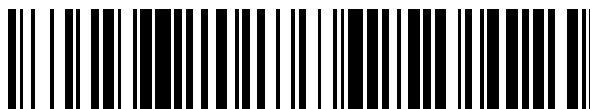


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 414**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/4995 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2011** **E 11788263 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 2638033**

54 Título: **Compuestos útiles para inhibir Chk1**

30 Prioridad:

08.11.2010 US 411137 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JOSEPH, SAJAN y
SAMAJDAR, SUSANTA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 414 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 inhibir Chk1.

5 Campo de la invención

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

- 10 Chk1 es una proteína quinasa que se extiende aguas debajo de Atm y/o Atr en el mecanismo de transducción de señal del punto de control de daño sobre ADN. En las células de mamíferos, Chk1 experimenta fosforilación en respuesta a agentes que provocan daño sobre ADN incluyendo la radiación ionizante (IR), luz ultravioleta (UV) e hidroxidurea. Esta fosforilación que activa Chk1 en las células de mamíferos depende de Atr. Chk1 juega un papel en el punto de control de daño sobre ADN que depende de Atr que conduce a una detención en la fase S y en G2M.
- 15 Chk1 experimenta fosforilación e inactiva Cdc25A, la fosfatasa de especificidad dual que normalmente produce la desfosforilación de ciclina E/Cdk2, deteniendo el avance a través de la fase-S. Chk1 también produce la fosforilación e inactivación de Cdc25, la fosfatasa de especificidad dual que produce la desfosforilación de ciclina B/Cdc2 (también denominada Cdk1), deteniendo el avance del ciclo celular en la frontera de G2 y la mitosis (Furnari et al., Science, 277: 1495-7, 1997). En ambos casos, la regulación de la actividad de Cdk induce una detención de ciclo celular que evita que las células entren en mitosis en presencia de daño de ADN o ADN no replicado.
- 20

Se han presentado diversos inhibidores de Chk1. Además, el documento WO 2005/121121 divulga diversos compuestos de aminopirazol considerados como moduladores del metabolismo de glucosa.

No obstante, todavía son necesarios inhibidores de Chk1 que sean potentes inhibidores de los puntos de control de ciclo celular que puedan actuar de forma eficaz como potenciadores de los agentes que provocan daño sobre ADN.

- 25 La presente invención proporciona compuestos que son potentes inhibidores de Chk1, que pueden resultar beneficiosos para el tratamiento del cáncer. Los compuestos anulan potentemente la detención de ciclo celular con mediación de Chk1 inducida por el tratamiento con agentes que provocan daño sobre ADN en cultivo tisular e in vivo. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención proporcionan inhibición de Chk2, que puede resultar beneficiosa para el tratamiento del cáncer. Además, los compuestos de la presente invención inhiben la proliferación de células cancerígenas por medio de un mecanismo que depende de la inhibición de Chk1. Dichos nuevos compuestos podrían abordar la necesidad de tratamientos de cáncer seguros y eficaces.
- 30

La presente invención proporciona un compuesto que es (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable. Las realizaciones preferidas son (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, sal de ácido (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amino metano sulfónico, sal de ácido (R)-[5-(2-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amino acético, sal hemioxalato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina y sal hemioxalato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.

35

Como realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.

40

La presente invención proporciona sales de ácido metano sulfónico, ácido acético, hemioxalato y hemisuccinato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.

Otra realización es un hidrato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.

- 45 La presente invención proporciona hidrato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina en forma cristalina.

La presente invención también proporciona hidrato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina en forma cristalina caracterizado por un patrón de difracción de rayos-X en forma de polvo que tiene picos en $2\theta \pm 0,2$ a 5,17 en combinación con uno o más picos seleccionados entre el grupo que consiste en 15,73, 17,71 y 20,12.

50

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 55 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

La presente invención proporciona compuestos para su uso en un método de tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención proporciona compuestos para su uso en un método de tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y radiación ionizante. Además, la presente invención proporciona compuestos para su uso en un método de tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y uno o más agentes de quimioterapia.

La presente invención proporciona el uso de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. Además, la presente invención también proporciona el uso de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho tratamiento comprende una terapia de combinación con radiación ionizante. Además, la presente invención proporciona el uso de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer por medio de terapia de combinación en la 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 (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para su uso en terapia. Además, la presente invención también proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y radiación ionizante para su uso en terapia. Además, la presente invención proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y uno o más agentes de quimioterapia para su uso en terapia.

La presente invención proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de cáncer. Además, la presente invención también proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y radiación ionizante para su uso en el tratamiento de cáncer. Además, la presente invención proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y uno o más agentes de quimioterapia para su uso en el tratamiento de cáncer.

La presente invención proporciona el uso de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que el medicamento se administra de forma simultánea, por separado, o de forma secuencial con radiación ionizante.

La presente invención proporciona el uso de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que el medicamento también comprende uno o más agentes de quimioterapia o se administra de forma simultánea, por separado, o de forma secuencial con uno o más agentes de quimioterapia.

La presente invención proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para su uso en combinación simultánea, por separado o secuencial con radiación ionizante en el tratamiento de cáncer.

La presente invención proporciona (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para su uso en combinación simultánea, por separado o secuencial con uno o más agentes de quimioterapia en el tratamiento de cáncer.

Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de compuestos para su uso en los métodos y usos que se han descrito en la presente memoria, en los cuales uno o más agentes de quimioterapia están seleccionados entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, hidroxiaurea, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, doxorubicina, etoposido, cisplatino y taxol. Adicionalmente, la presente invención proporciona realizaciones más preferidas de compuestos para su uso en los métodos y usos que se describen en la presente memoria, en la cual los agentes de quimioterapia están seleccionados entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, hidroxiaurea, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, doxorubicina, etoposido, cisplatino y taxol. De igual forma, la presente invención proporciona realizaciones de compuestos, incluso más preferidas, para su uso en los métodos y usos descritos en la presente memoria, en la cual el agente de quimioterapia se escoge entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, hidroxiaurea, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, doxorubicina, etoposido, cisplatino y taxol. Las realizaciones preferidas de los métodos y usos descritos en la presente memoria son cánceres seleccionados 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 ovarios, cáncer de páncreas, mesotelioma, cáncer de riñón y cáncer de útero.

Según se usa anteriormente, y durante toda la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados.

- 5 "Sal farmacéuticamente aceptable" o "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales orgánicas o inorgánicas relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención son capaces de reacción, por ejemplo, con un número de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales farmacéuticamente aceptables y metodología común para la preparación de las mismas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (VCH/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, N° 1, Enero 1977.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente en forma de composiciones farmacéuticas que usan uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables y se administran por medio de una variedad de rutas. Preferentemente, dichas composiciones son para administración oral, subcutánea o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para la preparación de las mismas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21ª edición, Mack Publishing Co., 2005).

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, incluyen ralentizar o invertir el avance de un trastorno. Estos términos también incluyen aliviar, mejorar, atenuar, eliminar o reducir uno o más síntomas de un trastorno o afección, incluso si el trastorno o afección no se elimina realmente e incluso si el avance del trastorno o afección no se ralentiza o invierte en sí mismo.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la cantidad del compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, de la presente invención o composición farmacéutica que contiene un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, de la presente invención que aclara la respuesta médica o biológica o el efecto terapéutico deseado sobre un tejido, sistema, animal, mamífero o humano objeto de consideración por parte del investigador científico, veterinario o médico.

La cantidad de compuesto de la presente invención que se administra realmente viene determinada por un médico en circunstancias relevantes, incluyendo la afección objeto de tratamiento, la ruta de administración escogida, el compuesto real de la presente invención que se administra, la edad, peso, y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones diarias normalmente se encuentran dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente mencionado pueden resultar más apropiados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis incluso más grandes.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por medio de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, así como los descritos en las Preparaciones y Ejemplos siguientes. Las etapas específicas sintéticas para cada unas de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes formas para preparar los compuestos de la presente invención.

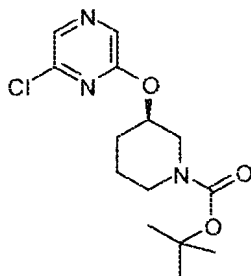
Los reactivos y los materiales de partida generalmente se encuentran disponibles para el experto en la técnica. Se pueden preparar otros por medio de técnicas convencionales de química orgánica y heterocíclica, técnicas que son análogas a las síntesis de compuestos conocidos estructuralmente similares y los procedimientos descritos en las Preparaciones y Ejemplos a continuación, incluyendo los procedimientos nuevos. Las siguientes Preparaciones y Ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención con detalle adicional y representar síntesis típicas de los compuestos. Los nombres de los compuestos de la presente invención se proporcionan generalmente por medio de ISIS Draw 2,5 SP2 con Autonom add-in.

Según se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados: "BCA" se refiere a ácido bicinónico; "BSA" se refiere a albúmina en suero bovino; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DPBS" se refiere a disolución salina tamponada con fosfato dibásico; "DTT" se refiere a ditioneitol; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HEPES" se refiere a ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico; "MEM" se refiere a un medio esencial mínimo; "MeOH" se refiere a metanol; "PBS" se refiere a disolución salina tamponada con fosfato; "PI" se refiere a yoduro de propidio; "ARNasa" se refiere a ribonucleasa A; "RPMI" se refiere a Roswell Park Memorial Institute; "TBST" se refiere a disolución 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 tri(hidroximetil)aminometano; "Triton-X" se refiere a 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilen glicol t-octilfenoxipoli-etoxietanolpolietilen glicol terc-octilfenil éter; y "Tween-20" se refiere a polisorbato 20.

55

Preparación 1

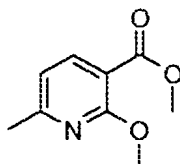
(R)-3-(6-cloropirazin-2-il)oxipiperidin-1-carboxilato de terc-butilo



- 5 Se dispersa hidruro de sodio (225,6 g, 5,64 mol) en THF (3 l) y se rebaja la temperatura hasta 0-5 °C. Se añade una disolución de (R)-3-hidroxi-1-boc piperidina (891,6 g, 4,43 mol) en THF (3 l) durante 1 hora al tiempo que se mantiene la temperatura entre 0-5 °C. Se agita la reacción durante 1 hora. Se añade gota a gota 2,6-dicloropirazina (600 g, 4,03 mol) en forma de disolución en THF (3 l) durante 1,5 h manteniendo la misma temperatura. Se agita la reacción durante 2 horas a 25-30 °C, y posteriormente se vierte sobre hielo. Se diluye la mezcla con agua y se somete a extracción con acetato de etilo. Se secan los extractos sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran.
- 10 Se tritura el aceite residual con 5 % de diclorometano en hexano para proporcionar el producto en forma de sólido blanco. Se recoge el sólido por medio de filtración y se seca para proporcionar 1538 g de material. Se retritura el producto bruto con diclorometano de 5 % en hexanos para proporcionar un sólido blanco en rendimiento cuantitativo. ES/MS m/z 314,1 [M+H]⁺.

Preparación 2

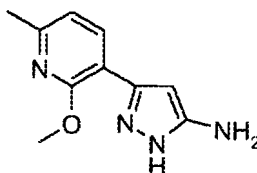
- 15 Éster metílico de ácido 2-metoxi-6-metil-nicotínico



- Se añade una disolución de sodio (2,58 g, 113,04 mmol) en metanol (80,0 ml) (se disuelve el metal de sodio en metanol bajo atmósfera de nitrógeno) a una disolución agitada de éster metílico de ácido 2-cloro-6-metil-nicotínico (10,4 g, 56,52 mmol) en MeOH bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se somete a reflujo la mezcla de reacción durante la noche. Se enfría la reacción hasta temperatura ambiente y se ajusta el pH hasta pH = 7 con ácido acético. Se diluye la mezcla de reacción con acetato de etilo (100 ml) y agua (30 ml). Se separa la fase orgánica y se somete a extracción la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 75 ml). Se secan los extractos orgánicos combinados sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran para proporcionar un producto bruto. Rendimiento: 7,25 g (71 %), RMN¹H (400 MHz, CDCl₃), δ 8,066-8,047 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,782-6,764 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,029 (s, 3H), 3,879 (s, 3H), 2,483 (s, 3H); ES/MS m/z 182,2 [M+H]⁺.
- 20
- 25

Preparación 3

5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-ilamina



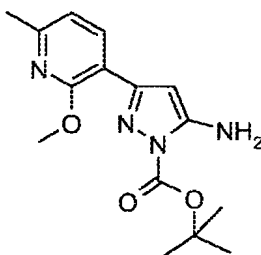
- Se añade n-BuLi (1,2 M, 96,0 ml, 115,6 mmol) a una disolución de acetonitrilo (6,08 ml, 115,4 mmol) en THF (300 ml) a -78 °C y se deja en agitación durante 30 minutos a -78 °C. Se añade éster metílico de ácido 2-metoxi-6-metil-nicotínico (20 g, 105,1 mmol) en THF (200 ml) y se agita a -78 °C durante otros 30 minutos. Se inactiva la mezcla de reacción a -78 °C con agua (500 ml) y se lava con EtOAc (2 x 250 ml). Se separa la fase acuosa y se evapora. Esto se co-distila dos veces con tolueno para obtener 3-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-3-oxo-propionitrilo. Rendimiento =
- 30

21,4 g (bruto). ES/MS m/z 191,1 [M+H]⁺.

Se coloca una disolución de 3-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-3-oxo-propionitrilo (21 g, 110,4 mmol) en etanol (200 ml) en un tubo sellado. Se añaden hidrazina hidratada (32,1 ml, 662,4 mmol) y ácido acético (21,0 ml) y se calienta la reacción a 100 °C durante 2 horas. Se evapora el disolvente y se diluye la mezcla de reacción con EtOAc (500 ml) y disolución de bicarbonato de sodio saturado (100 ml). Se separa la fase orgánica y se somete a extracción la fase acuosa con EtOAc (2 x 250 ml). Se secan los extractos orgánicos combinados sobre Na₂SO₄, se filtran, y se concentran para proporcionar el producto bruto que se toma para la siguiente etapa sin purificación adicional alguna. Rendimiento = 16,5 g (73 %), RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,50 (sa, 1H), 7,90 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,88 (s, 1H), 4,64 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).

10 Preparación 4

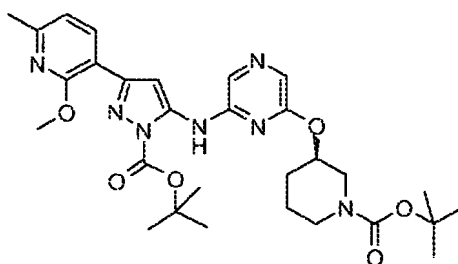
Éster terc-butílico de ácido 5-amino-3-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-pirazol-1-carboxílico



Se añade lentamente una disolución de 5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-ilamina (16,0 g, 78,3 mmol) en THF (200 ml) a una suspensión agitada de NaH (60 % en aceite mineral, 3,4 g, 85,0 mmol) en THF (200 ml) a 0 °C. Tras 15 minutos a 0 °C, se añade lentamente di-terc-butildicarbonato (19,8 ml, 86 mmol) a la mezcla de reacción y se agita a 0 °C durante 30 minutos. Se inactiva la mezcla de reacción con hielo-agua (aproximadamente 250 ml) y se somete a extracción el producto en acetato de etilo (2 x 500 ml). Se lavan las partes orgánicas combinadas con agua y disolución saturada de NaCl (200 ml), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran, y se concentran a vacío para permitir el material bruto. Se tritura este material con hexano dos veces para obtener 18,5 g (78 %) del compuesto del título. RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,05 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,28 (s, 2H), 5,85 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,56 (s, 9H).

Preparación 5

Éster terc-butílico de ácido (R)-3-[6-[2-terc-butoxicarbonil-5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-ilamino]-pirazin-2-iloxi]-piperidin-1-carboxílico

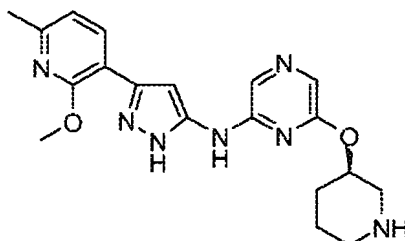


Se divide igualmente una mezcla de éster terc-butílico de ácido 5-amino-3-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-pirazol-1-carboxílico (50,0 g, 164,5 mmol), (R)-3-(6-cloropirazin-2-il)oxipiperidin-1-carboxilato de terc-butilo (56,6 g, 180,9 mmol), 4,5-bis-difenil-fosfanil-9,9-dimetil-9H-xanteno (14,2 g, 24,6 mmol) y Cs₂CO₃ (85,5 g, 263 mmol) en 1,4-dioxano (1,4 l), en dos matraces de fondo redondo y ambos se purgan con argón durante 2 h. Se añade Pd(OAc)₂ (5,4 g, 24,6 mmol) (la mitad a cada recipiente) y se continua la purga durante 1 h. Posteriormente se calientan las reacciones a 90-95 °C durante 1 h. Se enfrían las mezclas de reacción hasta temperatura ambiente, se combinan y se diluyen con acetato de etilo (1 l). Posteriormente, se filtra la mezcla a través de tierras diatomeas, se lava con acetato de etilo y se concentra el filtrado. Se purifica el producto bruto sobre gel de sílice con hexano/EtOAc de 15 % como eluyente para proporcionar 55 g (57 % de rendimiento) de un polvo blanco. Se combinan 55 g del producto purificado con 15 g de material purificado y preparado de forma similar (obtenido a partir de 20 g de éster terc-butílico de ácido 5-amino-3-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-pirazol-1-carboxílico). Se disuelven 70 g de material combinado en una mezcla 4:1 de THF y metanol (1,4 l) y se trata con QuadraSil™ AP (140 g) durante 2 h. Se filtra la mezcla de reacción a través de tierras diatomeas y se lava con acetato de etilo (4 x 100 ml). Se agita de nuevo el filtrado con QuadraSil™ AP (140 g) durante 2 h y se filtra como se ha comentado anteriormente. Se evapora el

disolvente para proporcionar el compuesto del título en forma de sólido blanco. Rendimiento = 70 g (47 %), ES/MS m/z 582,5 [M+H]⁺.

Ejemplo 1

(R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina



5

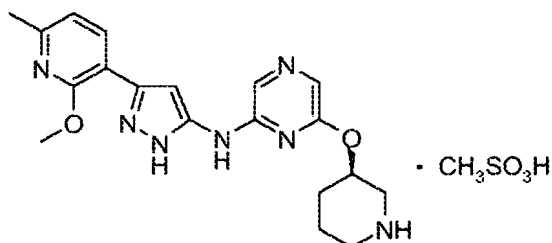
Se añade una disolución de ácido trifluoroacético (12,4 ml, 167 mmol) en diclorometano (20 ml) a una disolución agitada de éster terc-butílico de (R)-3-[6-[2-terc-butoxicarbonil-5-(2-metoxi-6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-ilamino]-pirazin-2-iloxi]-piperidin-1-carboxílico (13,0 g, 22,3 mmol) en diclorometano (150 ml) durante un período de 5 minutos a 0 °C. Se deja calentar la reacción a temperatura ambiente y se agita durante 3 h. Se diluye la reacción con diclorometano (1000 ml), seguido de adición de disolución de bicarbonato de sodio saturada (250 ml) y posteriormente se agita durante 4 h. Se separa la parte orgánica y se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora. Se cristaliza el material resultante a partir de isopropanol para obtener el producto deseado. Rendimiento = 7,2 g (85 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,40 (s, 1H), 9,71 (s, 1H), 8,02 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,93 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,91 (s, 1H), 4,94-4,86 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,83-2,75 (m, 1H), 2,57 (dd, J = 12,0, 8,4 Hz, 1H), 2,53-2,45 (m oscurecido, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,15-2,05 (m, 1H), 1,71-1,63 (m, 1H), 1,60-1,49 (m, 1H), 1,49-1,40 (m, 1H); ES/MS m/z 382,5 [M+H]⁺.

10

15

Ejemplo 2

Sal de ácido (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amino metano sulfónico



20

Se añade ácido metano sulfónico (0,247 g, 2,57 mmol) a una disolución agitada de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina (0,982 g, 2,57 mmol) en diclorometano (25 ml) a 0 °C. Se deja calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agita durante 45 minutos. Se evapora el disolvente, y se lava la sal resultante con éter (10 ml) y pentano (10 ml) secuencialmente para obtener el producto deseado. Rendimiento = 1,139 g (92,6 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,5 (sa, 1H), 9,81 (s, 1H), 8,73 (sa, 1H), 8,54 (sa, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,96 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 6,95 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,81 (s, 1H), 5,31-5,24 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,48-3,39 (m, 1H), 3,39-3,30 (m, 1H), 3,18-3,10 (m, 1H), 3,10-3,01 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,03-1,85 (m, 3H), 1,73-1,65 (m, 1H); ES/MS m/z 382,4 [M+H]⁺.

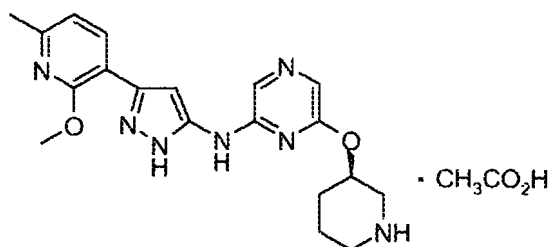
25

30

35

Ejemplo 3

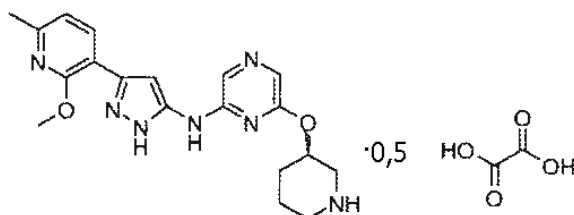
Sal de ácido (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amino acético



Se añade ácido acético (0,015 ml, 0,26 mmol) disuelto en diclorometano (1 ml) a una disolución de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina (0,100 g, 0,26 mmol) en diclorometano (10 ml). Se agita la mezcla de reacción durante 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se evapora el disolvente para obtener un residuo. Se tritura el residuo con éter dietílico (20 ml) seguido de n-pentano (20 ml). Se seca el material con alto vacío durante 4 h para obtener el producto deseado. Rendimiento = 0,060 g (51,8 %), RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,40 (sa, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,02 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,94 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 4,97-4,38 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,83-2,74 (m, 1H), 2,66-2,56 (m, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,14-2,03 (m, 1H), 1,89 (s, 3H), 1,74-1,62 (m, 1H), 1,61-1,51 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,30-1,20 (m, 1H), ES/MS m/z 382,5 [M+H]⁺.

Ejemplo 4

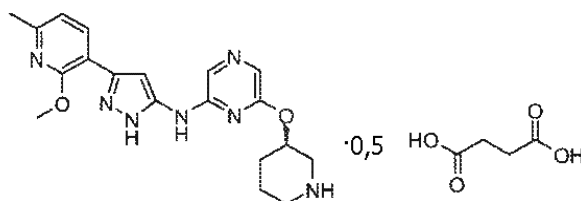
Sal hemioxalato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina



Se añade ácido oxálico (0,012 mg, 0,13 mmol) disuelto en MeOH (0,1 ml) a una disolución de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina (0,100 g, 0,26 mmol) en diclorometano (10 ml). Se agita la mezcla de reacción durante 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se evapora el disolvente para obtener un residuo. Se tritura el residuo con éter dietílico (20 ml) seguido de n-pentano (20 ml). Se seca el material con alto vacío durante 4 h para obtener el compuesto del título. Rendimiento = 0,095 g (77 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,77 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,95 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,55 (s, 1H), 6,95 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 5,33-5,24 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,45-3,30 (m, 2H), 3,18-3,09 (m, 1H), 3,08-2,98 (m, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,05-1,85 (m, 2H), 1,74-1,63 (m, 1H), 1,18-1,10 (m, 1H); ES/MS m/z 382,4 [M+H]⁺.

Ejemplo 5

Sal hemisuccinato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina



Se añade ácido succínico (0,015 g, 0,13 mmol) disuelto en etanol (1 ml, disuelto a 50 °C) a temperatura ambiente a una disolución de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina (0,1 g, 0,26 mmol) en diclorometano (10 ml). Se agita la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente y se tritura el residuo con éter dietílico (20 ml) seguido de n-pentano (20 ml). Se seca el material con alto vacío durante 8 h para obtener el compuesto del título. Rendimiento = 0,102 g (78 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ12,4 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 8,05-7,96 (m, 2H), 7,48 (s, 1H), 6,93 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,86 (s, 1H), 5,06-4,974 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 2,90-2,81 (m, 1H), 2,74-2,62 (m, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,30 (s, 2H), 2,09-2,01 (m, 1H), 1,80-1,60 (m, 2H), 1,57-1,46 (m, 1H), 1,14-1,10 (m, 1H), 1,10-1,00 (m, 1H); ES/MS m/z 382,4 [M+H]⁺.

Ejemplo 6

(R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina hidratada

Se suspende (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina (52,1 mg; ES/MS m/z 382,2 [M+H]⁺) en una mezcla de agua etanol 5:95 (10 ml) y se suspende a temperatura ambiente durante 48 horas. Se recupera un sólido cristalino blanco por medio de filtración a vacío.

Se obtienen patrones de difracción de rayos-X en forma de polvo (XRD) de sólidos cristalinos en un difractómetro de rayos-X en forma de polvo Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente de CuKα (λ = 1,54060 Å) y un detector Vantec, que operaba a 35 kV y 50 mA. Se evalúa la muestra entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,009° en 2θ. Se introduce el polvo de cuarzo en un recipiente de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie suave usando un portaobjetos de vidrio. En el presente caso, una variabilidad en la posición de los picos de ± 0,2° en 2θ tiene en cuenta las variaciones sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. Se puede realizar la confirmación de la forma cristalina en base a cualquier combinación única de picos que se distinguen (en unidades de ° 2θ), normalmente los picos más prominentes. Se ajustaron los patrones de difracción de las formas cristalinas, se recogieron a temperatura y humedad relativa ambientales, en base a picos convencionales NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2-theta.

De este modo, la forma cristalina de muestra del compuesto se caracteriza por medio de un patrón de XRD usando radiación CuKα ya que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 siguiente. Específicamente, el patrón contiene un pico a 5,17 en combinación con uno o más picos seleccionados entre el grupo que consiste en 15,73, 17,71 y 20,12 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 1. Picos de difracción de rayos-x en forma de polvo del Ejemplo 6

Pico	Angulo (2-Theta°)	Intensidad (%)
1	5,17	100,0
2	8,44	6,3
3	9,58	6,3
4	10,44	6,4
5	13,21	4,4
6	15,73	47,9
7	16,17	6,4
8	17,71	28,1
9	18,00	9,2
10	20,12	15,1
11	23,31	4,9
12	24,52	4,3
13	32,95	4,2

Ensayo Bioquímico Chk1

Se puede determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad bioquímica Chk1 usando un ensayo de unión de filtro de péptido y sustrato/CHK1. En este ensayo, se usa un péptido sintético basado en residuos 206-225 de Cdc25 de secuencia de amino ácidos, como sustrato fosfo-aceptor para la proteína quinasa Chk1 recombinante. Usando ATP-γ³³ como sustrato fosfo-donante, Chk1 transfiere el grupo fosfato³³-γ radioactivo al péptido sintético. Se mide la reacción por medio de captura del sustrato de péptido sobre una placa filtrante de intercambio catiónico y conteo por centelleo de las partículas beta emitidas.

Se llevan a cabo las reacciones de quinasa (volúmenes de reacción de 40 µl) en placas de poliestireno con parte inferior con forma de V de 96 pocillos. Se inician las reacciones con la adición de enzima Chk2. Las condiciones finales de reacción son sal de sodio HEPES 67 mM, pH 7,4, 0,007 % (v/v) de TRITON™ X-100, DTT 2,7 mM, sustrato de péptido 12 µM, sal de disodio de ATP 60 µM, ATP-P³³-γ 0,75 µCi, enzima Chk1 activa 0,075 nM, DMSO de 4 % (v/v) y dilución seriada del compuesto (dilución seriada 1:3, partiendo de 20 µM, 10 puntos).

Tras la adición de la enzima Chk1, se incuban las reacciones a temperatura ambiente durante 90 minutos, y posteriormente se terminan con la adición de 140 µl de ácido fosfórico. Se transfiere la mezcla de reacción a los correspondientes pocillos de una placa filtrante opaca con papel de intercambio catiónico de fosfocelulosa para el asentamiento durante 30 minutos. Se lava la placa filtrante en un colector de vacío con cinco lavados de 200 µl de ácido fosfórico de 0,5 % (v/v). Se seca durante la noche la placa filtrante antes de la adición de 40 µl de Microscint™-20 a cada pocillo de la placa. Tras el asentamiento durante 4 h a temperatura ambiente, se mide la radioactividad en la placa usando un contador de centelleo de microplaca MicroBetaTrilux (Perkin Elmer).

Para la determinación IC₅₀, se calcula el porcentaje de inhibición para cada concentración usando la proporción de cuenta de centelleo para los controles operados en cada placa. Posteriormente, se ajustan los datos de concentración de compuesto de diez puntos a una ecuación logística de cuatro parámetros usando Activity Base 4,0. Se calculan los valores absolutos de IC₅₀ a partir de la curva resultante. Se someten a ensayo los compuestos de la invención en este ensayo operando sustancialmente como se ha indicado con anterioridad. Por ejemplo, se somete a ensayo el compuesto de Ejemplo 1 y se encontró que tenía un IC₅₀ < 0,001 µM (n = 6). Además, se somete a ensayo el Compuesto 2 y se encontró que tenía un IC₅₀ < 0,001 µM (n = 3). Estos resultados indican que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son potentes inhibidores de Chk1.

Ensayo bioquímico Chk2

Se puede determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad bioquímica Chk2 usando un ensayo de unión de filtro de péptido y sustrato/CHK2. En este ensayo, se usa un péptido sintético basado en residuos 206-225 de Cdc25C de secuencia de amino ácidos, como sustrato fosfo-aceptor para la proteína quinasa Chk2 recombinante. Usando ATP-γ³³ como sustrato fosfo-donante, Chk2 transfiere el grupo fosfato³³-γ radioactivo al péptido sintético. Se mide la reacción por medio de captura del sustrato de péptido sobre una placa filtrante de intercambio catiónico y conteo por centelleo de las partículas beta emitidas.

Se llevan a cabo las reacciones de quinasa (volúmenes de reacción de 40 µl) en placas de poliestireno con parte inferior con forma de V de 96 pocillos. Se inician las reacciones con la adición de enzima Chk2. Las condiciones finales de reacción son sal de sodio HEPES 67 mM, pH 7,4, 0,007 % (v/v) de TRITON™ X-100, DTT 2,7 mM, sustrato de péptido 12 µM, sal de disodio de ATP 60 µM, ATP-P³³-γ 0,75 µCi, enzima Chk2 activa 1,4nM, DMSO de 4 % (v/v) y dilución seriada del compuesto (dilución seriada 1:3, partiendo de 20 µM, 10 puntos).

Tras la adición de la enzima Chk2, se incuban las reacciones a temperatura ambiente durante 90 minutos, y posteriormente se terminan con la adición de 140 µl de ácido fosfórico. Se transfiere la mezcla de reacción a los correspondientes pocillos de una placa filtrante opaca con papel de intercambio catiónico de fosfocelulosa para el asentamiento durante 30 minutos. Se lava la placa filtrante en un colector de vacío con cinco lavados de 200 µl de ácido fosfórico de 0,5 % (v/v). Se seca durante la noche la placa filtrante antes de la adición de 40 µl de Microscint™-20 a cada pocillo de la placa. Tras el asentamiento durante 4 h a temperatura ambiente, se mide la radioactividad en la placa usando un contador de centelleo de microplaca MicroBetaTrilux (Perkin Elmer).

Para la determinación IC₅₀, se calcula el porcentaje de inhibición para cada concentración usando la proporción de TR-FRET para los controles operados en cada placa. Posteriormente, se ajustan los datos de concentración de compuesto de diez puntos a una ecuación logística de cuatro parámetros usando Activity Base 4,0. Se calculan los valores absolutos de IC₅₀ a partir de la curva resultante. Se someten a ensayo los compuestos de la invención en este ensayo operando sustancialmente como se ha indicado con anterioridad. Por ejemplo, se somete a ensayo el compuesto de Ejemplo 1 y se encontró que tenía un IC₅₀ < 0,011 µM (SE = 0,002, n = 6). Además, se somete a ensayo el Compuesto 2 y se encontró que tenía un IC₅₀ < 0,012 µM (SE = 0,008, n = 3). Estos resultados indican que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son potentes inhibidores de Chk2.

Ensayo Basado en Células de Autofosforilación Chk1

Un inhibidor de Chk1 evita la actividad de quinasa de la proteína procedente de sustratos de fosforilación en células en las cuales se ha activado la respuesta frente a daño sobre ADN. Un sustrato fácilmente detectable para Chk1 es un sitio de autofosforilación sobre la propia Chk1, serina 296. Se puede usar el siguiente ensayo de inmunotransferencia para medir la cantidad de fosforilación de serina 296 sobre Chk1 y directamente el nivel de actividad de la proteína quinasa Chk1. Se someten a cultivo las células HeLa en Disolución de Sal Equilibrada Earle/MEM w con L-glutamina complementada con suero bovino fetal inactivado con calor de 10 % (v/v), 1 x amino ácidos no esenciales MEM, 1 x piruvato de sodio y 1 x 10⁵ células en placa de 600 µl de medio de cultivo MEM por pocillo de una placa de cultivo celular de 14 pocillos. Se incuban las células durante 24 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95-100 % de humedad. Se añaden diez y seis µl de una reserva 4 µM de doxorubicina en medio de cultivo a cada pocillo apropiado para obtener una concentración final de doxorubicina de 100 nM. Se vuelven a introducir las placas en la incubadora durante 24 horas adicionales antes de la adición del compuesto inhibidor de Chk1. Se solubilizan los compuestos a 10 mM en DMSO 100 %, posteriormente se diluyen hasta 2 mM en DMSO de 40 % (v/v) y posteriormente se diluye hasta 100 µM con medio de cultivo más DMSO de 4 % (v/v). Posteriormente, se preparan diluciones seriadas de los compuestos (1:3) en un intervalo de 100 µM a 0,005 µM. Se añaden sesenta y seis µl de

reserva de compuesto a los pocillos apropiados de la placa para producir una concentración final de DMSO de 0,4 % (v/v) y un intervalo de concentración final de compuesto entre 1 μM y 0,0005 μM . Se vuelven a introducir las placas en la incubadora durante 2 h adicionales y posteriormente se retiran para la lisis celular y el procesamiento. A continuación, se retira el medio de la placa, se lava cada pocillo con 0,5 ml de Disolución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco enhiada en hielo (DPBS), se retira todo el líquido, y se coloca la placa en hielo durante el resto del procedimiento. Se añaden 75 μl de tampón de lisis enhiado en hielo a cada pocillo, que consistía en un cóctel de inhibidor de fosfatasa que contenía Tampón de Extracción Celular (Sigma, cat# P0044 + P5725) y comprimidos de cóctel de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, cat# 11836153001). Transcurridos 10 minutos, se rasca cada pocillo y se transfiere el lisato a un tubo de microcentrifuga de polipropileno de 1,5 ml en hielo. Se somete cada lisato a tratamiento por ultrasonidos durante 45 segundos con un dispositivo de ultrasonidos de balanceo de placas (Misonix) al tiempo que se suspende en un baño de agua/hielo. Se transfieren cincuenta μl de cada muestra a un tubo de micro-centrifuga de polipropileno de 0,5 ml que contenía 25 μl de 4 x Tampón de Muestra de Laemmli, se calentó a 95 °C durante 5 minutos y se almacenó congelada a -80 °C. Se usa el lisato restante para la determinación de la concentración de proteína (estuche de ensayo de proteína BCA, Thermo Scientific). Se aplican cinco μg de cada lisato celular en el tampón de muestra a un gel de 96 pocillos E-page y se somete a electroforesis. Se someten a electrotransferencia proteínas a partir del gel hasta PVDF de membrana Immobilon-P (0,45 μm) de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica (Towbin et al., PNAS (1979) 76(9), 4305-4). Se lava brevemente la membrana con Tris 10 mM/HCl pH 8,0, NaCl 150 mM y Tween 20 de 0,05 % (v/v) (TBST) y se sumerge durante una hora a 25 °C en TBST/leche instantánea Carnation® reconstituida de 5 % (v/v). Se lava la membrana cuatro veces con TBST durante 5 minutos, posteriormente se sumerge a 4 °C durante 24 h en TBST/albúmina de suero bovino de 5 % (peso/volumen) con una dilución apropiada de anti-fosfo-Chk1 de conejo (serina 296). Se lava la membrana 4 x con TBST durante 5 minutos a 25 °C y posteriormente se sumerge a 25 °C durante 2 h en TBST/leche de 5 % que contenía una dilución apropiada de IgG de anti-conejo de mono conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (GE Healthcare, cat# NA9340) para detectar la proteína Chk1 autofosforilada. Se lava la membrana de nuevo 4 x con TBST durante 5 minutos a 25 °C. Se detectan los conjugados de antígeno-anticuerpo-indicador inmovilizados sobre la membrana con un reactivo de detección de SuperSignal Western Femto HRP usando un sistema de formación de imágenes FUJI LAS-4000. Se calculan las intensidades de banda fosfo-Chk1 (ser296) usando un soporte lógico "Total Lab" (Nonlinear Dynamics). Se calcula el porcentaje de inhibición de autofosforilación de Chk1 inducida por doxorubicina usando la fórmula siguiente: % de inhibición = (muestra - fosfo-Chk1 - intensidad de banda - control negativo sin doxorubicina - intensidad de banda de fosfo-Chk1)/(control positivo de doxorubicina - intensidad de banda de fosfo-Chk1 - control negativo sin doxorubicina - intensidad de banda de fosfo-Chk1) x 100. Se someten a ensayo los compuestos de la invención en este ensayo operado sustancialmente como se ha mostrado con anterioridad. Se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 1 en este ensayo y se encontró que tenía un $\text{EC}_{50} < 0,001 \mu\text{M}$ (n = 1). Se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 3 en este ensayo y se encontró que tenía un $\text{EC}_{50} < 0,001 \mu\text{M}$ (n = 1). Estos resultados indican que los compuestos dentro del alcance de la invención son potentes inhibidores de Chk1.

Ensayo de Acumen Basado en Células HeLade de Anulación de Punto de Control G2M Inducido por Doxorubicina

Un inhibidor de Chk1 inhabilita el punto de control de daño sobre ADN G2M en células tumorales p53-menos tratadas con el inhibidor topoisomerasa II, doxorubicina. Una medición de la anulación del punto de control G2M es la fosforilación de histona H3 sobre la serina 10 que ocurre una vez que las células atraviesan el punto de control G2M y entran en mitosis. Se puede usar el siguiente ensayo de alto contenido en formación de imágenes para medir la fosforilación de histona H3 en las células. Se someten a cultivo las células HeLa en Medio MEM complementado con FBS de 10 % (v/v) y se colocan sobre placas a 2000 células por pocillo en placas negras con fondo transparente revestidas con poli-D-lisina, 100 μl de volumen por pocillo. A continuación, se incuban en una incubadora de cultivo celular durante 18-24 h (37 °C, 5 % de CO_2 , y 95 % de humedad relativa). Tras la incubación inicial, se añaden 20 μl de Medio MEM más FBS de 10 % que contenía doxorubicina de 625 nM a los pocillos apropiados de las placas, dando como resultado una concentración final de 125 nM. Se vuelven a meter las placas en la incubadora durante 24 h, suficiente para detener las células en el punto de control G2M. Al día siguiente se tratan las células con los compuestos. Se solubilizan los compuestos a 10 mM en DMSO de 100 % y posteriormente se diluyen hasta una 10 x de reserva partiendo a 50 μM en MEM más DMSO de 4 % (v/v). Posteriormente, se preparan diluciones seriadas de los compuestos (1:2) en un intervalo de 50 μM a 0,39 μM . Se añaden trece μl de la reserva de compuesto a los pocillos apropiados en la placa para producir una concentración final de DMSO de 0,4 % y un intervalo de concentración final del compuesto entre 5 μM y 0,039 μM . Se vuelven a introducir las placas en la incubadora durante 7 h adicionales y posteriormente se retiran para la fijación. Se retira con precaución el líquido de cada pocillo y se añaden 100 μl de fijador PREFER™. Se mantienen las placas a temperatura ambiente durante 20 minutos, se retira el fijador y posteriormente se permeabilizan las células por medio de la adición de 100 μl /pocillo de Triton® X 100 de 0,1 % (v/v) en DPBS durante 10 minutos. Se retira la disolución y se lava la placa dos veces con 100 μl de DPBS por pocillo seguido de la adición de 100 μl de DPBS que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ribonucleasa A (ARNasa, de páncreas bovino) durante una hora a temperatura ambiente. Se retira la disolución ARNasa y las células teñidas por la presencia de histona H3 fosforilada sobre serina (pHH3) por medio de la adición a cada pocillo de 50 μl de disolución de ARNasa que contiene una dilución de 1:500 de anti-pHH3 de conejo (ser10) más BSA de 1 % (peso/volumen). Se sellaron las placas y se mantuvieron a 4 °C durante la noche. Se retira el anticuerpo primario por

medio de lavado de cada placa dos veces con 100 μ l de DPBS por pocillo y se sustituyó por 50 μ l de un dilución de 1:750 IgG de anti-conejo de cabra Alexa Fluor® 488 (H+L) (2 mg/ml) en DPBS más BSA 1 % (peso/volumen). Se mantienen las placas durante una hora a temperatura ambiente cubiertas con papel de aluminio para protegerlas frente a la luz. Se lavan de nuevo las placas dos veces con 100 μ l por pocillo de DPBS y se sustituyó por 100 μ l de yoduro de propidio 15 nM (dilución de 1:100 con PBS a partir de la disolución original). Se sellan las placas con un sellado negro para protegerlas frente a la luz. Se incuban las placas durante 30 minutos hasta obtener núcleo teñido. Se evalúan las placas con citómetros de microplaca de fluorescencia de detección láser ACUMEN EXPLORER™ 2N y 4N. Se identifican las células pHH3 positivo por medio de la intensidad media a 519 nm de Alexa 488. Se usa la intensidad total a 655-705 nm procedente de yoduro de propidio/ADN para identificar las células individuales y las sub-poblaciones en ciclo celular (células 2N, células 4N). Se determina la lectura final de cada población por medio de normalización con respecto a % de células totales que produce un rendimiento final de ensayo de % pHH3, % 2N, % 4N. A continuación, se determina la actividad de 100 % tratando las células con la concentración máxima de un compuesto de control de inhibidor a 100 nM para determinar la actividad final en % de cada compuesto. La actividad de 0 % está basada en la ausencia de tratamiento con compuesto. Se determina EC₅₀ relativo por medio del uso de ACTIVITY BASE™, ajuste por hoja de cálculo, ajuste de curva usando un ajuste logístico de cuatro parámetros, ecuación 205, para determinar el % de pHH3 relativo al control máximo a 100 %. Se someten a ensayo los compuestos de la invención en este ensayo operado sustancialmente como se ha mostrado con anterioridad. Se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 1 y se encontró que tenía un EC₅₀ de 0,029 μ M (n = 1). Se sometieron a ensayo los compuestos del Ejemplo 2 y Ejemplo 3 y se encontró que tenían unos resultados de EC₅₀ de 0,033 μ M (n = 1) y 0,019 μ M (n = 1), respectivamente. Estos resultados indican que los compuestos dentro del alcance de la presente invención inhabilitan el punto de control de daño sobre ADN G2M.

Ensayo EC_{ifs} (Sensibilización de Dos Veces)

Un inhibidor de Chk1 puede potenciar la actividad anti-proliferadora de gemcitabina (u otras sustancias citotóxicas) a través de la anulación del punto de control de la fase intra-S, dando como resultado un daño sobre ADN mayor y sostenido. Se puede analizar la capacidad de proliferación continuada de las células tumorales tras el daño sobre ADN, determinando la capacidad de las células para replicar su ADN. Este ensayo evalúa la capacidad de las células para replicar su ADN una vez que éstas han tenido la oportunidad de reparar el daño sobre el ADN. En este ensayo, se tratan las células con una serie de dilución de gemcitabina, y trascurridas 22 h con el compuesto del Ejemplo 3. Tras 44 h adicionales, se evalúa el número relativo de células por medio de un ensayo de reducción de colorante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). El parámetro EC_{ifs} es una medida de la concentración de un inhibidor de Chk1 necesaria para reducir a la mitad la concentración de GI90 de gemcitabina, medida en este ensayo en ausencia de inhibición de Chk1. Se cultivan células HT-29 (obtenidas a partir de ATCC) en RPMI 1640 más FBS inactivado con calor de 10 % (v/v). Se colocan las células en placas a 2,5 x 10³ por pocillo, en un volumen de 100 μ l en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se incuban durante 24 h. Se preparan diluciones de gemcitabina a 6x concentraciones en medio de McCoy 5A (modificado) (1x) y se añaden a los pocillos a 20 μ l por pocillo. Se prepararon diluciones de gemcitabina siendo la concentración final más elevada de gemcitabina de 1,0 μ M y se realizaron diluciones por medio de etapas tres veces hasta 0,5 nM.

Se prepara el inhibidor de Chk1 por medio de diluciones en DMSO hasta una concentración final de 400x, y posteriormente se diluye 666 veces en medio de McCoy para generar 6x reservas. Las diluciones de inhibidor de Chk1 transcurrieron en etapas de 2,5 veces partiendo de 25 nM hasta 0,3 nM. Veinticuatro horas después de la adición de gemcitabina, se añade inhibidor de Chk1 en un volumen de 24 μ l a pocillos que contenían 1,20 μ l de medio más gemcitabina. Cada dilución de gemcitabina recibe una dilución individual de inhibidor de Chk1. Los pocillos de control recibieron DMSO, gemcitabina, o inhibidor de Chk1 solo. Cuarenta y cuatro horas después de la adición de inhibidor de Chk1, se añaden 30 μ l de reactivo de ensayo CellTiter 96®AQ_{ueous}, a cada pocillo y se mantiene a temperatura ambiente durante 1 hora y 45 minutos. Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro SpectraMax 250 (Molecular Devices) a 490 nm. Se analizan los datos del espectrofotómetro SpectraMax con GraphPad Prism 4.0. En primer lugar, se resta una absorbancia media de control sin células de la totalidad de los otros valores de la matriz de datos procedente de cada placa. A continuación, se calcula el promedio de los puntos de datos por duplicado. Se normalizan los datos para cada concentración de inhibidor de Chk1, estableciéndose el número celular de 0 % como A₄₉₀ = 0 corregido, y el número celular de 100 % como el valor medio de gemcitabina de 0 nM. Posteriormente, se transforman estos resultados. Se convierten las concentraciones de gemcitabina en concentraciones logarítmicas, y se convierten los valores de número de células normalizados en porcentaje de inhibición (inhibición en porcentaje = 100 - valor normalizado). Se representan gráficamente los datos transformados, y se opera una regresión no lineal para estimar un valor de IC₅₀ para gemcitabina a cada concentración de inhibidor de Chk1. Se calcula la regresión no lineal permitiendo la variación de la pendiente, y sin restricciones para la parte superior o la parte inferior de las curvas de dosis-respuesta. Se calcula el valor EC_{ifs} como se muestra a continuación: se determinan los valores GI₅₀ para gemcitabina para cada concentración de inhibidor de Chk1, se representan gráficamente, y se determina la concentración de inhibidor de Chk1 necesaria para hacer disminuir GI₅₀ solo con gemcitabina dos veces, por medio de interpolación.

Se someten a ensayo los compuestos dentro del ámbito de la invención en este ensayo operado sustancialmente como se muestra con anterioridad. Por ejemplo, se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 3 y se encontró que

tenía un valor de EC_{50} de 1,0 nM (SE = 0,1, n = 3). Además, 25 nM del compuesto disminuye el valor de EC_{50} de gemcitabina 7 veces desde 22 nM hasta 3 nM en células con carcinoma de colon HT-29. Solo, 25 nM del compuesto del Ejemplo 3 tienen un escaso efecto sobre la proliferación de células HT-29. Estos resultados indican que los compuestos dentro del alcance de la presente invención potencian eficazmente la actividad anti-proliferadora de gemcitabina a concentraciones bajas.

Valores de IC_{50} de gemcitabina obtenidos con el tratamiento de diversas concentraciones del Ejemplo 3.

[Ejemplo 3], nM	IC_{50} (nM)
0	22
0,256	23
0,64	19
1,60	14
4,0	10
10	4
25	3

10 Ensayo de Inhibición Diana *in vivo* Chk1

Se someten a cultivo las células Calu-6 en medio de crecimiento (MEM con Sal Equilibrada Earle

Disolución con L-glutamina complementada con FBS inactivado con calor de 10 % (volumen/volumen), 1 x MEM amino ácidos no esenciales, 1 x piruvato de sodio) y ampliada. Se recolectaron células y se lavaron dos veces con disolución salina tamponada con fosfato y se mezclan 1 x 10^6 células en medio de crecimiento (sin suero) con igual volumen de matriz BD Matrigel™, posteriormente se inyectan por vía sub-cutánea en la parte lumbar de ratones atímicos pre-irradiados (4,5 Gy) (atímicos). En el día 15 después del implante (tamaño de tumor = 150-200 mm³), se administra gemcitabina formulada de nuevo en disolución salina, diariamente, a animales por medio de ruta intraperitoneal, a una dosis de 150 mg/kg. Seis horas más tarde, se administra por vía oral el compuesto Chk1 formulado en Tween-80 de 0,2 %/metilcelulosa de 0,5 %, con pH ajustado a 6,8 por medio de la adición de NaOH. Se sacrificaron los animales 2 h después de la dosis de inhibidor de Chk1, se recolectaron los tumores y se procesaron inmediatamente en tampón de Extracción Celular enfriado en hielo que contenía un cóctel de inhibidor de fosfatasa (Sigma, cat# P0044 + P5725) y comprimidos de cóctel de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, cat# 11836153001). Se procesan los tumores en 1,5-2,0 ml de tampón de lisis en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml enfriado en hielo usando un dispositivo de homogeneización tisular motorizado ajustado al alza durante 15 segundos. Con la muestra todavía mantenida en hielo, se extrae el lisato cuatro veces a través de una jeringa de 1 ml con una aguja de número 25. Se transfieren 0,35 ml de lisato de tumor a un tubo de micro-centrífuga de polipropileno de 1,5 ml que contenía 0,15 ml de 4x tampón de muestra de Laemmli. A continuación, se mezcla la muestra y se calienta durante 5 minutos a 95 °C y se somete a tratamiento de ultrasonidos durante 1 minuto usando alta potencia en un dispositivo de ultrasonidos de balanceo de placas Misonix 3000. Posteriormente, se almacenan las muestras en hielo, o se almacenan a -80 °C para la evaluación de inhibición diana por medio de inmunotransferencia Western. Se aplican cinco µg de cada lisato de tumor en el tampón de muestra a geles de 96 pocillos E-Page y se somete a electroforesis. Se transfieren las proteínas a una membrana de Protan BA83 de nitrocelulosa (Whatman, Cat# 10402405) de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica (Towbin et al., PNAS (1979) 76(9), 4350-4). A continuación, se procesa la membrana para medir la proteína Chk1 autofosforilada sobre serina 296. Se lava la membrana brevemente con agua, posteriormente con Tris 10 mM/HCl pH 8,0, NaCl 150 mM y Tween 20 de 0,05 % (v/v) (TBST) y se sumerge durante una hora a 25 °C en TBST/leche instantánea Carnation reconstituida de 5 % (v/v). A continuación, se lava la membrana cuatro veces con TBST durante 5 minutos. Se sumerge la membrana a 4 °C durante 16 h en TBST/BSA de 5 % (peso/volumen) en una dilución apropiada de anti-fosfo-Chk1 fosfo-Chk1 de conejo (serina 296). Posteriormente, se lava la membrana cuatro veces con TBST durante 5 minutos a 25 °C y posteriormente se sumerge a 25 °C durante 2 h en TBST/leche de 5 % que contenía una dilución apropiada de IgG de anti-conejo de mono conjugada con peroxidasa de rábano rusticano para detectar fosfo-Chk1 (ser 296). Se lava la membrana de nuevo cuatro veces con TBST durante 5 minutos a 25 °C. Se detectan los conjugados de antígeno-anticuerpo-indicador inmovilizados sobre la membrana con el reactivo de detección SuperSingal Western Femto-HRP.

Se detectan y capturan señales usando un sistema de formación imágenes FUJI LAS-4000. Se calculan intensidades de banda fosfo-Chk1 (ser 296) usando un soporte lógico "Total Lab" (Nonlinear Dynamics). Se calcula el porcentaje de inhibición de autofosforilación de Chk1 inducida por gemcitabina por medio del uso de la fórmula siguiente: % de inhibición = (muestra - intensidad de banda de fosfo-Chk1- control positivo medio de gemcitabina (Max) - intensidad de banda de fosfo-Chk1) / (control negativo medio (Min) - intensidad de banda fosfor-Chk1 - control positivo medio de gemcitabina (Max) - intensidad de banda fosfo-Chk1) x 100.

Se someten a ensayo los compuestos dentro del alcance de la invención en el presente ensayo operado sustancialmente como se ha mostrado con anterioridad. Por ejemplo, se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 3 y se encontró que tenía una Dosis 50 Eficaz Moduladora de Diana (TMED₅₀) para la autofosforilación de Chk1 de

1,3 mg/kg (n = 1). Este resultado indica que los compuestos dentro del alcance de la presente invención inhiben de manera potente la activación de la proteína quinasa Chk1 *in vivo*.

Modelos de Xenoinjerto de Tumor en Humanos

Se puede determinar la capacidad de los inhibidores de Chk1 para potenciar la muerte tumoral por medio de agentes que producen daño sobre el ADN *in vivo* usando modelos de eficacia de xenoinjerto tumoral de colon HT-20 y de pulmón Calu-6. Se someten a cultivo células de cáncer de pulmón Calu-6 en medio de crecimiento (MEM con Disolución de Sal Equilibrada de Earle con L-glutamina complementada con FBS inactivado térmicamente de 10 % (volumen/volumen), 1 x MEM amino ácidos no esenciales, 1 x piruvato de sodio) y se someten a cultivo células de

Se recolectan las células y se lavan dos veces con disolución salina tamponada con fosfato y se mezclan 5 x 10⁶ células (HT-29) ó 1 x 10⁶ células (Calu-6) en medio de crecimiento (sin suero) con un volumen igual de matriz BD Matrigel™, posteriormente se inyectan por vía subcutánea en la parte lumbar de ratones atímicos (CD-1 nu/nu).

Administración Subcutánea de Inhibidor de Chk1

Aproximadamente en el día 16 después del implante (150-200 mm³), se formula gemcitabina nueva en disolución salina diariamente y se administra a animales mediante ruta intraperitoneal a una dosis de 60 mg/kg. Veinticuatro horas después, se administró a los animales el compuesto del Ejemplo 3, en Tween-80 de 0,2 %/metilcelulosa de 0,5 %, por vía subcutánea BIS. Después de dos días de descanso, se repite la dosis durante tres ciclos adicionales (Q4Dx4 con desfase del compuesto del Ejemplo 3 + 24 horas). Se calcula la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) como la reducción en porcentaje en el tamaño medio del tumor de un grupo tratado con el compuesto a partir del tamaño medio del tumor del grupo de control tratado con el vehículo. Se someten a ensayo los compuestos dentro del alcance de la invención en este ensayo operado sustancialmente como se ha mostrado con anterioridad. Por ejemplo, se encontró que el compuesto del Ejemplo 3 dosificado en combinación con gemcitabina demuestra una excelente actividad anti-tumoral dependiente de la dosis en los modelos de xenoinjerto tumoral tanto HT-29 como Calu-6, con un aumento de hasta seis veces de la inhibición del crecimiento tumoral con respecto a gemcitabina sola. Este resultado indica que los compuestos dentro del alcance de la presente invención administrados por vía subcutánea aumentan significativamente la actividad anti-tumoral de gemcitabina en modelos de xenoinjerto en humanos.

HT29 subcutánea

Tratamiento	% de TGI en el día 38	p vs gem
Vehículo	0	ns
Gemcitabina 60 mpk	11	-
Ejemplo 3 40 mpk	26	ns
Gem/Ej 3 5 mpk	47	0,0226
Gem/Ej 3 10 mpk	55	0,0024
Gem/Ej 3 20 mpk	58	0,0008
Gem/Ej 3 40 mpk	72	< 0,0001
ns = estadísticamente no significativo		

Calu 6 subcutánea

Tratamiento	% de TGI en el día 47	p vs gem
Vehículo	0	ns
Gemcitabina 60 mpk	-41	-
Ejemplo 3 40 mpk	-19	ns
Gem/Ej 3 5 mpk	40	0,0049
Gem/Ej 3 10 mpk	32	0,0156
Gem/Ej 3 20 mpk	68	< 0,0001
Gem/Ej 3 40 mpk	81	< 0,0001
ns = estadísticamente no significativo		

Administración Oral de Inhibidor de Chk1

Aproximadamente en el día 16 después del implante (150-200 mm³), se formula gemcitabina nueva en disolución salina diariamente y se administra a animales por ruta intraperitoneal a una dosis de 40 mg/kg. Veinticuatro horas después, se administró a los animales el compuesto Chk1, en Tween-80 de 0,2 %/metilcelulosa de 0,5 %, por vía oral BID. Después de tres días de descanso, se repite la dosificación durante tres ciclos adicionales (Q5Dx4 con desfase del compuesto del Ejemplo 3 + 24 horas). Se calcula la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) como se ha

descrito en el párrafo anterior. Se someten a ensayo los compuestos dentro del alcance de la invención en este ensayo operado sustancialmente como se ha mostrado con anterioridad. Por ejemplo, se dosifica el compuesto del Ejemplo 3 en combinación con gemcitabina y se encontró que mostraba una excelente actividad anti-tumoral dependiente de la dosis en modelos de xenoinjerto tumoral tanto HT-29 como Calu-6, con un aumento de hasta 2,9 veces de la inhibición del crecimiento tumoral con respecto a gemcitabina sola. Este resultado indica que los compuestos dentro del alcance de la presente invención administrados por vía oral aumentan significativamente la actividad anti-tumoral de gemcitabina en modelos de xenoinjerto tumoral en humanos.

Calu6 oral

Tratamiento	% de TGI en el día 37	p vs gem
Vehículo	0	0,0171
Gem 40 mpk	32	-
Ejemplo 3 30 mpk	37	ns
Gem/Ej 3 15 mpk	48	0,0652
Gem/Ej 3 30 mpk	75	< 0,0001
ns = estadísticamente no significativo		

HT29 oral

Tratamiento	% de TGI en el día 50	p vs gem
Vehículo	0	ns
Gem 40 mpk	25	-
Ejemplo 3 30 mpk	39	ns
Gem/Ej 3 15 mpk	68	< 0,0001
Gem/Ej 3 30 mpk	73	< 0,0001
ns = estadísticamente no significativo		

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un compuesto que es (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.
- 2.- El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 que es (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.
- 10 3.- El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 que es sal de ácido (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amino metano sulfónico.
- 4.- El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 que es sal de ácido (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amino acético.
- 15 5.- El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 que es sal hemioxalato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.
- 20 6.- El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 que es sal hemisuccinato de (R)-[5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-2H-pirazol-3-il]-[6-(piperidin-3-iloxi)-pirazin-2-il]-amina.
- 7.- Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o una sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 8.- El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 para su uso en terapia.
- 9.- El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 30 10.- El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con radiación ionizante en el tratamiento de cáncer.
- 11.- El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con uno o más agentes de quimioterapia en el tratamiento de cáncer.
- 35 12.- El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la Reivindicación 11, en el que uno o más agentes de quimioterapia están seleccionados entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, hidroxiurea, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, doxorubicina, etoposido, cisplatino y taxol.
- 40 13. El compuesto o sal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 9-12, en el que el cáncer está seleccionado 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 ovarios, cáncer de páncreas, mesotelioma, cáncer de riñón y cáncer de útero.

45

50