 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para su uso en terapia. La presente invención proporciona también 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para su uso en el tratamiento del cáncer. Además, la presente invención proporciona también 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, y radiación ionizante para su uso en terapia. Además, la presente invención proporciona 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, y un agente quimioterapéutico para su uso en terapia.

La presente invención proporciona 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para su uso en el tratamiento del cáncer. Además, la presente invención proporciona también 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, y radiación ionizante para su uso en el tratamiento del cáncer. Además, la presente invención proporciona 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, y un agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona el uso de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que el medicamento debe administrarse simultánea, separada o secuencialmente con radiación ionizante.

La presente invención proporciona el uso de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que el medicamento comprende también un agente de quimioterapia o debe administrarse simultánea, separada o secuencialmente con un agente quimioterapéutico.

La presente invención proporciona 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para su uso en una combinación simultánea, separada o secuencial con radiación ionizante en el tratamiento del cáncer.

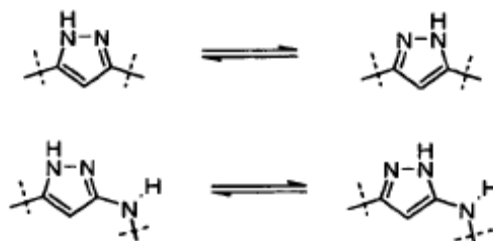
La presente invención proporciona 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, para su uso en una combinación simultánea, separada o secuencial con un agente de quimioterapia en el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Además, la presente invención proporciona realizaciones preferentes de los procedimientos y usos tal como se describe en la presente memoria, en los que el agente quimioterapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste

en 5-fluorouracilo, hidroxiurea, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, doxorrubicina, etopósido, cisplatino y taxol. Las realizaciones preferentes de los procedimientos y usos descritos en la presente memoria son los cánceres seleccionados de entre el grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, mesotelioma, cáncer renal y cáncer de útero.

El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención puede existir como formas tautómeras. Cuando existen formas tautoméricas, cada forma y sus mezclas están contempladas en la presente invención.



A menos que se defina lo contrario, la presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables del compuesto del Ejemplo 3, así como los solvatos de la base libre del compuesto del Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a sales del compuesto del Ejemplo 3. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y procedimientos para su preparación son convencionales en la técnica. Véanse, por ejemplo, Stahl et al., "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use", VCHA/Wiley-VCH, (2002); Gould, P.I., "Salt selection for basic drugs", International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); y Bastin et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000).

Además de las sales farmacéuticamente aceptables, otras sales están incluidas en la invención. Estas pueden servir como intermedios en la purificación de compuestos o en la preparación de otras sales farmacéuticamente aceptables, o son útiles para identificación, caracterización o purificación.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero humano o no humano. Más particularmente, el término "paciente" se refiere a un ser humano.

El término "tratar" (o "tratamiento") se refiere al procedimiento que implica una ralentización, interrupción, detención, control, reducción o reversión de la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal de la presente invención, descrita en la presente memoria, sola o en combinación con radiación ionizante o un agente de quimioterapia que, tras una administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Una cantidad eficaz puede ser determinada fácilmente por el médico, como persona con conocimientos en la materia, teniendo en cuenta una serie de factores tales como la especie de mamífero, su tamaño, edad y salud general; la co-administración de otros agentes, si necesario; la enfermedad específica implicada, el grado o la gravedad de la enfermedad, la respuesta del paciente individual, el compuesto particular administrado, el modo de administración, las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado, el uso de cualquier medicamento concomitante y otras circunstancias relevantes. Aunque no debe interpretarse, en modo alguno, como una limitación de la presente invención, 20-150 mg/m² representan una cantidad eficaz del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, descrito en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "terapia de combinación" se refiere a la administración separada, simultánea o secuencial del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención y un agente quimioterapéutico. Además, la expresión "terapia de combinación" se refiere a la administración separada, simultánea o secuencial del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención y radiación ionizante.

El compuesto del Ejemplo 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, puede ser formulado para su administración como parte de una composición farmacéutica. Como tal, las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto del Ejemplo 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, en combinación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables son

una realización importante de la invención. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, A. Gennaro, et al., eds., 19ª ed., Mack Publishing (1995).

5 El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención se puede administrar por cualquier vía que la haga biodisponible, incluyendo las vías oral y parenteral. Por ejemplo, el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, puede ser administrado por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, tópica, intranasal, rectal, bucal, etc. Como alternativa, el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, puede ser administrado por infusión. La infusión intravenosa es la vía de administración preferente.

10 Tal como se usa en la presente memoria, los términos siguientes tienen los significados indicados: "BCA" se refiere a ácido bicinconínico; "boc o t-boc" se refiere a tert-butoxicarbonilo; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "CPMS" se refiere a cuentas por minuto ; "DIAD" se refiere a azodicarboxilato de diisopropilo; "DMEM" se refiere a medio de Eagle modificado por Dulbecco; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DPBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; "DTT" se refiere a ditioneitol; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminetetraacético; "EtOH" se refiere al etanol; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HEPES" se refiere a ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico; "MEM" se refiere a un medio esencial mínimo; "MeOH" se refiere a metanol; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "PBST" se refiere a solución salina Tween-20 tamponada con fosfato, "PI" se refiere a yoduro de propidio; "ARNasa" se refiere a la ribonucleasa A; "SDS" se refiere a dodecil sulfato de sodio; "RT" se refiere a temperatura ambiente; "TBS" se refiere a solución salina tamponada con tris; "TBST" se refiere a solución salina Tween-20 tamponada con Tris; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "TR-FRET" se refiere a transferencia de energía fluorescente con resolución temporal; "Tris" se refiere a tris (hidroximetil) aminometano; "Triton-X" se refiere a 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol t-octilfenoxipolietoxietanol polietilenglicol tert-octilfenil éter y "Tween-20" se refiere a polisorbato 20.

25 Los resultados de los ensayos siguientes demuestran evidencia de que el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal, de la presente invención es útil como un inhibidor de Chk1, inhibidor de Chk2, y como un agente anticancerígeno. Tal como se usa en la presente memoria, "IC50" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la máxima respuesta inhibitoria posible para ese agente y "CE50" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la máxima respuesta posible para ese agente.

Ensayo bioquímico Chk1

30 El efecto de los compuestos sobre la actividad bioquímica de Chk1 se puede determinar usando un ensayo TR-FRET. En este ensayo, se usa un anticuerpo marcado con terbio para detectar el producto fosforilado formado a partir de una reacción de quinasa, sustrato marcado con fluoresceína y ATP. El anticuerpo se une al sustrato fosforilado, lo que resulta en un aumento en el valor TR-FRET calculado como la relación de la señal del aceptor (fluoresceína) a la señal del donante (terbio).

35 Las reacciones quinasa (25 µl de volúmenes de reacción) se realizan en placas de poliestireno de 96 pocillos con la mitad del área negra (Costa, cat # 3694). Las reacciones se iniciaron con la adición de ATP. Las condiciones finales de reacción son 50 mM HEPES pH 7,5, 0,005% (v/v) de Triton™ X-100, 2 mM de DTT, 2 mM MgCl₂, 104 nM de sustrato fluoresceína-PKC (Invitrogen, cat # PV3506), 30 µM de ATP, 1,5 nM de enzima Chk1 activa (Millipore, cat # 14-346), 4% (v/v) de DMSO y dilución en serie del compuesto del Ejemplo 2 (dilución 1:3 en serie, empezando en 20 µM , 10 puntos). Después de la adición de ATP, las reacciones se incuban a temperatura ambiente durante 75 minutos, y, a continuación, se terminan con la adición de 25 µl de tampón de dilución TR-FRET (Invitrogen # PV3574) que contiene 10 mM EDTA y 2,1 nM de anticuerpo Tb-pSer (Invitrogen, cat # PV3574). Las reacciones desactivadas se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos y, a continuación, se mide TR-FRET usando un lector de placas Envision de PerkinElmer con filtros para longitud de onda Ex340nm, Em495nm y Em520nm.

45 Para la determinación de CI50, el porcentaje de inhibición para cada concentración se calcula usando la relación TR-FRET a partir de los controles realizados en cada placa. Los datos de diez puntos de concentración del compuesto se ajustan posteriormente a una ecuación logística de cuatro parámetros usando ActivityBase 4.0. Los valores de IC50 absolutos se calculan a partir de la curva resultante. El compuesto del Ejemplo 2 se mide en este ensayo con un una IC50 de <0,00 µM. Esto demuestra que los compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de Chk1.

50 Ensayo bioquímico de Chk2

El efecto de los compuestos sobre la actividad bioquímica de Chk2 se puede determinar usando un ensayo TR-FRET. En este ensayo, se usa un anticuerpo marcado con terbio para detectar el producto fosforilado formado a partir de una reacción de quinasa, sustrato marcado con fluoresceína y ATP. El anticuerpo se une al sustrato fosforilado, lo que resulta en un aumento en el valor de TR-FRET calculado como la relación de señal del aceptor (fluoresceína) a la señal de donante (terbio).

Las reacciones quinasa (25 μ l de volúmenes de reacción) se realizan en placas de poliestireno de 96 pocillos con la mitad del área negra (Costa, cat # 3694). Las reacciones se iniciaron con la adición de ATP. Las condiciones finales de reacción son 50 mM HEPES pH 7,5, 0,005% (v/v) de TRITON™ X-100, 2 mM de DTT, 2 mM MgCl₂, 104 nM de sustrato fluoresceína-PKC (Invitrogen, cat # PV3506), 30 μ M ATP, 2,5 nM de enzima Chk2 activa (Millipore, cat # 14-347), 4% (v/v) de DMSO y dilución en serie del compuesto del Ejemplo 2 (dilución en serie 1:3, empezando en 20 μ M, 10 puntos). Después de la adición de ATP, las reacciones se incuban a temperatura ambiente durante 75 minutos y, a continuación, se terminan con la adición de 25 μ l de tampón de dilución TR-FRET (Invitrogen # PV3574) que contiene 10 mM EDTA y 2,1 nM anticuerpo Tb-pSer (Invitrogen, cat # PV3574). Las reacciones desactivadas se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos y, a continuación, se mide TR-FRET usando un lector de placas Envision de PerkinElmer con filtros para longitud de onda Ex340nm, Em495nm y Em520nm.

Para la determinación de IC₅₀, el porcentaje de inhibición para cada concentración se calcula usando la relación TR-FRET de los controles realizados en cada placa. Los datos de concentración compuestos de diez puntos se ajustan posteriormente a una ecuación logística de cuatro parámetros usando ActivityBase 4.0. Los valores IC₅₀ absolutos se calculan a partir de la curva resultante. El compuesto del Ejemplo 2 se mide en este ensayo con un valor IC₅₀ de 0,0047 μ M. Esto demuestra que los compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de Chk2.

Ensayo de autofosforilación de Chk1 basado en células

Un inhibidor de Chk1 impedirá que la actividad quinasa de la proteína fosforilice los sustratos en células en las que se ha activado la respuesta a daños en el ADN. Un sustrato fácilmente detectable para Chk1 es un sitio de autofosforilación en la propia Chk1, serina 296. Puede usarse el siguiente ensayo de inmunotransferencia para medir la cantidad de fosforilación de serina 296 en Chk1 e indirectamente el nivel de actividad de la proteína quinasa Chk1. Células HeLa (adquiridas en ATCC) se cultivan en MEM con sales de Earle (Invitrogen) con L-glutamina (Gibco™) suplementado con 10% (v/v) de FBS inactivado por calor (Gibco™), 1 x MEM de aminoácidos no esenciales (Gibco™), 1 x piruvato de sodio (Gibco™) y 1 x 10⁵ células colocadas en 600 μ l de medio de cultivo MEM (arriba) por cada pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Las células se incuban durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95%-100% de humedad. Dieciséis μ l de 4 μ M solución de almacén de doxorubicina (Sigma) en medio de cultivo se añadieron a cada pocillo apropiado para conseguir una concentración final de 100 nM de doxorubicina. Las placas se devuelven a la incubadora durante 24 horas adicionales antes de la adición de compuesto inhibidor de Chk1. Los compuestos se solubilizan a 10 mM en 100% de DMSO, a continuación se diluyen a 2 mM en 40% (v/v) de DMSO y, a continuación, se diluye a 100 μ M con medios de cultivo más 4% (v/v) de DMSO. Las diluciones en serie posteriores de los compuestos (1:3) se preparan en un intervalo de 100 μ M a 0,005 μ M. Sesenta y seis μ l de compuesto de almacén se añaden a los pocillos apropiados de la placa para producir una concentración final de DMSO de 0,4% (v/v) y una concentración final de compuesto en el intervalo entre 1 μ M y 0,0005 μ M. Las placas se devuelven a la incubadora durante dos horas y, a continuación, se retiran para la lisis celular y procesamiento. A continuación, el medio se retira de la placa, cada pocillo se lava una vez con 0,5 ml de DPBS enfriado con hielo (Gibco™), se retira todo el líquido y la placa se coloca en hielo durante el resto del procedimiento. A cada pocillo se añaden 75 μ l de tampón de lisis enfriado con hielo, que consiste en tampón de extracción celular (Invitrogen) que contiene inhibidores de fosfatasa (Sigma) e inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics). Después de 10 minutos, cada pocillo se raspa y el lisado se transfiere a un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml en hielo. Cada lisado se somete a ultrasonidos durante 45 segundos con un baño de ultrasonidos de placa cuphorn (Misonix) mientras está suspendido en un baño de agua/hielo. Se transfieren cincuenta μ l de cada muestra a un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 0,5 ml que contiene 25 μ l de 4x tampón de muestras Laemmli (240 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% de glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 8% p/v de SDS y 20% (v/v) de beta-mercaptol etanol), se calienta a 95°C durante 5 minutos y se almacena congelado a -80°C. El lisado restante se usa para la determinación de la concentración de proteínas (Kit de ensayo de proteínas BCA™, Thermo Scientific). Cinco μ g de cada lisado celular en tampón de muestra se aplican a un gel E-Page de 96 pocillos (Invitrogen) y se someten a electroforesis según las instrucciones del fabricante. Las proteínas se electrotransfieren del gel a una membrana Immobilon-P (Millipore) según procedimientos bien conocidos en la técnica [Towbin et al., 1979]. La membrana se enjuaga brevemente con 10 mM Tris/HCl pH 8,0, NaCl 150 mM y 0,05% (v/v) de Tween 20 (TBST) y se sumerge durante una hora a 25°C en TBST/5% (v/v) de leche instantánea Carnation® reconstituida. La membrana se lava cuatro veces con TBST durante cinco minutos, a continuación se sumerge a 4°C durante 24 horas en TBST/5% (p/v) de BSA con una dilución apropiada de anticuerpo de conejo anti-fosfo Chk1 (serina 296) (Cell Signaling). La membrana se lava cuatro veces con TBST durante cinco minutos a 25°C y, a continuación, se sumerge a 25°C durante dos horas en TBST/5% de leche que contiene una dilución apropiada de IgG de burro anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Amersham) para detectar la proteína Chk1 autofosforilada. La membrana se lava de nuevo cuatro veces con TBST durante cinco minutos a 25°C. Los conjuntos antígeno-anticuerpo indicadores inmovilizados sobre la membrana se detectan con el reactivo de detección Super Signal Western Femto HRP (Pierce) según las recomendaciones del fabricante usando un reproductor de imágenes de quimioluminiscencia (Fujifilm). Las intensidades de la banda de fosfo-Chk1 (ser296) se calculan usando el software "Total Lab" (Nonlinear Dynamics). El porcentaje de inhibición de la autofosforilación de Chk1 inducida por doxorubicina se calcula usando la fórmula siguiente: % de inhibición = (intensidad de la banda de fosfoChk1 de la muestra - intensidad de la banda de fosfoChk1 de control negativo sin doxorubicina) / (intensidad de la banda de fosfoChk1 de control positivo con

doxorubicina - intensidad de la banda de phosphoChk1 de control negativo sin doxorubicina) x 100. El compuesto del Ejemplo 2 se mide en este ensayo con un valor EC50 de <0,0005 µM. Esto demuestra que los compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de Chk1.

5 **Ensayo de capacidad de abrogación del punto de control G2M inducida por doxorubicina, basado en células HeLa**

Un inhibidor de Chk1 desactivará el punto de control G2M de daños del ADN en células tumorales p53-minus tratadas con el inhibidor de topoisomerasa II, doxorubicina. Una medición de la abrogación del punto de control G2M es la fosforilación de la histona H3 en serina 10 que se produce después de que las células pasan el punto de control G2M y pasan a la mitosis. El siguiente ensayo de obtención de imágenes de alto contenido puede ser usado para medir la fosforilación de la histona H3 en las células. Se cultivan células HeLa (adquiridas en ATCC) en medio MEM (Gibco™) suplementado con 10% (v/v) de FBS y se siembran a 2.000 células por pocillo en placas negras con fondo transparente revestidas con poli-D-lisina (BD Biocoat Cat # 3504640), 100 µl de volumen por pocillo. A continuación, las placas se incuban en una incubadora de cultivo celular durante 18-24 horas (37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa). Después de la incubación inicial, 20 µl de medio MEM Gibco™ con 10% de FBS que contiene 625 nM de doxorubicina se añaden a los pocillos apropiados de las placas resultando en una concentración final de 125 nM. Las placas se devuelven a la incubadora durante 24 horas, suficiente para detener las células en el punto de control G2M. Al día siguiente, las células se tratan con el compuesto del Ejemplo 2. El compuesto del Ejemplo 2 es solubilizado a 10 mM en 100% de DMSO y, a continuación, se diluye a una solución de almacén 10X empezando en 50 µM en 4% (v/v) de DMSO-MEM. Posteriormente, se preparan diluciones en serie (1:2) del compuesto en un intervalo de 50 µM a 0,39 µM. Se añaden trece µl de compuesto de almacén a los pocillos apropiados en la placa para producir una concentración final de DMSO de 0,4% y un intervalo de concentración final de compuesto de entre 5 µM y 0,039 µM. Las placas se devuelven a la incubadora durante siete horas adicionales y, a continuación, se retiran para su fijación. El líquido se retira cuidadosamente de cada pocillo y se añaden 100 µl de fijador PREFER™ (Anatech LTD. Cat # 414). Las placas se mantienen a temperatura ambiente durante 20 minutos, el fijador se elimina y, a continuación, las células se permeabilizan mediante la adición de 100 µl/pocillo de 0,1% (v/v) de Triton® X 100 (Pierce Cat # 28314) en DPBS (Gibco™ cat # 14040) durante 10 minutos. La solución se retira y la placa se lava dos veces con 100 µl de DPBS por pocillo seguido por la adición de 100 µl de DPBS que contiene 50 µg/ml de ARNasa (ribonucleasa A, Sigma Cat # R-6513) durante una hora a temperatura ambiente. La solución de ARNasa se retira y las células se tiñen por la presencia de histona H3 fosforilada en serina 10 (pHH3) añadiendo a cada pocillo 50 µl de solución de ARNasa que contiene una dilución 1:500 de conejo anti-pHH3 (Ser10) (UBI Cat # 06-570) más 1% (p/v) BSA (Gibco™ cat # 15260). Las placas se sellan y se mantienen a 4°C durante la noche. El anticuerpo primario se elimina lavando cada placa dos veces con 100 µl de DPBS por pocillo y se reemplaza con 50 µl de una dilución 1:750 de anticuerpo de cabra IgG anti-conejo acoplado a colorante Alexa 488 (Invitrogen cat# A11008) en DPBS más 1% (p/v) de BSA. Las placas se mantienen durante una hora a temperatura ambiente revestidas con papel de aluminio para protegerlas de la luz. Las placas se lavan de nuevo dos veces con 100 µl de DPBS por pocillo y se reemplazan con 100 µl de yoduro de propidio 15 nM (dilución 1:100 con PBS de la solución original, Molecular Probes cat# P3566). Las placas se sellan con un sello negro para proteger las placas de la luz. Las placas se incuban durante 30 minutos para teñir los núcleos. Las placas se escanean con citómetros de fluorescencia para microplacas con láser de barrido ACUMEN EXPLORER™ usando una excitación de 488 nm (TTP LABTECH LTC) para medir el contenido de pHH3 y ADN incluyendo 2N y 4N. Las células pHH3 positivas se identifican por una intensidad media a 519 nm con Alexa 488. La intensidad total a 655-705 nm de yoduro de propidio/ADN se usa para identificar células individuales y subpoblaciones en ciclo celular (células 2N, células 4N). La lectura final para cada población se determina normalizando al % de células totales que producen una salida final de ensayo de %pHH3, %2N y %4N. A continuación, se determina el 100% de actividad tratando las células con la concentración máxima de un compuesto inhibidor de control a 100 nM para determinar el % de actividad final de cada compuesto. El 0% de actividad se basa en un tratamiento sin compuesto. La EC50 relativa se determina usando ACTIVITY BASE™, ajuste de Excel, ajuste de curva usando un ajuste logístico de cuatro parámetros, ecuación 205, para determinar el %pHH3 en relación a un máximo de control a 100%. El compuesto del Ejemplo 2 se mide en este ensayo para con un valor EC50 de 0,0105 µM. Esto demuestra que los compuestos de la presente invención desactivarán el punto de control de daños G2M del ADN.

50 **Ensayo EC_{tf} (Doble sensibilización)**

Un inhibidor de Chk1 puede potenciar la actividad anti-proliferativa de gemcitabina (u otros agentes citotóxicos) a través de la abrogación del punto de control de la fase intra-S, resultando en daños sostenidos y adicionales en el ADN. La capacidad de proliferación continua de células tumorales tras daños en el ADN puede ser analizada mediante la determinación de la capacidad de las células para replicar su ADN. Este ensayo evalúa la capacidad de las células para replicar su ADN después de que las células han tenido una oportunidad para reparar el daño del ADN. En este ensayo, las células se tratan con gemcitabina y, a continuación, con el compuesto del Ejemplo 2. Tras un período de recuperación, las células se analizan para determinar su capacidad para incorporar timidina radiactiva en el ADN durante la fase S. El parámetro EC_{tf} es una medida de la concentración de un inhibidor de Chk1 necesaria para reducir a la mitad la concentración de gemcitabina GI90, medida en este ensayo en ausencia de inhibición de Chk1. Las

células HT-29 (obtenidas en ATCC), se cultivan en RPMI 1640 más 10% (v/v) de FBS inactivado por calor (Gibco™). Estas células se cultivan a $1,3 \times 10^3$ por pocillo en placas Corning Costar de cultivo tisular de 96 pocillos. Después de colocar las células en placas, las placas de cultivo tisular se mantienen a temperatura ambiente durante 45 minutos, antes de volver a 37°C. Las placas se incuban durante 24 horas antes de la adición de gemcitabina. Antes de la adición de gemcitabina, el medio se retira de todos los pocillos y se reemplaza con 150 μ l por pocillo de medio RPMI. Se preparan existencias de gemcitabina a 10 mM en solución salina tamponada con fosfato. Se preparan diluciones de gemcitabina a concentraciones de 4x en medio RPMI y se añaden a los pocillos a 50 μ l por pocillo. La concentración final más alta de gemcitabina usada es 80 μ M y las diluciones proceden mediante etapas de dilución cuádruple. Dos horas más tarde, el medio que contiene gemcitabina se retira de los pocillos y se reemplaza con 150 μ l por pocillo de medio RPMI fresco. El compuesto del Ejemplo 2 (10 mM en DMSO) se diluye en primer lugar en DMSO a concentraciones finales 2.000 X, y a continuación se diluye 1:500 en medio RPMI para generar 4 X existencias para su adición a los pocillos. El volumen de adición es 50 μ l. Las diluciones del compuesto proceden por etapas de dilución doble, partiendo de 5.000 nM. Veinticuatro horas después de la adición del compuesto del Ejemplo 2, el medio que contiene inhibidores se elimina por aspiración y se reemplaza con 200 μ l por pocillo de medio RPMI fresco. Setenta y dos horas después de la eliminación del compuesto del Ejemplo 2, se inicia el marcado de timidina tritiada. Se diluye 1:20 3 H-timidina (NET 027X001, PerkinElmer, actividad específica 20 Ci/mmol) en medio RPMI completo para obtener una concentración de 0,05 mCi/ml. Se añaden 20 μ l de esta solución a cada pocillo, proporcionando 1 μ Ci/pocillo de 3 H-timidina. Las células se marcan durante veintidós horas. El medio que contiene 3 H-timidina es eliminado completamente de los pocillos. A continuación, las placas se congelan a -20°C, durante varias horas. Para recolectar el ADN que contiene 3 H-timidina incorporada, las placas se descongelan durante varios minutos y, a continuación, se añaden 120 μ l por pocillo de 0,1 N NaOH a cada pocillo. A continuación, cada placa se incuba a 37°C, con un mezclado lento en un rotador, durante 10 minutos. El ADN se recoge con un Filtermate 196 Harvester (PerkinElmer) y se recoge en placas Unifilter GF/C de 96 pocillos (PerkinElmer # 6005174). Los pocillos de la placa de cultivo tisular en los que las células habían sido marcadas se lavan con agua 5X. Las membranas de placa Unifilter se lavan con 4,5 ml adicionales por pocillo (3 x 1,0 ml) y finalmente un lavado con 1,5 ml). A continuación, las placas Unifilter se secan a 37°C durante al menos 6 horas. El fondo de cada placa de filtro se selló con una lámina adhesiva Backseal (PerkinElmer), y se añaden 50 μ l/pocillo de MicroScint-20 (Perkin Elmer). A continuación, cada placa se sella con una lámina adhesiva Topseal transparente (PerkinElmer). Las placas se cuentan en un contador de centelleo Topcount (PerkinElmer), a 1 minuto por pocillo. Las cuentas de 3 H-timidina por minuto (cpm) se exportan a Prism (GraphPad) para su análisis y representación gráfica. Se determina una respuesta a la dosis de gemcitabina para cada concentración del compuesto del Ejemplo 2. Para ello, se normaliza el valor cpm, estableciendo una incorporación del 100% como el valor cpm promedio para la concentración del compuesto del Ejemplo 2 en ausencia de gemcitabina y la ausencia de incorporación (100% de inhibición) como cpm = 0 (sin recuentos por minuto). Para representar gráficamente los datos en Prism, las concentraciones de gemcitabina se transforman a valores logarítmicos y las curvas de dosis-respuesta se ajustan mediante regresión no lineal. No se restringen ni los ajustes superiores ni los inferiores. El valor EC₅₀ es 0,3 nM. Además, 3 nM del compuesto del Ejemplo 2 reduce el valor EC₅₀ de gemcitabina 7 veces desde 37 nM a 5 nM en células HT29 de carcinoma de colon. La acción del compuesto del Ejemplo 2 aumenta también el porcentaje de inhibición de la proliferación desde 52 para la gemcitabina a 73 para la combinación. Individualmente, 3 nM del compuesto del Ejemplo 2 tiene poco efecto sobre la proliferación de las células HT29.

40 Ensayo de inhibición objetivo de Chk1 *in vivo*

Se cultivan células Calu-6 (ATCC) en medio de crecimiento (MEM con sales de Earle (Invitrogen) con L-glutamina (Gibco™) suplementado con 10% (v/v) de FBS inactivado por calor (Gibco™), 1 X aminoácidos no esenciales MEM (Gibco™), 1 X piruvato de sodio (Gibco™)) y se expanden. Las células se recogen y se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se mezclan 1×10^6 células en medio de crecimiento (sin suero) con un volumen igual de matriz BD Matrigel™ (BD Bioscience, Franklin, NJ), a continuación se inyectan por vía subcutánea en el flanco de ratones atómicos pre-irradiados (4,5 Gy) (atómicos, de Harlan, Indianapolis, IN). En el día 15 después de la implantación (tamaño del tumor = 150-200 mm³), se administra diariamente gemcitabina fresca formulada en solución salina (Hospira, Lake Forest, IL) a los animales por vía intraperitoneal a una dosis de 150 mg/kg. Seis horas después, se administró a los animales el compuesto del Ejemplo 2 formulada en una relación molar de ácido metano sulfónico/20% de Captisol (CYDEX, Overland Park, KS) por vía intravenosa, reduciendo las dosis partiendo de 15 mg/kg. Los animales se sacrifican 2 horas después de la dosis de inhibidor de Chk1, se recogen los tumores y se procesan inmediatamente en tampón de extracción celular enfriado en hielo (Invitrogen cat # FNN0011) que contiene inhibidores de fosfatasa (Sigma) e inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics). Los tumores se procesan en 1,5-2,0 ml de tampón de lisis en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml helado usando un homogeneizador de tejido motorizado (Powergen 700) a alta velocidad durante 15 segundos. Con la muestra mantenida en hielo, el lisado se pasa cuatro veces a través de una jeringa de 1 ml con una aguja de calibre 25. A continuación, se transfieren 0,35 ml de lisado de tumor a un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml que contiene 0,15 ml de tampón de muestras de 4 X Laemmli (240 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% de glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 8% p/v de SDS y 20% (v/v) de beta-mercaptol etanol). A continuación, la muestra se mezcla y se calienta durante 5 minutos a 95°C y se somete a ultrasonidos durante un minuto usando alta potencia en un baño de ultrasonidos Misonix 3000 con sonda "plate horn". A continuación, las

muestras se almacenan en hielo, o se almacenan a -80°C para una evaluación de la inhibición objetivo mediante Western blot. El lisado restante se utiliza para la determinación de la concentración de proteínas (Kit de ensayo de proteínas BCATM, Thermo Scientific). Cinco µg de cada lisado tumoral en tampón de muestra se aplican a 96 pocillos de gel Page (Invitrogen) y se someten a electroforesis según las instrucciones del fabricante. Las proteínas se transfieren a membrana Nitrocelulosa Protran BA83 (Whatman) según procedimientos bien conocidos en la técnica [Towbin et al, 1979]. A continuación, la membrana se procesa para medir la proteína Chk1 autofosforilada en serina 296. La membrana se enjuaga brevemente con agua, a continuación, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, NaCl 150 mM y 0,05% (v/v) de Tween 20 (TBST) y se sumerge durante una hora a 25°C en TBST/5% (p/v) de leche instantánea Carnation[®] reconstituida. A continuación, la membrana se lava cuatro veces con TBST durante cinco minutos. La membrana se sumerge a 4°C durante 16 horas en TBST/5% (p/v) de BSA en una dilución apropiada de anticuerpo de conejo anti-fosfoChk1 (serina 296) (Cell Signaling). A continuación, las membranas se lavan cuatro veces con TBST durante cinco minutos a 25°C y, a continuación, se sumergen a 25°C durante dos horas en TBST/5% de leche que contiene una dilución apropiada de anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP; Amersham) para detectar fosfo-Chk1 (ser 296). La membrana se lava de nuevo cuatro veces con TBST durante cinco minutos a 25°C. Los conjugados antígeno-anticuerpo-indicador inmovilizados en la membrana se detectan con el reactivo de detección Super Signal Western Femto HRP (Pierce) según las recomendaciones del fabricante.

Las señales se detectan y capturan usando el sistema de formación de imágenes FUJI LAS-4000. Las intensidades de la banda de fosfo-Chk1 (ser296) se calculan usando el software "Total Lab" (Nonlinear Dynamics). El porcentaje de inhibición de la autofosforilación de Chk1 inducida por gemcitabina se calcula usando la fórmula siguiente: % de inhibición = (intensidad de la banda de la muestra phosphoChk1 – intensidad de la banda de fosfoChk1 de control positivo (Max) de gemcitabina) / (intensidad promedio de la banda de fosfoChk1 (Min) del control negativo - intensidad promedio de la banda de fosfoChk1 (Max) de control positivo de gemcitabina) X 100.

El compuesto del Ejemplo 2 se mide en este ensayo para tener una dosis efectiva moduladora objetivo 50 (TMED50) para la autofosforilación de Chk1 de 0,03 mg/kg.

Modelos humanos de xenoinjerto tumoral

La capacidad de los inhibidores de Chk1 para llevar a cabo la eliminación del tumor puede ser determinada *in vivo* usando los modelos de eficacia de xenoinjerto de tumor de pulmón Calu-6 y de colon HT-29. Se cultivan células de cáncer de pulmón Calu-6 (ATCC) en medio de crecimiento (MEM con sales de Earle (Invitrogen) con L-glutamina (GibcoTM) suplementado con 10% (v/v) de FBS inactivado por calor (GibcoTM), 1 X MEM aminoácidos no esenciales (GibcoTM), 1 X piruvato de sodio (GibcoTM)) y se cultivan células de cáncer de colon HT-29 (ATCC) en medio de crecimiento, (medio 5A de McCoy (GibcoTM) suplementado con 10% de FBS (GibcoTM)) y se expanden. Las células se recogen y se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato y 5 x 10⁶ células (HT-29) o 1 x 10⁶ (células Calu-6) en medio de crecimiento (sin suero) se mezclan con un volumen igual de matriz BD MatrigelTM (BD Bioscience, Franklin, NJ), a continuación, se inyectan subcutáneamente en el flanco de ratones atímicos (CD-1 nu/nu, de Charles River Labs, Wilmington, MA). En aproximadamente el día 16 después del implante (150-200 mm³), se formula gemcitabina fresca en solución salina diariamente y se administra a los animales por vía intraperitoneal a una dosis de 60 mg/kg. Veinticuatro horas más tarde se administra a los animales el compuesto del Ejemplo 2, formulado en una relación molar de ácido metano sulfónico/20% de Captisol (CYDEX, Overland Park, KS) por vía intravenosa. Después de un día de descanso, la dosis se repite durante 3 ciclos adicionales (Q3Dx4 con compensación de inhibidor de Chk1 + 24 horas). Cada grupo de dosis consiste en nueve animales. La respuesta tumoral se determina mediante una medición del volumen del tumor realizada dos veces a la semana durante el curso del tratamiento. La inhibición del crecimiento del tumor (TGI) se calcula como el porcentaje de reducción en el tamaño medio del tumor de un grupo tratado con compuesto con respecto al tamaño medio del tumor del grupo de control tratado con vehículo. El compuesto del ejemplo 2 administrado solo y en combinación con gemcitabina demuestra excelente actividad antitumoral dependiente de la dosis en ambos modelos de xenoinjertos tumorales HT-29 y Calu-6, con hasta un aumento de seis veces en la inhibición del crecimiento tumoral con respecto a solo gemcitabina.

Eficacia de la dosificación de un agente individual

La capacidad de los inhibidores de Chk1 para llevar a cabo la eliminación del tumor puede ser determinada *in vivo* usando el modelo de eficacia de xenoinjerto de pulmón Calu-6. Se cultivan células de cáncer de pulmón Calu-6 (ATCC) tal como se ha descrito anteriormente. Las células se recogen y se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato y 1 x 10⁶ células (Calu-6) en medio de crecimiento (sin suero) se mezclan con un volumen igual de matriz BD MatrigelTM (BD Bioscience, Franklin, NJ), a continuación, se inyectan por vía subcutánea en el flanco de ratones atímicos (CD-1 nu/nu, de Charles River Labs, Wilmington, MA). En aproximadamente el día 16 después del implante (150-200 mm³), el compuesto del Ejemplo 2 se dosifica a 15 mg/kg (por vía subcutánea (SC), dos veces al día (BIDx5 descanso 2 días) x 3 ciclos. La respuesta tumoral se determina mediante una medición del volumen del tumor realizada dos veces por semana durante el curso del tratamiento. El compuesto del Ejemplo 2 dosificado en la planificación de 5 días BID (15 mg/kg) proporciona una inhibición de crecimiento superior a la planificación de combinación de

gemcitabina más el compuesto del Ejemplo 2 descrito anteriormente. La regresión completa del tumor es rápida y duradera.

Ensayo de proliferación monocapa y de citotoxicidad

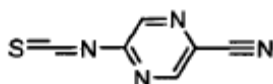
5 Una medida de la potencia de un inhibidor de Chk1 es su capacidad para inhibir la proliferación de células cancerosas en cultivo debido a la activación incontrolada origen de replicación. (Conti et al. Cell Cycle 6: 2760-2767, 2007). La determinación de la actividad antiproliferativa del inhibidor de Chk1 en líneas celulares derivadas de una amplia gama de tipos de tumores es indicativa de tipos de tumores que pueden ser clínicamente sensibles a la quimioterapia con inhibidores de Chk1. El siguiente ensayo de proliferación celular descrito se realiza en Oncotest, GmbH en Alemania. Treinta líneas células tumorales sólidas se derivan de 13 histotipos tumorales diferentes, cada uno representado por entre 1 a 6 líneas celulares diferentes (Oncotest, GmbH). Se establecen a partir de cáncer de vejiga, cerebro, colon, 10 estómago, hígado, pulmón, mama, ovario, páncreas, riñón y cuerpo del útero, así como de melanoma y pleuramesotelioma. Todas las líneas celulares se establecen a partir de xenoinjertos tumorales Oncotest derivados de pacientes (Roth et al. 1999). El origen de los xenoinjertos de donantes es descrito por Fiebig et al. (Fieberg et al. 1992 y 1999). Las líneas celulares se pasan rutinariamente una o dos veces por semana y se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 20 pasos. Todas las células se cultivan a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 (PAA, Cölbe, Alemania) suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (PAA, Cölbe, Alemania) y 0,1 mg/ml de gentamicina (PAA, Cölbe, Alemania). Se usa un ensayo modificado de yoduro de propidio para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos contra estas líneas celulares. Brevemente, las células adherentes se recogen de cultivos en fase exponencial mediante tripsinización, se realiza un recuento y se siembran en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos a una densidad celular dependiendo de la línea celular (de 4.000 a 20.000 células/pocillo). Después de un período de recuperación de 24 horas para permitir que las células se adhieran y para reanudar el crecimiento exponencial, se añaden 10 µl de medio de cultivo (6 pocillos de control/placa) o de medio de cultivo que contiene el compuesto del Ejemplo 2. Se preparan soluciones madre del compuesto del Ejemplo 2 en DMSO a una concentración de 1 mM. Se realizan diluciones posteriores con medio RPMI 1640 de cultivo celular completo como se indica a continuación: en primer lugar, la solución madre de DMSO se diluye 1:22 (que contiene 4,5% (v/v) de DMSO). Usando esta solución, se realizan diluciones en serie (semilog o dilución doble) en medio de cultivo celular. Para la etapa de dilución final (1:15), se añaden 10 µl/pocillo de la solución de compuesto final respectiva directamente a 140 µl/pocillo de medio de cultivo. La concentración final de DMSO es ≤0,3% (v/v). El compuesto del Ejemplo 2 se aplica por triplicado en una curva de concentración de diez puntos y el tratamiento se continuó durante 4 días. Después de 4 días de tratamiento, el medio de cultivo se elimina y se sustituye por 200 µl de una solución acuosa de PI de 7 µg/ml. Para medir el número de células vitales, las células se permeabilizaron mediante congelación, resultando en la muerte de todas las células que habían permanecido unidas al pocillo después del tratamiento con el compuesto. Por último, la fluorescencia PI se mide usando el lector de placas Cytofluor 4000 (excitación λ = 530 nm, emisión λ = 620 nm) para determinar el número total de células viables. La inhibición del crecimiento se expresa como valores Ensayo/Control X 100 (% T/C). En base a los valores T/C, los valores IC₅₀ relativos se determinan usando regresión no lineal (log [conc. de inhibidor] versus respuesta (%T/C)). El compuesto del Ejemplo 2 inhibe el crecimiento de la mayoría de estas líneas de células tumorales con una EC₅₀ menor de 20 nM, lo que sugiere el potencial de una amplia actividad anticancerígena como agente individual.

40 Las siguientes Preparaciones y Ejemplos se proporcionan para ilustrar más detalladamente la invención y representan síntesis típicas del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal. Los nombres de los compuestos de la presente invención son proporcionados generalmente por ChemDraw Ultra[®] 10.0 u 11.0, a menos que se indique lo contrario.

Ruta A

Preparación 1

45 5-isotiocianatopirazina-2-carbonitrilo

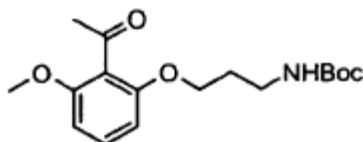


50 Una solución de tiosfogeno (1,86 g, 15 mmol) en THF (4 ml) se añade gota a gota a una solución de 5-aminopirazina-2-carbonitrilo (1,20 g, 10 mmol) y piridina (2 ml) en CH₂Cl₂ (200 ml) y THF (25 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se concentra y el producto bruto se diluye con acetato de etilo, se filtra y se concentra para obtener el compuesto del título.

Preparación 2

3-(2-acetil-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo

5



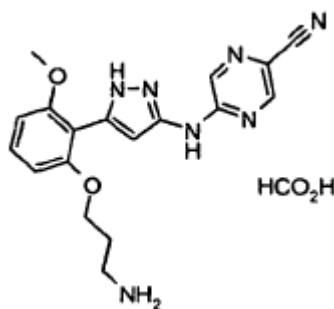
Se añade azodicarboxilato de diisopropilo (2,82 g, 14,0 mmol) a una solución agitada de 3-hidroxi-propilcarbamato de tert-butilo (2,45 g, 14,0 mmol), 1-(2-hidroxi-6-metoxifenil) etanona (1,94 g, 11,7 mmol) y trifenilfosfina (3,66 g, 14,0 mmol) en THF (50 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, el disolvente se elimina a presión reducida y el producto crudo se cromatografía (hexano-acetato de etilo: gradiente 0-60%) para obtener 1,60 g del compuesto del título.

10

Ejemplo 1

Sal de ácido fórmico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo

15



20

Se añade lentamente una solución 1 M de hexametil disilazano de litio en THF (7,6 ml, 7,6 mmol) a una solución agitada de 3-(2-acetil-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo (1,08 g, 3,17 mmol) en THF seco (25 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 10 minutos, se añade 5-isotiocianatopirazina-2-carbonitrilo (0,510 g, 3,17 mmol) en THF (4 ml) y la agitación se continúa durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentra, y se vuelve a disolver en etanol (50 ml) y ácido acético (5 ml), seguido de la adición de hidrato de hidrazina (2 ml). A continuación, la mezcla de reacción resultante se calienta a 120°C durante 2 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se diluye con agua (100 ml) y se extrae con acetato de etilo (2 x 100 ml). La parte orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra. El producto crudo se vuelve a disolver en diclorometano (50 ml) y se trata con ácido trifluoroacético (10 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se elimina el disolvente y el producto crudo (1,20 g) se purifica usando HPLC preparativa para obtener 0,046 g del compuesto del título. LC-ES/MS m/z 366,1 [M+H]⁺.

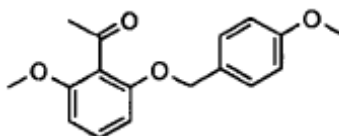
25

30

Ruta B**Preparación 3**

1-[2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil] etanona

35

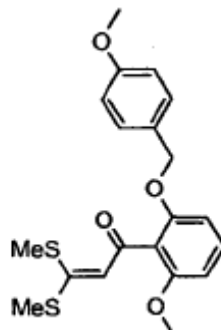


Se carga un matraz con 1-(2-hidroxi-6-metoxifenil) etanona (30 g, 180,5 mmol), carbonato de potasio, (49,9 g, 361 mmol), yoduro de sodio (2,68 g, 18,1 mmol) y cloruro de 4-metoxibencilo (27,0 ml, 198,6 mmol) en THF y la mezcla se calienta a reflujo durante la noche. La mezcla se enfría a temperatura ambiente, se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO₄ anhidro, se filtran y se concentran. El producto crudo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice con un eluyente de acetato de etilo/hexanos para obtener 32,51 g (57%) del producto deseado como un sólido blanco.

40

Preparación 4

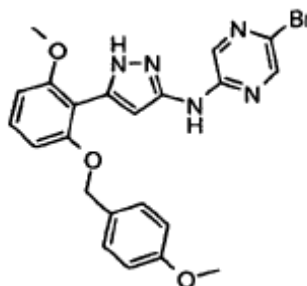
1-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil)-3,3-bis(metiltio)prop-2-en-1-ona



Un matraz de fondo redondo de 500 ml se carga con 95% de NaH (7,28 g, 288 mmol) y se añade DMSO seco (170 ml). A la mezcla heterogénea resultante se añade gota a gota, 1-[2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil]etanona (41,2 g, 144 mmol) en DMSO seco (60 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 minutos, momento en el que se añade gota a gota disulfuro de carbono (8,69 ml, 144 mmol), seguido inmediatamente por yoduro de metilo (18,0 ml, 288 mmol). Se desarrolla calor y gas durante la adición de ambos reactivos, lo que incita a una adición cuidadosa. La solución homogénea se agita durante 18 horas a temperatura ambiente y, a continuación, se vierte lentamente en tres volúmenes de agua. El producto sólido se filtra y se seca a alto vacío para obtener el compuesto del título en forma de un sólido naranja.

Preparación 5

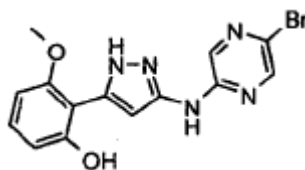
5-bromo-N-(5-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1H-pirazol-3-il)pirazin-2-amina



Se disuelve 5-bromopirazin-2-amina (3,73 g, 21,4 mmol) en THF (30 ml) y se enfría a -78°C . Se añade lentamente una solución de n-butil-litio en hexano (10,32 ml, 23,5 mmol). La mezcla de reacción se agita a baja temperatura durante 15 minutos y, a continuación, se calienta lentamente a temperatura ambiente y se agita durante una hora adicional. La mezcla se vuelve a enfriar a 0°C y se añade una solución de 1-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil)-3,3-bis(metiltio)prop-2-en-1-ona (8,39 g, 21,4 mmol) en THF (50 ml) mediante una cánula. La solución se vuelve homogénea y se agita 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser calentada a reflujo durante 10 horas. A continuación, la solución se enfría a temperatura ambiente y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo sólido se disuelve en EtOH (150 ml) y se añade ácido acético glacial (1,3 ml, 23,5 mmol). Se añade hidrato de hidrazina (5,25 ml, 107 mmol) y la solución se somete a reflujo durante 8 horas adicionales. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se concentra en vacío. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para obtener 5,76 g (74%) de un sólido de color marrón.

Preparación 6

2-(3-(5-bromopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenol



- 5 Se disuelve 5-bromo-N-(5-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1H-pirazol-3-il)pirazin-2-amina (3,1 g, 6,43 mmol) en MeOH (100 ml). Se burbujea gas HCl a través de la mezcla de reacción durante 20 minutos. La mezcla se agita durante 2 horas y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se vuelve a disolver en 3:1 cloroformo/isopropanol (100 ml) y se combina con solución saturada de NaHCO₃ (100 ml). Las capas se separan y la capa acuosa se extrae con acetato de etilo (3 x 50 ml).
- 10 Las capas orgánicas combinadas se concentran y se trituran con metanol para obtener 1,5 g (64%) de un sólido de color marrón.

Preparación 7

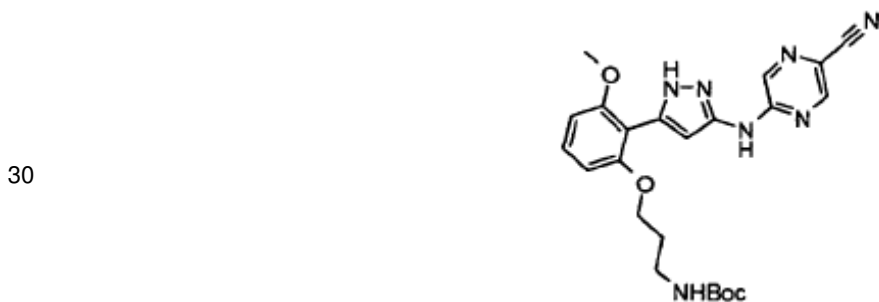
3-(2-(3-(5-bromopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo



- 20 Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (1,73 ml, 8,76 mmol) a una solución agitada de 3-hidroxilpropilcarbamato de tert-butilo (0,83 ml, 4,83 mmol), 2-(3-(5-bromopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxi-fenol (1,59 g, 4,38 mmol) y trifenilfosfina poliestireno (5,91 g, 8,76 mmol) en THF (50 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 45 minutos, la reacción se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo resultante se cromatografía (metanol/CH₂Cl₂) para obtener 1,27 g (54%) de un sólido de color amarillo.

Preparación 8

3-(2-(3-(5-cianopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo



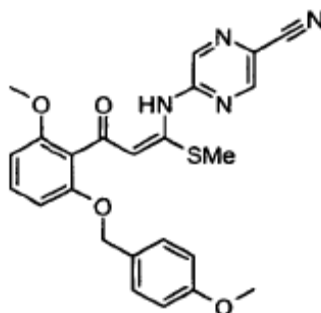
- 35 Una solución de 3-(2-(3-(5-bromopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de de tert-butilo (0,378 g, 0,730 mmol) y cianuro de cinc (0,10 g, 0,870 mmol) en DMF (10 ml) se desgasifica con una corriente de nitrógeno durante una hora y a continuación se calienta a 80°C. A la reacción se le añade Pd(Ph₃P)₄ (0,080 g, 0,070 mmol), y la mezcla se calienta durante la noche. La reacción se enfría a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH) para obtener 0,251 g (73%) del compuesto del título.

40 Ruta C

Preparación 9

(E)-5-(3-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1-(metiltio)-3-oxoprop-1-enilamino)pirazina-2-carbonitrilo

5

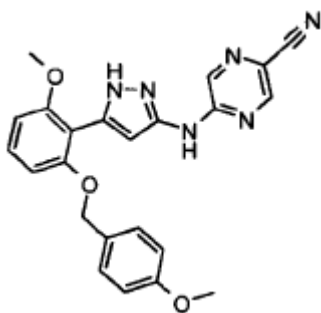


Un matraz de 5 litros con cuello con brida, equipado con un varilla agitadora de aire y paleta, termómetro, condensador de agua y burbujeador de nitrógeno se carga con hidruro sódico (22,4 g, 560,1 mmol) y THF anhidro (3 l). A la mezcla bien agitada se añade 2-amino-5-cianopirazina (67,0 g, 557,8 mmol) en porciones durante 1,5 horas mientras se permite la formación de espuma. La temperatura interna se mantiene a 22°C. La mezcla se agita durante 35 minutos. A continuación, se añade 1-(2-metoxi-6-(4-metoxi-benciloxi)-fenil)-3,3-bis-metilsulfanil-propenona (146,0 g, 373,9 mmol) a 22°C durante una hora. La suspensión amarilla se agita durante 45 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se aplica calor hasta que la reacción es sometida a un reflujo suave. Después de 19 horas a 65°C, la mezcla de reacción se enfría a 15°C. A continuación, la mezcla se divide en dos mitades y cada lote se inactiva en agua (2 l) y se extrae con acetato de etilo (2 x 1 l). Los extractos orgánicos se combinan y se lavan con salmuera, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se concentran a presión reducida a 40°C para obtener 196 g de un sólido de color amarillo/naranja que se usa en la etapa siguiente sin purificación adicional. LC-ES/MS m/z 463,2 [M+H]⁺.

Preparación 10

5-(5-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo

25

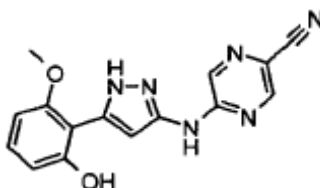


Un matraz de cuello con brida de 10 l, equipado con una varilla agitadora de aire y paleta, termómetro, condensador de agua y burbujeador de nitrógeno, se carga con (E)-5-(3-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1-(metiltio)-3-oxoprop-1-enilamino)pirazina-2-carbonitrilo (196 g, 423,8 mmol) y etanol absoluto (3 l). A la suspensión agitada en atmósfera de nitrógeno se añade hidrato de hidrazina (41,0 ml, 838,7 mmol) y ácido acético glacial (66,0 ml, 1,15 moles). Se observa una pequeña reacción exotérmica. La suspensión amarilla se calienta hasta 65°C. A continuación, el calentamiento se interrumpe y la mezcla de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se deja reposar durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. El sólido se recoge mediante filtración, se lava con etanol fresco, y se seca en vacío a 45°C para obtener 140 g (87% de rendimiento para las dos etapas) de un sólido amarillo brillante. El producto se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-ES/MS m/z 429,2 [M+H]⁺.

Preparación 11

5-(5-(2-hidroxi-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo

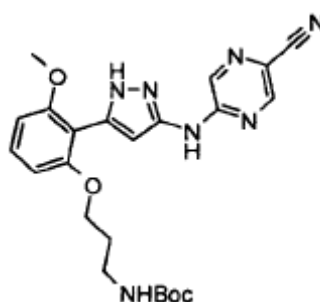
40



Un matraz con cuello con brida de 10 l equipado con una varilla agitadora de aire y paleta, termómetro, condensador de agua y la salida a depuradores de gas de solución de sosa cáustica se carga con 5-(5-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo (140 g, 326,76 mmol) y solución de cloruro de hidrógeno 4 N (2.500 ml, 10,0 moles) en 1,4-dioxano. La mezcla se agita bien a 60-65°C durante 1,5 horas, a continuación, la mezcla se deja enfriar a 50°C. Después de un total de 4 horas, se añade más cloruro de hidrógeno 4 N en 1,4-dioxano (1.000 ml) y se reanuda el calentamiento a 65°C. Después de una hora a esta temperatura, el calentamiento se detiene y la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente durante la noche con agitación. La mezcla se filtra a través de un embudo grande sinterizado. El sólido recogido se lava con 1,4-dioxano fresco y, a continuación, se seca brevemente. La torta de filtro se devuelve al matraz de 10 l y se agita vigorosamente con agua (2 l) y acetato de etilo (3,5 l). A continuación, la mezcla se convierte en alcalina mediante la adición de amoníaco concentrado (440 ml). La solución se filtra y, a continuación, se transfiere a un embudo separador de 5 l. La capa acuosa se separa y se extrae de nuevo con acetato de etilo (0,5 l). Las capas orgánicas combinadas se lavan con salmuera, se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran. El sólido se seca en vacío a 45°C para obtener 101,3 g. El producto crudo se suspende en tetrahidrofurano anhidro caliente (2,2 l) y se carga sobre un lecho de sílice (1 kg) empacado en húmedo usando iso-hexano. El producto se eluye con acetato de etilo. Las fracciones combinadas se concentran parcialmente y el precipitado resultante se recogen mediante filtración y se secan en vacío a 40°C durante la noche para obtener 60,9 g. LC-ES/MS m/z 309,2 [M+1]⁺.

Preparación 12

3-(2-(3-(5-cianopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo

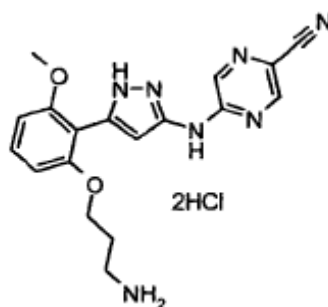


Un matraz de fondo redondo de cuello con brida de 5 l brida equipado con una varilla agitadora de aire y una paleta, termómetro, embudo de goteo igualador de presión y burbujeador de nitrógeno, se carga con 5-(5-(2-hidroxi-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo (47,0 g, 152 mmol) y THF anhidro (1,2 l). La suspensión se agita en atmósfera de nitrógeno, se enfría a 0°C. Un matraz de 3 cuellos, de fondo redondo, de 2 L, equipado con una gran varilla de agitación magnética, termómetro y burbujeador de nitrógeno, se carga con trifetilfosfina (44,0 g; 168 mmol) y THF anhidro (600 ml). La solución se agita en atmósfera de nitrógeno, se enfría a 0°C y se añade diisopropilazodicarboxilato (34,2 g; 169 mmol) y se forma una solución lechosa. Después de 3-4 minutos, se añade una solución de 7-butil-N-(3-hidroxiopropil)-carbamato (30,3 g, 173 mmol) en THF anhidro (100 ml) y la mezcla se agita durante 3-4 minutos. A continuación, esta mezcla se añade durante 5 minutos a la suspensión agitada del material de partida en 0°C. La mezcla de reacción se convierte rápidamente en una solución de color oscuro y se deja calentar lentamente hasta temperatura ambiente. Después de 6,5 horas, se preparan más reactivos, tal como se ha explicado anteriormente, usando PPh₃ (8 g), DIAD (6,2 g) y carbamato (5,4 g) en THF anhidro (150 ml). La mezcla se añade a la mezcla de reacción, se enfría a -5°C y se deja calentar hasta temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se elimina en vacío. La solución viscosa resultante se carga en una almohadilla de sílice y el producto se eluye con acetato de etilo. Las fracciones concentradas se trituran por separado con metanol y los sólidos resultantes se recogen mediante filtración. Los sólidos combinados se trituran de nuevo con metanol (400 ml) y, a continuación, se aíslan mediante filtración y se secan en vacío a 50°C durante la noche para obtener 31,3 g del producto deseado. LC-ES/MS m/z 466,2 [M+1]⁺.

Ejemplo 2

Sal de cloruro de dihidrógeno de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo

5



10

15

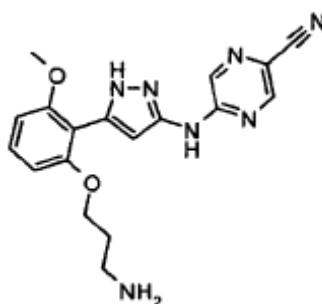
Un matraz de cuello con brida, de 5 l, equipado con una varilla agitadora de aire y una paleta, termómetro, y condensador de aire con burbujeador adjunto, se carga con 3-(2-(3-(5-cianopirazin-2-ylamino)-1H-pirazol-5-yl)-3-metoxifenil)propilcarbamato de tert-butilo (30,9 g, 66,3 mmol) y acetato de etilo (3 l). La suspensión de color amarillo agitada mecánicamente se enfría a una temperatura justo por debajo de 10°C. A continuación, se hace burbujear vigorosamente cloruro de hidrógeno desde una botella de lectura a través de un tubo de entrada de gas durante 15 minutos con el baño de hielo todavía en su lugar. Después de 5 horas, la apariencia de la mezcla se espesa notablemente. El sólido se recoge mediante filtración, se lava con acetato de etilo y, a continuación, se seca en vacío a 60°C durante la noche para obtener 30,0 g. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2,05 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 4,12 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 6,08 (br s, 3H), 6,777 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 6,782 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 6,88 (br s, 1H), 7,34 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 8,09 (s, 1H), 8,55 (br s, 1H), 8,71 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 12,43 (br s, 1H). LC-ES/MS m/z 366,2 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 3

20

5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ylamino)pirazina-2-carbonitrilo

25



30

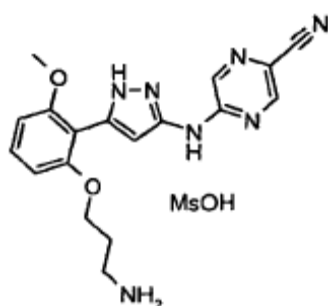
Se suspende sal de cloruro de diácido de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ylamino)pirazina-2-carbonitrilo (3,0 g, 6,84 mmol) en 200 ml de CH_2Cl_2 . Se añade 1 N NaOH (200 ml, 200 mmol). La mezcla se agita magnéticamente en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 5 horas. El sólido se recoge mediante filtración y se lava a fondo con agua. La torta del filtro se seca en vacío a 50°C durante la noche para obtener 2,26 g (90%) de la base libre como un sólido amarillo. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,81 (m, 2H), 2,73 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 4,09 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 6,76 (t, J = 8,2 Hz, 2H), 6,93 (br s, 1H), 7,31 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 8,52 (br s, 1H), 8,67 (s, 1H). LC-MS/ES m/z 366,2 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 4

35

Sal de ácido metanosulfónico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ylamino)pirazina-2-carbonitrilo

40

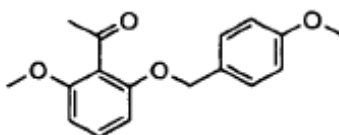


Se suspende 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo (1,0 g, 2,74 mmol) en MeOH (100 ml). Una solución 1 M de ácido metanosulfónico en MeOH (2,74 ml, 2,74 mmol) se añade a la mezcla gota a gota con agitación. El sólido se disuelve casi por completo y se somete a ultrasonidos y se agita durante 15 minutos, se filtra y se concentra hasta 50 ml. La solución se enfría durante la noche a -15°C y el sólido que se forma se recoge mediante filtración. El sólido se seca en un horno de vacío durante la noche para obtener 0,938 g (74%) de un sólido de color amarillo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,97 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,95 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 4,09 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 6,753 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,766 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,85 (br s, 1H), 7,33 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 7,67 (br s, 3H), 8,49 (br s, 1H), 8,64 (s, 1H), 10,70 (s, 1H), 12,31 (s, 1H). LC-ES/MS m/z 366,2 [M+1]⁺.

Ruta D

10 Preparación 13

1-[2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil] etanona

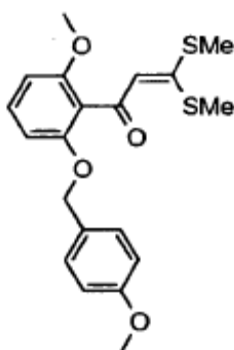


15

Se añaden 1-(2-hidroxi-6-metoxifenil) etanona (1.300 g, 7,82 mol) y dimetilformamida (10,4 l) a un matraz de 22 l y se agita para obtener una solución. Se añade carbonato de potasio (2.700 g, 19,54 mol) en porciones, a continuación se agita durante al menos 30 minutos. Usando un embudo de adición, se añade, gota a gota, cloruro de 4-metoxibencilo (14.700 g, 9,39 mol) durante 2,5 horas a la mezcla mientras se mantiene la temperatura < 30°C. La mezcla de reacción se calienta a 35°C y esta temperatura se mantiene durante 12 horas. La conversión de la reacción se supervisa mediante HPLC y se considera completa después de 13 horas a 35°C. La suspensión se filtra y los sólidos resultantes se lava con dimetilformamida (1 l). Un tratamiento de extracción del filtrado con acetato de etilo y agua, seguido por concentración, proporcionó un sólido amarillo ceroso. Al sólido ceroso amarillo se añade metil t-butil éter (2,6 l). Se agita la suspensión resultante. La suspensión que fluye libremente se filtra y se lava con metil t-butil éter (1 l). El sólido blanco se seca en vacío obteniéndose 1.539 gramos (69%) del compuesto del título, pf 105 a 107°C.

Preparación 14

1-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil)-3,3-bis (metiltio) prop-2-en-1-ona



30

35

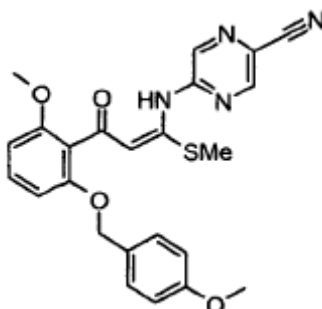
A una mezcla de tert-butoxido de litio (602,4 g, 7,52 mol) en DMSO anhidro (11,0 l) bajo una atmósfera de nitrógeno, se añade 1-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil) etanona (1.000,0 g, 3,49 mol). La mezcla resultante se agita durante 30 minutos y se añade CS₂ (259 ml, 4,296 mol) lentamente durante 1 a 1,5 horas mientras se mantiene la temperatura interna por debajo de 30°C. Después de agitar durante al menos una hora a temperatura ambiente, se añade yodometano (1.000 g, 7,045 mol) lentamente manteniendo la temperatura interna por debajo de 30°C. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante entre 30 minutos y una hora. La finalización de la reacción se confirma mediante HPLC. La mezcla de reacción resultante se enfría, seguido por un trabajo de extracción con agua y acetato de etilo. La porción orgánica resultante se concentra para proporcionar una suspensión que se filtra y se lava con acetato de etilo (1 l), seguido de metil t-butil éter (2 x 1 l). El sólido aislado se seca a 40°C en un horno de vacío para obtener 1.057 g (77%) del compuesto del título, pf 93 a 94°C; ES/MS m/z 391,2 [M+1]⁺.

45

Preparación 15

(E)-5-(3-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1-(metiltio)-3-oxoprop-1-enilamino)pirazina-2-carbonitrilo

5



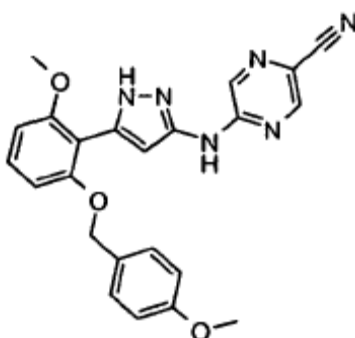
10 A un matraz de 22 l, seco, inerte, se añade hidruro de sodio (159,2 g, 3,98 mol) y tetrahidrofurano (10,4 l). La mezcla se enfría a 5-15°C. Se añade 5-isocianopirazin-2-amina (382,2 g, 3,18 mol) en cuatro porciones durante 30 minutos para controlar la liberación de hidrógeno, lo que permite la disminución de la formación de espuma entre las adiciones y mantener la temperatura a 10°C. La mezcla se agita durante 15 - 90 minutos mientras que se permite que la temperatura aumente a 15°C. A la mezcla de reacción se carga con 1-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil)-3,3-bis (metiltio)prop-2-en-1-ona (1.036 g, 2,65 mol) en porciones para controlar la formación de espuma. La suspensión resultante se agita durante 15 minutos. La mezcla se calienta a reflujo suave a 66°C. La conversión de la reacción se controla mediante HPLC. La mezcla de reacción se inactiva en agua fría (14,2 l) seguido de tratamiento de extracción con acetato de etilo. La porción orgánica se concentra para formar una suspensión que se filtra para proporcionar 957 g (78%) del compuesto del título, pf 128 a 135°C; ES/MS m/z 463,2

15

Preparación 16

20 5-(5-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi)fenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo

25



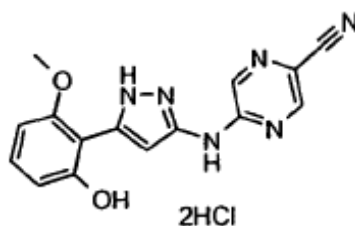
30 En un recipiente de 20 l se combinan etanol (1,28 l) y ácido acético (318 ml, 5,545 mol). La reacción se ventila a un depurador de blanqueado con una purga de nitrógeno. Se añaden (E)-5-(3-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil)-1-(metiltio)-3-oxoprop-1-enilamino)pirazina-2-carbonitrilo (940 g, 1,931 mol) y la solución de etanol/ácido acético a un matraz de reacción de 22 l. A la suspensión marrón resultante se añade monohidrato de hidrazina (197 g, 3,935 mol), resultando en una ligera exotermia. La suspensión amarilla resultante se calienta lentamente a 65-70°C y se supervisa mediante HPLC. La duración de la reacción es inferior a una hora. La suspensión espesa se enfría lentamente durante 1-2 horas a menos de 30°C. La suspensión se filtra y se lava con etanol frío. El material se seca en vacío a 40°C obteniendo (820 g, 99,1%) del compuesto del título, pf 215 a 117°C; ES/MS m/z 429,2 [M+1]⁺.

35

Preparación 17

Sal de cloruro de dihidrógeno de 5-(5-(2-hidroxi-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo

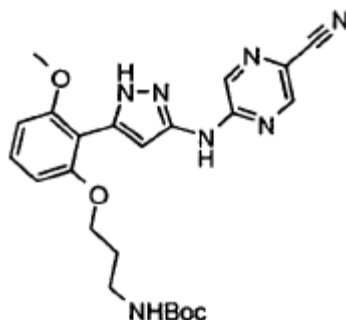
40



Todas las operaciones descritas a continuación se ventilan a un sistema depurador cáustico para controlar la formación de gas HCl. Se cargan 5-(5-(2-metoxi-6-(4-metoxibenciloxi) fenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo (1,24 kg, 2,89 mol) y 4 N HCl en dioxano (26,06 kg, 99,28 mol) en un reactor de vidrio de 60 l. La suspensión se calienta lentamente a 60-70°C. La reacción se supervisa mediante HPLC. Después de 9 horas, la reacción se determina como completada. La suspensión marrón se enfría a 20°C y se mantiene durante toda la noche. La mezcla de reacción ácida se filtra y la torta se lava con acetato de etilo (7 l). La torta húmeda se seca en vacío hasta peso constante para proporcionar (1.010 g, 91,84% rendimiento corregido) del compuesto del título, pf 225 a 228°C (base libre); ES/MS m/z 309,2 [M+1]⁺.

Preparación 18

3-(2-(3-(5-cianopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo



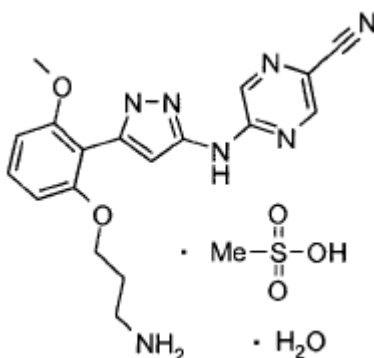
Se suspende 5-(5-(2-hidroxi-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo (618 g, 1,62 mol) en tetrahidrofurano (6,18 l, 10 volúmenes) y se enfría a -5-0°C con un baño de acetona/hielo. Se añade trietilamina (330 g, 3,25 mol) a través de un embudo de adición durante 30-40 minutos a entre -5 y 5°C. La suspensión resultante se agita a entre -5 y 5°C durante 60-90 minutos. El clorhidrato de trietilamina insoluble se filtra y la solución de fenol ((5-(2-hidroxi-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo) se recoge en un recipiente de reacción adecuado. La torta se lava con THF (1,24 l). La solución de THF del fenol se mantiene a entre 15 y 20°C hasta que se necesite.

Se disuelve trifetilfosfina (1.074 g, 4,05 mol) a temperatura ambiente en THF (4,33 l). La solución incolora transparente se enfría con un baño de acetona/hielo a entre -5 y 5°C. Se añade, gota a gota, isopropilazodicarboxilato (795 g, 3,89 mol) a través de un embudo de adición durante 40-60 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. La suspensión espesa, blanca resultante se enfría de nuevo a entre -5 y 0°C. Se disuelve e-hidroxipropilcarbamato de tert-butilo (717g, 4,05 moles) en un mínimo de THF (800 ml). La solución 3-hidroxipropilcarbamato de tert-butilo/THF se añade, a través de un embudo de adición, durante 20 a 30 minutos a entre -5 y 5°C a la suspensión de reactivo. El reactivo preparado se agita en el baño de hielo a entre -5 y 0°C hasta que esté listo para su uso.

La suspensión de reactivo preparada (20%) se añade a la solución de sustrato a entre 15 y 20°C. El reactivo restante se devuelve al baño de hielo. La solución de sustrato se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos, a continuación, se toman muestras para HPLC. Una segunda porción de aproximadamente el 20% del reactivo se añade al sustrato, se agita a temperatura ambiente y se toman muestras como antes. La adición del reactivo continúa con la supervisión de la finalización de la reacción mediante HPLC. La reacción completada se concentra y se tritura con metanol caliente (4,33 l, 50-60°C), seguido por enfriamiento en un baño de hielo. El precipitado amarillo resultante se filtra, se enjuaga con MeOH frío (2 l), y se seca hasta peso constante para obtener 544 g (72%) del compuesto del título, pf 214 a 216°C; ES/MS m/z 466,2 [M+1]⁺.

Ejemplo 5

2-pirazinacarbonitrilo, 5-[[5-[-[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il] amino] monomesilato monohidrato (nomenclatura Chemical Abstracts)



5

10

15

Se suspende 3-(2-(3-(5-cianopirazin-2-ilamino)-1H-pirazol-5-il)-3-metoxifenoxi) propilcarbamato de tert-butilo (1.430 g, 3,07 mol) con acetona (21,5 l) en un reactor de 30 l. Se añade ácido metanosulfónico (1.484 g, 15,36 mol) a través de un embudo de adición en una corriente moderada. La suspensión se calienta a reflujo a aproximadamente 52°C durante 1 a 3 horas y la finalización de la reacción se supervisa mediante análisis por HPLC. La reacción completada se enfría de reflujo a entre 15 y 20°C durante 4,5 horas. La suspensión de color amarillo de sal de 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il] amino]dimesilato de 2-pirazinacarbonitrilo se filtra, se enjuaga con acetona (7 l) y se seca en un horno de vacío.

20

La sal de dimesilato, (1.608 g, 2,88 mol) se suspende en agua (16 l). Se vierte, lentamente, hidróxido de sodio (solución acuosa al 50%, 228 g, 2,85 mol) en la suspensión. La suspensión se calienta a 60°C y se agita durante una hora. A continuación, se enfría a 16°C durante 4 horas y se filtra. La torta de filtro húmeda se lava con acetona (4 l) y se seca hasta peso constante en un horno de vacío a 40°C para obtener 833 g (94%) de 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il]amino] monomesilato monohidrato de 2-pirazinacarbonitrilo. pf 222,6°C; ES/MS m/z 366,2 [M+1]⁺.

Ejemplo 5a

5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il] amino] monomesilato monohidrato de 2-pirazinacarbonitrilo (nomenclatura Chemical Abstracts)

25

El 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il] amino] monomesilato monohidrato de 2-pirazinacarbonitrilo crudo se purifica usando el procedimiento siguiente. El 5-[[5-[[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il] amino] monomesilato monohidrato de 2-pirazinacarbonitrilo de grado técnico (1.221 g, 2,55 mol) se suspende en una mezcla disolvente de 1:1 acetona/agua (14,7 l). El sólido se disuelve calentando la mezcla a 50-55°C. La solución se filtra a 50-55°C a través de un cartucho de filtro de 0,22 µ. La solución se enfría lentamente a la temperatura de siembra de aproximadamente 42 a 45°C y se siembra. El enfriamiento lento continúa durante los siguientes 30 a 60 minutos para confirmar la nucleación. La suspensión fina se enfría desde 38 hasta 15°C durante 3 horas. Se establece una destilación en vacío y se elimina la acetona a 110-90 mm y 20-30°C. La mezcla se enfría desde 30 hasta 15°C durante 14 horas, se mantiene a 15°C durante 2 horas y, a continuación, se filtra. El material recristalizado se enjuaga con 19:1 de agua/acetona (2 l) y, a continuación, agua (6 l) y se seca hasta peso constante en un horno de vacío a 40°C para obtener 1.024 g (83,9%) del compuesto del título, pf 222,6°C; ES/MS m/z 366,2 [M+1]⁺.

35

Pueden obtenerse patrones de difracción rayos X en polvo (XRPD) en un difractómetro de polvo Bruker D8 Advance, equipado con una fuente CuKα (λ = 1.54056 angstrom) que opera a 40 kV y 40 mA con un detector sensible a la posición. Cada muestra se escanea entre 4° y 35° en 2θ ± 0,02 usando un tamaño de paso de 0,026° en 2θ ± 0,02 y un tiempo de paso de 0,3 segundos, con una rendija de divergencia de 0,6 mm y una rendija de detector de 10,39 mm. Cada rendija Soller primaria y secundaria está en 2°; la rendija anti-divergencia es 6,17 mm, el dissipador de dispersión de aire está en su lugar.

40

Posiciones de pico e intensidades relativas características:

Nº Pico	°2θ	I/I ₀
1	8,42	22,8
2	12,64	85
3	13,16	36,7

ES 2 401 558 T3

(Cont.)

4	16,86	43,7
5	21,05	44,4
6	21,25	64,3
7	21,63	42,6
8	24,11	40,6
9	24,69	30,1
10	25,02	43,1
11	25,4	30,3
12	26,15	100
13	29,24	26,2

5

Puede llevarse a cabo un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en una unidad de Mettler-Toledo DSC (Modelo DSC822e). Las muestras se calientan en recipientes de aluminio cerrados con orificio entre 25 y 350°C a 10°C/min con una purga de nitrógeno de 50 ml/min. Puede llevarse a cabo un análisis termogravimétrico (TGA) en una unidad de Mettler Toledo TGA (Modelo TGA/SDTA 851e). Las muestras se calientan en recipientes de aluminio sellados con un pequeño orificio entre 25 y 350°C a 10°C/min con una purga de nitrógeno de 50 ml/min.

El perfil térmico DSC muestra de una amplia endoterma débil de 80 a 140°C seguido por una endoterma de fusión definida a 222°C, aparición (225°C, pico). Se observa una pérdida de masa del 4% mediante TGA de 25-140°C.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal.
- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, que es 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Compuesto según la reivindicación 1, que es 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo.
4. Compuesto según la reivindicación 1, que es sal de ácido fórmico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo.
- 10 5. Compuesto según la reivindicación 1, que es sal de cloruro de diácido de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo.
6. Compuesto según la reivindicación 1, que es sal de ácido metanosulfónico de 5-(5-(2-(3-aminopropoxi)-6-metoxifenil)-1H-pirazol-3-ilamino)pirazina-2-carbonitrilo.
- 15 7. Compuesto según la reivindicación 1, que es 5-[[5-[-[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il]amino]monohidrato monomesilato de 2-pirazinacarbonitrilo.
8. Compuesto según la reivindicación 1, que es 5-[[5-[-[2-(3-aminopropil)-6-metoxifenil]-1H-pirazol-3-il]amino]monohidrato monomesilato de 2-pirazinacarbonitrilo en forma cristalina **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene picos en $2\theta \pm 0,02 = 12,64, 21,25$ y $26,15$.
- 20 9. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en terapia.
11. Compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en el tratamiento del cáncer.
12. Compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en una combinación simultánea, separada o secuencial con radiación ionizante en el tratamiento del cáncer.
- 25 13. Compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en una combinación simultánea, separada o secuencial con un agente de quimioterapia en el tratamiento del cáncer.
14. Compuesto o sal para su uso según la reivindicación 13, en el que el agente quimioterapéutico está seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, hidroxurea, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, doxorubicina, etopósido, cisplatino y taxol.
- 30 15. Compuesto o sal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que el cáncer está seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, mesotelioma, cáncer renal, y cáncer uterino.