

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 347**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2013 PCT/US2013/071377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14085216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2013 E 13858495 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2925888**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

28.11.2012 US 201261730795 P

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

25.01.2018

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
07065-0907 Rahway , New Jersey , US**

72 Inventor/es:

SHUMWAY, STUART DENHAM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 651 347 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

Composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de forma general a la identificación de un biomarcador cuyo nivel de expresión sea útil para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un agente antiproliferativos, en particular un inhibidor de WEE1. El nivel de expresión del biomarcador puede utilizarse para predecir un paciente que se presenta con una dolencia cancerosa que está mediada por la inhibición de la apoptosis y que es probable que responda al tratamiento con un inhibidor de WEE1.

Antecedentes de la invención

Muchos fármacos habitualmente utilizados como fármacos contra el cáncer se dirigen indiscriminadamente al ADN de células en división, y finalmente ocasionan daños en el ADN. Esto, a su vez, desencadena la activación de los puntos de control del ciclo celular que detienen la progresión del ciclo celular (en las fases G1, S o G2/M) con el fin de dejar tiempo para que el ADN se repare antes de que la célula experimente la replicación o la división del ADN. Desde un punto de vista terapéutico, la inhibición de las quinasas *checkpoint* que median en la detención del ciclo celular podrían forzar las células tumorales a continuar con la división celular antes de que se repare el daño en el ADN químicamente inducido, causando eventualmente apoptosis o catástrofe mitótica (Medema, R.H. y Macurek, L., *Oncogene*, 2012, 31(21):2601-2613). Los estudios realizados con líneas celulares respaldan dicha hipótesis, y muestras quimiosensibilización mediante la perturbación farmacológica o genética de la actividad de la quinasa *checkpoint* incluida CHK1, WEE1, ATR, y ATM. Los inhibidores de estas quinasas están en diferentes fases de desarrollo preclínico y clínico debido a su capacidad para sensibilizar las células tumorales al daño del ADN terapéutico.

La quinasa *checkpoint* WEE1 cataliza la fosforilación inhibitoria de CDK1 (CDC2) y CDK2 en la tirosina 15 (Parker, L. L. y Piwnicka-Worms, H., *Science*, 1992, 257(5078):1955-1957; Watanabe, N., et al., *Embo J.*, 1995, 14(9):1878-1891). La inhibición de CDK1 y CDK2 dependiente de WEE1 detiene el ciclo celular en respuesta al daño en el ADN inducido extrínsecamente (Hamer, P.C.D., et al., *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17(13):4200-4207). La actividad de WEE1 también es esencial para el ciclo celular sin perturbar (Mcgowan, C.H. y Russell, P., *Embo J.*, 1993, 12(1):75-85; Tominaga, Y., et al., *Intl. J. Biol. Sci.*, 2006, 2(4):161-170). Los estudios de sincronización celular en fibroblastos humanos normales reveló que se detectaron cantidades similares de proteína WEE1 en las fases S y G2/M, pero que la mayor actividad fue en la fase S del ciclo celular (Watanabe, N., 1995). Adicionalmente, después de la desactivación genética condicional de WEE1 en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), las células mostraron evidencias de inestabilidad genómica, puntos de control con mal funcionamiento, y mitosis prematura (Tominaga, *et al.*, 2006). Este fenotipo se explica en parte por hallazgos recientes que demuestran un papel fundamental de WEE1 en la síntesis de ADN. La desactivación genética de WEE1, en ausencia de agentes que dañan el ADN, conduce a una detección rápida y sólida de roturas en el ADN bicatenario específicamente en células en fase S que experimentan replicación del ADN (Beck, H., et al., *J. Cell Biol.*, 2010, 188(5):629-638; Dominguez-Kelly, R., et al., *J. Cell Biol.*, 2011, 194(4):567-579). Los datos respaldan un modelo de estabilidad genómica dependiente de WEE1 en el que la desactivación genética o la inhibición de WEE1 conduce a una elevada actividad anómala de CDK 1 y 2, que da como resultado un disparo incorrectamente temporalizado de un exceso de orígenes de replicación del ADN que rápidamente agota las reservas de nucleótidos y conduce a horquillas de replicación estancada que, en ausencia de actividad de WEE1, son sustratos de ADN exonucleasas y se resuelven en roturas del ADN bicatenario (Beck, H., *et al.*, 2012).

Se cree que la expresión o actividad desregulada de WEE1 es un hito de la patología en varios tipos de cáncer. WEE1 frecuentemente está expresado en exceso en glioblastomas, y su actividad protege este tipo de tumor de la catástrofe mitótica de forma que los elevados niveles de WEE1 están relacionados con un mal pronóstico (Mir, S.E., et al., *Cancer Cell*, 2010, 18(3):244-257). Se ha descubierto una elevada expresión de WEE1 en el melanoma maligno y está correlacionado con una baja supervivencia exenta de enfermedad en esta población (Magnussen, G.I., et al., *Plos One*, 2012, 7(6)). La expresión anómala de WEE1 se ha implicado en tipos de tumores adicionales tales como el carcinoma hepatocelular (Masaki, T., et al., *Hepatology*, 2003, 37(3):534-543), cáncer de mama (Iorns, E., et al., *Plos One*, 2009, 4(4)), carcinoma de colon (Backert, S., et al., *Intl. J. Cancer*, 1999, 82(6):868-874), carcinoma de pulmón (Yoshida, T., et al., *Annals of Oncology*, 2004, 15(2):252-256) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Wu, Z.X., et al., *Mol. & Cell. Proteomics*, 2011, 10(12)). Los tumores avanzados con un mayor nivel de inestabilidad genómica pueden requerir puntos de control funcionales para permitir la reparación de este daño letal al ADN. De esta forma, WEE1 representa una diana atractiva en tumores avanzados cuya inhibición se cree que da como resultado un daño en el ADN irreparable (Sorensen, C.S. y Syljuasen, R.G., *Nuc. Acids Res.*, 2012, 40(2):477-486).

Existe necesidad de biomarcadores que se puedan utilizar para predecir qué pacientes son adecuados para el tratamiento con terapias específicas, especialmente en pacientes que no responden o que es probable que se conviertan en resistentes a los tratamientos de primera línea. Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención

proporcionar un biomarcador predictivo para seleccionar pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor de WEE1.

El documento US 20120172370 divulga determinados inhibidores de WEE1 y su uso en el tratamiento del cáncer.

5

Sumario de la invención

La presente invención se refiere de forma general a la identificación de un biomarcador predictivo cuyo nivel de expresión sea útil para evaluar y clasificar pacientes para su tratamiento con un inhibidor de WEE1. En una realización de la invención, el biomarcador predictivo, PKMYT1, se usa para identificar pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor de WEE1, en el que el inhibidor de WEE1 es WEE1-1. En otra realización, la invención es un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con un cáncer asociado a WEE1, en el que las células cancerosas de dicho paciente se caracterizan por una baja expresión de PKMYT1. En otra realización adicional, la invención es un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un paciente de cáncer que es sensible al tratamiento con un inhibidor de WEE1, en el que las células cancerosas de dicho paciente se caracterizan por un nivel de expresión de PKMYT1 que está por debajo de un valor de referencia. En otra realización, la invención es un método para identificar inhibidores de WEE1 para su uso en el tratamiento de un cáncer asociado a la quinasa WEE1.

10

15

20

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración gráfica de la perturbación de la proliferación celular en diferentes líneas celulares tumorales mediante un inhibidor de WEE1. La proliferación durante una ventana 96 horas se analizó por triplicado para 522 líneas celulares de cáncer tratadas con una titulación de 9 puntos de WEE1-1. Los datos de la respuesta de la línea celular se descomponen en el tejido tumoral de origen, y están representados como una viabilidad fraccionada (con respecto a las células de control tratadas con DMSO) en función de la concentración de WEE1-1.

25

Las Figuras 2A y 2B son ilustraciones del daño en el ADN en fase S resultado del tratamiento con un inhibidor de WEE1, en el que las células ES-2, A2058, A431, A427, KNS62, y NCI-H460 fueron tratadas bien con DMSO (-) o concentraciones crecientes de WEE1-1 durante 2 horas. Los lisados de proteínas se analizaron mediante transferencia Western con anticuerpos dirigidos contra CHK1^{S345} fosforilada, CDK1^{Y15} fosforilada, CDK1^{T14} fosforilada, o actina como control de carga (Figura 2A). Las células TOV-21G se trataron con DMSO o WEE1-1 150 nM durante hasta 2 o 6 horas (Figura 2B). Las células se marcaron con pulsos una hora antes de recogerlas con BrdU para marcar las células en fase S que estaban experimentando replicación del ADN activamente. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar las roturas del ADN bicatenario (γ H2AX) frente al contenido de ADN total (Figura 2B, paneles de la izquierda) o γ H2AX versus la captación de BrdU (Figura 2B, paneles de la derecha). El porcentaje de células teñidas con γ H2AX representa la población celular que contienen roturas del ADN bicatenario y está indicada para cada condición de tratamiento y separada por el estado de BrdU en los paneles de la derecha.

30

35

40

Las Figuras 3A-3C son ilustraciones de los retrasos en la progresión de la fase S resultado del tratamiento con un inhibidor de WEE1. Las células ES-2 se sincronizaron después de 36 horas de retirada de suero. En las Figuras 3A y 3B, se estimularon las células para que reanudaran la ciclación con FBS al 20 % en presencia de acción de bien vehículo (DMSO) en las hileras 1-6 o WEE1-1 500 nM en las hileras 7-11. Se indica el tiempo de la recogida tras la estimulación con FBS. Una hora antes de la recogida, las células se marcaron en pulsos con BrdU y el porcentaje de células teñidas con BrdU se muestra en el panel superior. Los lisados de proteínas procedentes de las células ES-2 tratadas en paralelo se recogieron seguido de transferencia Western con los anticuerpos indicados. En comparación con el control tratado con vehículo, el tratamiento con WEE1-1 retrasa la progresión en la fase S (Figura 3A, panel superior, y la Figura 3B) y la captación de BrdU en la fase S (Figura 3A, panel superior), indicando una replicación del ADN más lenta. El tratamiento con WEE1-1 retrasa la expresión de la ciclina A e induce daño en la señalización del ADN como se evidencia por pChk1^{S345} (Figura 3A, panel inferior izquierda). La Figura 3B muestra el análisis mediante citometría de flujo en muestras seleccionadas (tratamientos de 4, 12, y 24 horas) de la parte A, comparando la tinción con BrdU y el contenido de ADN. Los datos de la Figura 3C son representativos de las células ES-2 con privación de suero a las que se añadió WEE1-1 500 nM tanto en presencia como en ausencia de FBS al 20 %. Veinticuatro horas después, el contenido de ADN y las γ H2AX (roturas del ADN bicatenario) se analizaron mediante citometría de flujo. Los porcentajes de la población total de células se proporcionan en la gráfica (Figura 3C), demostrando que WEE1-1 induce roturas del ADN bicatenario en más células cuando la población está estimulada con FBS al 20 %.

45

50

55

Las Figuras 4A y 4B ilustran que la mitosis prematura no es necesaria para inducir citotoxicidad con inhibición de WEE1. Células A2058, HT-29, y LoVo se trataron durante 24 horas bien con DMSO (-WEE1-1) o WEE1-1 en concentraciones CE₉₀ del fármaco. Se usó la citometría de flujo para identificar la población de células positivas para el marcador mitótico, la histona fosforilada H3 (pHH3^{S10}, Figura 4A) o el marcador de la rotura del ADN bicatenario γ H2AX (Figura 4B). En los paneles superiores, la rejilla de la derecha indica la población mitóticas esperada (contenido de ADN 4 N) y la rejilla de la izquierda indica las células positivas para pHH3 con un contenido inferior a ADN 4 N.

60

65

Las Figuras 5A - 5D son ilustraciones de la eficacia *in vivo* del tratamiento con WEE1-1 como agente único, en el que los ratones que portan el xenoinjerto A427 recibieron una dosis de bien el vehículo (metilcelulosa al 0,5 %) o

60 mg/kg de WEE1-1. La dosificación tanto de vehículo compuesto fue dos veces al día durante 28 días consecutivos. Los volúmenes del tumor xenoinjertado se midieron dos veces a la semana y se representaron gráficamente (promedio de volumen \pm SEM) frente a los días de tratamiento para ratones tratados con vehículo (n= 10) y WEE1-1 (n= 10) (Figura 5A). La Figura 5B muestra la representación gráfica del volumen tumoral final de los xenoinjertos A427 individuales tratados durante 28 días bien con el vehículo o MK-1775. El volumen tumoral promedio al principio del estudio fue de 164 mm³ y se indica mediante una línea discontinua. Las Figuras 5C y 5D ilustran estudios de eficacia *in vivo* adicionales realizados en modelos de xenoinjerto SK-MES-1 (C) y LoVo (D) como se describe para la Figura 5A con la excepción de que el tratamiento con WEE1-1 se detuvo el día 13 en el estudio con el xenoinjerto LoVo (que se indica mediante un asterisco) y los volúmenes tumorales se midieron durante 2 semanas más.

Las Figuras 6A y 6B ilustran que la desactivación genética de PKMYT1 aumenta selectivamente la sensibilidad a WEE1-1 y una fosforilación inhibitoria reducida de CDK1.

La Figura 6A ilustra que PKMYT1 se desactivó genéticamente en dos líneas celulares que muestran resistencia relativa a WEE1-1, H460 y KNS62. Las células se transfectaron con combinados de ARNip que contenían secuencias de control (CT) no dirigidas o secuencias PKMYT1. Las células se trataron con WEE1-1, carboplatino, un inhibidor de la MEK (PD0325901), o doxorubicina durante 72 horas antes de analizar la proliferación con el ensayo ViaLight ATP. La desactivación genética de PKMYT1 disminuyó la CE₅₀ de la proliferación para WEE1-1 en solitario, pero no para los otros compuestos ensayados. En la Figura 6B, las células KNS62 se transfectaron con combinados de ARNip del control (CT) no dirigidos o de PKMYT1 y se trataron con WEE1-1 400 nM durante los tiempos indicados.

Las Figuras 7A y 7B ilustran la escasa sensibilidad mejorada de la expresión de PKMYT1 a WEE1-1. En la Figura 7A la expresión relativa de PKMYT1 (base de datos CCLE, Broad-Novartis) se representó gráficamente contra la respuesta al tratamiento con WEE1-1 400 nM en 305 líneas celulares, cada una representada por un solo punto. La respuesta a WEE1-1 (eje x) es un valor ajustado en función de un ensayo de proliferación de 96 horas, donde un valor de 1 indica que no hay cambios en la tasa de crecimiento con respecto a las células tratadas con DMSO y un valor de 0,25 (línea vertical discontinua) o menos indica una tasa de crecimiento negativa, o muerte celular. La expresión relativa media de PKMYT1 entre las 305 líneas celulares es 413. La Figura 7B ilustra la respuesta proliferativa a WEE1-1, medida como los valores de CE₅₀ (μM), representados gráficamente frente a la expresión relativa de ARNm de PKMYT1 (panel de la izquierda) o proteína PKMYT1 (panel de la derecha) para treinta líneas celulares no incluidas en el análisis de la Figura 7A anterior.

Las Figuras 8A y 8B ilustran que la inhibición de WEE1 mediante WEE1-1 lleva a un aumento en la actividad de CDK1 y 2. Las células ES-2 se trataron durante 24 horas bien con DMSO o WEE1-1 250 nM, se recogieron y se lisaron para su análisis por transferencia Western. En la Figura 8A, los lisados se sondearon con anticuerpos individuales dirigidos contra el sustrato WEE1 (pCDK1^{Y15}), marcador DDR (pCHK1^{S345}), o sustratos CDK1 y 2 (pStathmin^{S38} y pLaminA/C^{S22}, respectivamente). En la Figura 8B, los lisados se sondearon con un anticuerpos dirigido contra el motivo del pan-sustrato CDK.

Las Figuras 9A y 9B ilustran que el daño en el ADN, inducido por el tratamiento con WEE1-1, requiere estimulación mitógena. Las células ES-2 se privaron de suero durante 36 horas, en cuyo momento, se dejaron bien sin estimular o se trataron con FBS al 20 %. Las células cultivadas en ambas condiciones recibieron bien DMSO o WEE1-1 500 nM durante 24 horas antes de su recogida para análisis por citometría de flujo del contenido de ADN (7-AAD) y las roturas del ADN bicatenario (γH2AX). La Figura 9A ilustra un histograma de la distribución del ciclo celular. La Figura 9B ilustra una gráfica de dispersión con rejillas que indican la población γH2AX. El porcentaje de células totales se indica tanto en la fase del ciclo celular o como positivo para γH2AX.

45 Descripción detallada de la invención

Muchos tratamientos contra el cáncer actúan dañando el ADN, que posteriormente inicia la respuesta al daños del ADN (DDR) y activa las quinasas *checkpoint* para detener la división mientras se repara el ADN. WEE1, una tirosina quinasa, se activa por el DDR para fosforilar e inhibir las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 1 y 2 y, de esta forma, detener la división celular. La inhibición de WEE1 potencia los tratamientos que dañan el ADN eliminando la detención del ciclo celular y la correcta reparación del ADN.

WEE1-1, también conocido como 2-alil-1-[6-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-2-il]-6-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]amino]-1,2-dihidro-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona, es un inhibidor de molécula pequeña competitivo del ATP y selectivo (Cl₅₀ = 5,2 nM) de WEE1 (Hirai, H., et al., Mol. Cancer Ther., 2009, 8(11):2992-3000) que se encuentra actualmente en desarrollo clínico como agente antitumoral combinado con sustancias quimioterapéuticas usadas en el tratamiento autorizado habitual (SOC) (Stathis, A. y Oza A., Drug News & Perspectives, 2010, 23(7):425-429; Schellens, J.H.M., et al., J. Clin.Oncol., 2011,29:2011 (supl; res. 3068); Mizuarai, S., et al., Mol. Cancer, 2009, 8:34). Estudios anteriores con WEE1-1 han demostrado su potencial como complemento o sensibilizante a las sustancias quimioterapéuticas usadas en el tratamiento autorizado habitual (SOC) por su capacidad para forzar la mitosis no programada que da finalmente como resultado la apoptosis o la catástrofe mitótica (Hirai, H., et al., Cancer Biol. & Ther., 2010, 9(7):514-522; Aarts, M., et al., Cancer Discovery, 2012, 2(6):524-539; Indovina, P. y Giordano A., Cancer Biol. & Ther., 2010, 9(7):523-525; Wang, Y.L., et al., Cancer Biol., & Ther., 2004, 3(3):305-313). Sin embargo, el potencial efecto terapéutico de la inhibición de WEE1 en ausencia de quimioterapia SOC está menos definida. La desactivación del ARNi en la proliferación de líneas de células cancerosas inhibida con WEE1 (Iorns, E., et al., Cancer Targets, 2009, Plos One, 4(4); Murrow, L.M., et al., Breast Cancer Research and Treatment, 2010,

122(2):347-357) y recientemente se ha demostrado que WEE1-1 en solitario puede inducir apoptosis en líneas celulares de sarcoma tratadas *in vitro* (Kreahling, J.M., et al., Mol. Cancer Ther., 2012, 11(1):174-182).

5 Los solicitantes del presente documento demuestran que la inhibición farmacológica de WEE1 en solitario, mediante el uso de WEE1-1 como agente único, fue citotóxica para una amplia gama de líneas celulares tumorales e indujo de manera importante roturas del ADN bicatenario. De manera notable, el daño en el ADN inducido por WEE1-1 fue independiente de la quimioterapia o la radioterapia SOC, que se produce en las células en fase S, y que se basa en la replicación del ADN activo. En las dosis toleradas, la terapia con WEE1-1 como agente único condujo a la inhibición del crecimiento del tumor xenoinjertado o a su regresión. La desactivación genética de PKMYT1, una
10 quinasa funcionalmente relacionados con WEE1, sensibilizó selectivamente las células cancerosas a WEE1-1, pero no las sensibilizó a otros agentes citotóxicos. Como se describe en este documento, la expresión de PKMYT1 estuvo por debajo de la media en aproximadamente tres cuartas partes de las líneas celulares más sensibles a WEE1-1. La selección de líneas celulares con bajos niveles de expresión de PKMYT1 fue una predicción de la sensibilidad *in vitro* de estas líneas celulares a WEE1-1. En conjunto, estos hallazgos proporcionan la base del uso de la inhibición
15 de WEE1 como un potente monoterapia contra el cáncer, y el uso de una baja expresión de PKMYT1 para identificar y seleccionar pacientes con mayor probabilidad de responder a la monoterapia con WEE1-1.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el inhibidor de WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o WEE1-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, la invención se refiere a un biomarcador predictivo, PKMYT1, cuya expresión es sensible a la inhibición de WEE1 mediante un inhibidor de WEE1. En otra realización
20 adicional, la invención se refiere a un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con un cáncer asociado a la quinasa WEE1, que necesita tratamiento para el mismo, en el que las células cancerosas de dicho paciente se caracterizan por una baja expresión de PKMYT1, y en el que dicho inhibidor de WEE1 es WEE1-1 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o WEE1-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización más, la invención es un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un
25 paciente de cáncer que es sensible al tratamiento con un inhibidor de WEE1, en el que las células cancerosas de dicho paciente se caracterizan por un nivel de expresión de PKMYT1 que está por debajo de un valor de referencia, y en el que dicho inhibidor de WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o WEE1-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, la invención es un método para identificar inhibidores de PKMYT1 para su uso en el tratamiento de un cáncer asociado a la quinasa WEE1. En otra realización
30 más, la invención es un kit para identificar pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor WEE1 que comprende reactivos que reaccionan con PKMYT1.

35 En una realización de la invención, el inhibidor de WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la invención, inhibidor de WEE1 se administra en una dosis comprendida entre 100 mg al día y 200 mg al día. En una realización de la invención, los inhibidores de WEE1 se pueden dosificar dos veces al día (BID) durante dos días y medio (para un total de 5 dosis) o una vez al día (QD) durante el ciclo de dos días (para un
40 total de 2 dosis).

El término "cáncer" al que se hace referencia en esta memoria descriptiva incluye varios sarcomas y carcinomas, e incluye cánceres sólidos y cánceres hematopoyéticos. Los cánceres sólidos a los que se hace referencia en el
45 presente documento incluyen, por ejemplo, cáncer de cerebro, cáncer cervicocerebral, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer microcítico de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de la vesícula/conducto biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de ovarios, coriocarcinoma, cáncer del cuerpo uterino, cáncer uterocervical, cáncer de la pelvis renal/uréter, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer fetal, tumor de Wilms, cáncer de piel, melanoma maligno, neuroblastoma, osteosarcoma, tumor de Ewing, sarcoma de las partes blandas. Por otra parte, el cáncer hematopoyético incluye, por ejemplo, leucemia
50 aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica, policitemia vera, linfoma maligno, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin.

La expresión "cáncer asociado a la quinasa WEE1" tal como se hace referencia en esta memoria descriptiva significa un cáncer asociado con la actividad o la inhibición de las quinastas WEE1 que incluyen, pero sin limitaciones, cáncer de cerebro, cáncer cervicocerebral, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer microcítico, cáncer no microcítico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de la vesícula/conducto biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de ovarios, coriocarcinoma, cáncer del cuerpo uterino, cáncer uterocervical, cáncer de la pelvis renal/uréter, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer fetal, cáncer de Wilms, cáncer de piel, melanoma maligno, neuroblastoma, osteosarcoma, tumor de Ewing, sarcoma de las partes blandas, leucemia aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica, linfoma de Hodgkin, o como sensibilizadores para quimioterapia o radioterapia
60 de dichos cánceres. En particular, el inhibidor de WEE1 de la invención es útil como remedio, por ejemplo, para el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovarios, leucemia aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica, linfoma de Hodgkin, o como sensibilizador para

quimioterapia o radioterapia de dichos cánceres.

La expresión "tratamiento del cáncer" tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva significa que un agente antineoplásico se administra a un paciente de cáncer para inhibir el crecimiento de las células cancerosas en el paciente. Preferentemente, el tratamiento da como resultado alguna forma de regresión del crecimiento del cáncer o dicho tratamiento retrasa o previene la recidiva del cáncer. Más preferentemente, el tratamiento da como resultado una desaparición completa del cáncer.

El término "paciente" o "sujeto" tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva significa el receptor que necesita intervención o tratamiento médico. Están incluidos pacientes y sujetos tanto mamíferos como no mamíferos.

La expresión "biomarcador predictivo" tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva significa un marcador genético cuya expresión se correlaciona con una respuesta a un agente terapéutico dado, o a una clase de agentes terapéuticos. Tal como se usa en el presente documento, el término se refiere a PKMYT1, cuya expresión se correlaciona con el efecto terapéutico de un inhibidor de WEE1. En una realización del presente documento, el inhibidor de WEE1 es WEE1-1.

"Polinucleótidos derivados de marcadores" denota el ARN transcrito a partir de un gen marcador, cualquier ADNc o ARNc producido a partir del mismo, y cualquier ácido nucleico derivado del mismo, tal como un ácido nucleico sintético que tiene una secuencia derivada del gen correspondiente al gen marcador.

Los términos "control," "nivel de control", "nivel de referencia", o "nivel de referencia predeterminado" denotan un nivel inicial independiente medido en una célula de control comparable, que puede estar o no exenta de la enfermedad. Puede proceder del mismo individuo o de otro individuo que esté normal o que no tenga la misma enfermedad para la que se obtiene la enfermedad o la muestra de ensayo. Por tanto, el "valor de referencia" puede ser un valor absoluto, un intervalo de valores, un valor promedio, un valor de mediana, un valor medio, o un valor que se compara con un valor de control o inicial concreto. Un valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, tal como, un valor obtenido de una muestra de un individuo con una quinasa WEE1 asociada al cáncer, pero en un punto temporal anterior o antes del tratamiento, o un valor obtenido a partir de una muestra de un paciente diagnosticado con un cáncer asociado a la quinasa WEE1 asociada al cáncer diferente al individuo que se está sometiendo a ensayo, o un individuo "normal", que es un individuo que no ha recibido un diagnóstico de cáncer asociado a la quinasa WEE1. El valor de referencia puede estar basado en un número de muestras, tales como de varios pacientes diagnosticados con un cáncer mediado por la quinasa WEE1, o individuos normales, o basado en una combinación de muestras que incluyen o excluyen la muestra a analizar.

El término "PKMYT1" tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva significa el gen que codifica la quinasa inhibidora CDK1 específica de treonina y específica de tirosina asociada a la membrana, una proteína que es un miembro de la familia de las serina/treonina quinasas (Liu, F., et al., Mol. Cell. Biol., 1997, 17(2):571-583, cuya secuencia se define con los números de secuencia de referencia de la NCBI NM_004203 (SEQ ID NO: 1) y NP_004194 (SEQ ID NO: 2).

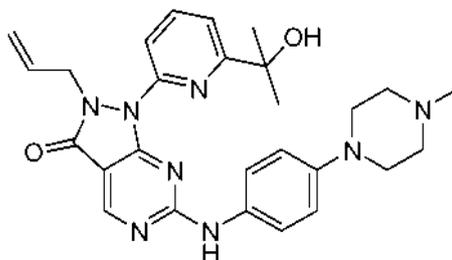
La frase "baja expresión de PKMYT1" o "PKMYT1 de baja expresión" tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva denota una célula, obtenida de una línea celular caracterizada como o de un paciente diagnosticado de cáncer, que tiene baja cantidad de ADN, ARNm o expresión de proteína de PKMYT1, o una disminución en el número de copias del gen PKMYT1, en comparación con una célula, obtenida de una línea celular caracterizada como o de un paciente no diagnosticado de cáncer.

Tal como se usa en el presente documento, las frases "medida de los niveles de expresión", "medida del nivel de expresión génica", u "obtener un nivel de expresión" y similares, incluyen métodos que cuantifican el nivel de expresión del gen diana ilustrado por el transcrito de un gen, incluido el microARN (ARNmi) o una proteína codificada por un gen, así como métodos que determinan si un gen de interés está totalmente expresado. Por tanto, un ensayo que proporciona un resultado de tipo "sí" o "no" sin proporcionar necesariamente una cuantificación de una cantidad de expresión es un ensayo que "mide la expresión" según se utiliza dicho término" en el presente documento. Como alternativa, el término puede incluir la cuantificación del nivel de expresión del gen diana expresado en un valor cuantitativo, por ejemplo, veces de cambio en la expresión, mayor o menor, con respecto a un gen de control o con respecto al mismo gen en otra muestra, o una relación logarítmica de la expresión, o cualquier representación visual de los anteriores, tal como, por ejemplo, un "mapa térmico" donde la intensidad de color es representativa de la cantidad de expresión génica detectada. Los métodos ilustrativos para detectar el nivel de expresión de un gen incluyen, aunque sin limitación, transferencia Northern, transferencias puntuales o en ranura, matriz de genes indicadores (véase por ejemplo, documento US 5.569.588), protección de nucleasa, RT-PCR, perfilado con micromatrices, presentación diferencial, SAGE (Velculescu et al., (1995), Science 270:484-87), sistema de expresión génica digital (véanse los documentos WO2007076128; WO2007076129), ensayo de ARNm multiplexado (Tian et al., (2004), Nucleic Acids Res. 32:e126), PMAGE (Kim et al., (2007), Science 316:1481-84), hibridación mediada por ADNc, ensayo de selección, extensión y unión (DASL, Bibikova, et al., (2004), AJP 165:1799-807), ensayo de ADN ramificado multiplexado (Flagella et al., (2006), Anal. Biochem. 352:50-60),

electroforesis en gel bidimensional, SELDI-TOF, ICAT, ensayo enzimático, ensayo con anticuerpos, y similares.

Inhibidores de WEE1

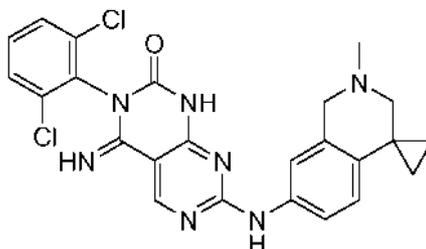
- 5 En una realización de la invención, el inhibidor de WEE1 de la presente invención es WEE1-1, cuya estructura se muestra a continuación.



WEE1-1

- 10 WEE1-1 es un inhibidor de WEE1 que es útil para el tratamiento del cáncer. WEE1-1 también se conoce como 2-alil-1-[6-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-2-il]-6-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]amino]-1,2-dihidro-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona. WEE1-1 se ha descrito en la patente de Estados Unidos n.º 7.834.019 y en la publicación internacional PCT WO2007/126122, WO 2007/126128 y WO2008/153207. Las formas cristalinas de WEE1-1 se describen en la publicación estadounidense US2010-0124544 y en la publicación internacional PCT
15 WO2011/034743.

En una realización de la invención, el inhibidor de WEE1 de la presente invención es WEE1-2, cuya estructura se muestra a continuación.



WEE1-2

- 20 WEE1-2 es un inhibidor de WEE1 que es útil para el tratamiento del cáncer. WEE1-2 también se conoce como 3-(2,6-diclorofenil)-4-imino-7-[(2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-il)amino]-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-ona. WEE1-2 se ha descrito en la publicación internacional WO2008/153207 y en la publicación estadounidense US2011-0135601. Las formas cristalinas de WEE1-2 se describen en la publicación internacional WO2009/151997 y en la publicación estadounidense US2011-0092520.

- 30 Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (como se describe en: E.L. Eliel y S.H. Wilen, Stereochemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, Nueva York, 1994, páginas 1119-1190), y aparecen como racematos, mezclas racémicas, y como diastereoisómeros individuales, con todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluyendo los isómeros ópticos, todos los estereoisómeros mencionados están incluidos en la presente invención. Además, los compuestos divulgados en este documento pueden existir como tautómeros, y se pretende que ambas formas tautoméricas están abarcadas en el alcance de la invención, incluso aunque solo se represente gráficamente una estructura tautómera.

- 35 En los compuestos descritos en la presente invención, los átomos pueden mostrar sus abundancias isotópicas naturales, o uno o más de los átomos pueden estar artificialmente enriquecidos en un isótopo particular que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra predominantemente en la naturaleza. Se pretende que la presente invención incluya todas las variaciones isotópicas adecuadas de los compuestos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, las diferentes formas isotópicas del hidrógeno (H) incluyen protio (1H) y deuterio (2H). El protio es el isótopo del hidrógeno predominante en la naturaleza. El enriquecimiento en deuterio puede dar como resultado determinadas ventajas terapéuticas, tal como una mayor semivida in vivo o una reducción en los requisitos de dosificación, o puede proporcionar un compuesto útil como patrón para caracterizar muestras biológicas. Los compuestos
40 enriquecidos isotópicamente divulgados en el presente documento se pueden preparar sin una experimentación excesiva mediante técnicas convencionales bien conocidas de los expertos en la materia o mediante procesos
45

análogos a los descritos en los Esquemas y Ejemplos del presente documento usando reactivos y compuestos intermedios adecuados isotópicamente enriquecidos.

5 Los inhibidores de WEE1 de la presente invención también pueden existir como diferentes cristales, sustancias amorfas, sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables. Adicionalmente, los inhibidores de WEE1 de la presente invención también se pueden proporcionar como profármacos. En general, dichos profármacos son derivados funcionales de los inhibidores de WEE1 de la presente invención que se pueden convertir fácilmente en compuestos necesarios para los cuerpos vivos. En consecuencia, en el tratamiento de los diferentes cánceres de la invención, el término "administración" incluye no solamente la administración de un compuesto específico, sino también la administración de un compuesto que, tras su administración a los pacientes, se pueden convertir en los compuestos específicos en los cuerpos vivos. Se describen métodos convencionales para la selección y producción de derivados de profármaco adecuados, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985, al que se hace referencia en el presente documento. Los metabolitos del compuesto pueden incluir compuestos activos que se producen introduciendo el compuesto en un entorno biológico, y están comprendidos en el alcance de los compuestos de la invención.

Determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores

A. Métodos para medir un biomarcador

20 En una realización, la invención es un biomarcador predictivo, PKMYT1, cuya expresión es sensible a la inhibición de WEE1 mediante un inhibidor de WEE1. Los niveles de expresión del biomarcador predictivo en una muestra se pueden determinar por cualquier medio conocido en la técnica. El nivel de expresión se puede determinar aislando y determinando el nivel (es decir, la cantidad) del ácido nucleico transcrito por el biomarcador. De forma alternativa o adicional, se puede determinar el nivel de proteínas específicas codificadas por el biomarcador.

30 El nivel de expresión de un biomarcador se puede conseguir determinando la cantidad de ARNm, o los polinucleótidos derivados del mismo, presentes en una muestra. Se puede usar cualquier método para determinar los niveles de ARN. Por ejemplo, el ARN se aísla de una muestra y se separa en un gel de agarosa. A continuación, el ARN separado se transfiere a un soporte sólido, tal como un filtro. A continuación, sondas de ácidos nucleicos que representan uno o más marcadores se hibridan con el filtro mediante hibridación northern, y se determina la cantidad de ARN derivado del marcador. Dicha determinación puede ser visual o auxiliada por máquinas, por ejemplo, mediante el uso de un densitómetro. Otro método para determinar los niveles de ARN es mediante el uso de una transferencia puntual o en ranura. En este método, el ARN, o el ácido nucleico derivado del mismo, procedente de una muestra, se marca. El ARN o el ácido nucleico derivado del mismo se hibrida seguidamente con un filtro que contiene oligonucleótidos derivados de uno o más genes marcadores, en el que los oligonucleótidos se disponen sobre el filtro en ubicaciones individuales fácilmente identificables. La hibridación, o carencia de la misma, del ARN marcado con los oligonucleótidos unidos al filtro se determina visualmente o mediante un densitómetro. Los polinucleótidos se pueden marcar usando una radiomarca o una etiqueta fluorescente (es decir, visible).

40 La expresión de un gen biomarcador en numerosos especímenes de tejido se puede caracterizar mediante el uso de una "matriz de tejido" (Kononen et al., Nat. Med, 1998, 4(7):844-847). En una matriz de tejido, múltiples muestras de tejido se pueden evaluar sobre la misma micromatriz. La matriz de tejido permite la detección *in situ* de los niveles de ARN y proteínas; las secciones consecutivas permiten el análisis de múltiples muestras simultáneamente.

45 Se conocen en la técnica otros métodos para determinar la abundancia de ARN.

B. Micromatrices

50 En algunas realizaciones, se pueden usar micromatrices de polinucleótidos para medir la expresión, de tal forma que el estado de expresión de cada biomarcador se evalúa simultáneamente. Cuando se utiliza este método de medición, la micromatriz preferentemente comprende al menos 2, 3, 4, 5 o más biomarcadores, o todos los biomarcadores, o cualquier combinación de biomarcadores, identificados como informativa de una clasificación dentro del subconjunto de un sujeto. El número real de los biomarcadores formativos que comprende la micromatriz variará dependiendo de la dolencia concreta de interés, el número de biomarcadores identificados y, opcionalmente, el número de biomarcadores informativos observados que proporcionan el menor error de Tipo I, error de Tipo II, o error de Tipo I y Tipo II, en la determinación de un fenotipo de valoración. Tal como se usa en el presente documento, "error de Tipo I" supone un falso positivo y un "error de Tipo II" supone un falso negativo; en el ejemplo de predecir la respuesta terapéutica de un paciente a un inhibidor de CDK, el error de Tipo I es la caracterización errónea de un individuo para el que se determina una respuesta terapéutica a un inhibidor de CDK como no sensible al tratamiento con el inhibidor de CDK, y el error de Tipo II es la caracterización errónea de un individuo sin respuesta al tratamiento con el inhibidor de CDK que presenta una respuesta terapéutica.

65 Cuando se utiliza en una realización específica, la invención proporciona matrices de polinucleótidos en los que los biomarcadores identificados para un subconjunto de sujetos pacientes comprende al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de las sondas de dicha matriz. En otra realización específica, la micromatriz

comprende una pluralidad de sondas, en la que dicha pluralidad de sondas comprenden sondas complementarias y que se pueden hibridar con al menos un 75 % de los biomarcadores informativos de la exposición/predicción del inhibidor de WEE1 identificados para un subconjunto concreto. Las micromatrices de la invención, por supuesto, pueden comprender sondas complementarias y que son capaces de hibridarse con los biomarcadores informativos de la exposición/predicción del inhibidor de WEE1 para una pluralidad de subconjuntos de sujetos, o para cada subconjunto de sujeto, identificado para una dolencia particular. De forma adicional, una micromatriz de la invención comprende una pluralidad de sondas complementarias y que se hibridan con al menos un 75 % de los biomarcadores informativos de la exposición/predicción del inhibidor de WEE1 identificados para cada subconjunto de sujetos identificados para la enfermedad de interés, y en el que dichas sondas, en total, constituyen al menos un 50 % de las sondas de dicha micromatriz.

En otra realización específica adicional, la micromatriz es una micromatriz de ADNc comercialmente disponible que comprende al menos dos biomarcadores identificados según los métodos descritos en el presente documento. Preferentemente, una micromatriz de ADNc comercialmente disponible comprende todos los biomarcadores identificados según los métodos descritos en el presente documento como informativos para un subconjunto de pacientes de una dolencia concreta. Sin embargo, dicha micromatriz puede comprender al menos 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos marcadores, hasta un máximo número de marcadores identificados.

Cualquiera de las micromatrices descritas en el presente documento se puede proporcionar en un recipiente precintado en un kit.

C. Polinucleótidos utilizados para medir los productos del biomarcador predictivo

Los polinucleótidos capaces de unirse específica o selectivamente a los transcritos de ARNm que codifican el polipéptido del biomarcador predictivo, PKMYT1, de la invención también están considerados. Por ejemplo: oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de la PCR, ADN sintético, ARN sintético, u otras combinaciones de nucleótidos de origen natural o modificados que se hibridan de forma específica y/o selectiva con uno o más de los productos de ARN del biomarcador predictivo de la invención son de utilidad de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, los oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de la PCR, ADN sintético, ARN sintético, u otras combinaciones de nucleótidos de origen natural o modificados que se hibridan tanto selectiva como específicamente a uno o más de los productos de ARN del biomarcador predictivo de la invención son de utilidad.

Para determinar el nivel de expresión (alto o bajo) de PKMYT1 en la práctica de la presente invención, se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica. En una realización de la invención, se usa la expresión basada en la detección de ARN que se hibrida con el gen identificado y divulgado en el presente documento. Estos se lleva a cabo fácilmente según cualquier método de detección o amplificación de ARN conocido o reconocido como equivalente en la técnica tales como, pero sin limitaciones, PCR con transcripción inversa, y métodos para detectar la presencia, o ausencia, de secuencias estabilizantes o desestabilizantes del ARN.

Como alternativa, se puede usar la expresión basada en la detección del estado del ADN. La detección del ADN de un gen identificado se puede utilizar para genes que tienen un aumento en la expresión que se correlaciona con un resultado concreto. Esto se puede llevar fácilmente a cabo según métodos basados en la PCR conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, Q-PCR. A la inversa, la detección del ADN de un gen identificado y amplificado se puede usar para genes que tienen un aumento en la expresión que se correlaciona con un resultado concreto del tratamiento. Esto se puede llevar fácilmente a cabo según métodos basados en la PCR, hibridación fluorescente in situ (FISH) e hibridación cromosómica in situ (CISH), conocidos en la técnica.

D. Técnicas para medir los productos de ARN de un biomarcador

1. PCR en tiempo real

En la práctica, un ensayo basado en la expresión génica basada en un pequeño número de genes, es decir, aproximadamente de 1 a 3000 se puede llevar a cabo con relativamente poco esfuerzo usando la tecnología de PCR en tiempo real ya existente con la que están familiarizados los laboratorios de análisis clínicos. La PCR en tiempo real cuantitativa mide la acumulación de productos de la PCR a través de una sonda fluorogénica doblemente marcada. Se puede usar varios métodos de normalización, tales como un competidor interno de cada secuencia diana, un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen constitutivo. Se puede aislar ARN suficiente para la PCR en tiempo real a partir de cantidades de pocos miligramos procedentes de un sujeto. Los cicladores térmicos cuantitativos se pueden usar actualmente con tarjetas de microfluidos precargadas con reactivos, lo que convierte el uso clínico rutinario de los ensayos basados en la expresión multigénica en una meta realista.

Los marcadores génicos del biomarcador predictivo de la invención o subconjunto de los mismos, que se someten a ensayo de acuerdo con la presente invención, están normalmente en forma de ARN o ARNm total o ARN o ARNm total de transcripción inversa. Los métodos generales para la extracción de ARN o ARNm total son bien conocidos en la técnica y se divulgan en libros de texto convencionales de biología molecular, incluido Ausubel et al., Current

Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997). El aislamiento del ARN también se puede realizar con un kit de purificación, conjunto de tampones, y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen (Valencia, CA) y Ambion (Austin, TX), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 La PCR cuantitativa en tiempo real TAQman se puede llevar a cabo utilizando reactivos de PCR comercialmente disponibles (Applied Biosystems, Foster City, CA) y equipos, tales como ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema consiste en un termociclador, un láser, un dispositivo acoplado a cargas (CCD), cámara y un ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pocillos o 384 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal
10 fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real mediante cables de fibra óptica de los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye un programa informático para controlar el instrumento y para analizar los datos.

Basándose en el biomarcador predictivo identificado en la presente invención, se puede usar un ensayo de PCR en tiempo real TAQman para realizar mediciones de la expresión génica y realizar los métodos de clasificación descritos en el presente documento. Como es evidente para una persona experta en la materia, una amplia variedad de cebadores y sondas de oligonucleótidos que son complementarios o se hibridan con el biomarcador predictivo de la invención se pueden seleccionar dependiendo de la secuencia del transcrito del biomarcador predictivo.

20 2. Hibridación de la matriz

El polinucleótido utilizado para medir los productos de ARN de la invención se puede usar como elementos de ácido nucleico asociados de forma estable con un soporte para comprender una matriz de acuerdo con un aspecto de la invención. La longitud de un elemento de ácido nucleico puede estar comprendido de 8 a 1000 nucleótidos de longitud, y se seleccionan de forma que sean específicos de los productos de ARN del biomarcador predictivo de la invención. En una realización, estos elementos son selectivos para los productos de ARN de la invención. Los elementos de ácido nucleico pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y/o pueden ser oligonucleótidos o fragmentos de PCR amplificados a partir de ADNc. Preferentemente, los oligonucleótidos tienen aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud. Los EST tienen preferentemente de 100 a 600 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica entenderá que se pueden utilizar partes de las regiones expresadas del biomarcador predictivo de la invención como sonda en la matriz. Más especialmente, son de utilidad los oligonucleótidos complementarios de los genes de la invención y los ADNc o EST derivados de los genes de la invención. Para matrices basadas en oligonucleótidos, la selección de los oligonucleótidos correspondientes al gen de interés que son útiles como sondas es bien conocida en la materia. Más especialmente, es importante seleccionar regiones que permitan la hibridación con los ácidos nucleicos diana. Los factores tales como la Tm del oligonucleótido, el contenido porcentual en GC, el grado de estructura secundaria, y la longitud del ácido nucleico, son factores importantes. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.551.784.

40 3. Construcción de una matriz de ácido nucleico

En los métodos propuestos, una matriz de elementos de ácido nucleico asociados de forma estable con la superficie de un soporte material se pone en contacto con una muestra que comprende ácidos nucleicos diana en condiciones de hibridación suficientes para producir un patrón de hibridación de complejos de elementos de ácido nucleico/diana complementarios en los que uno o más elementos de ácido nucleico complementarios en posiciones únicas de la matriz se hibridan específicamente con ácidos nucleicos diana. La identidad de los ácidos nucleicos diana que se hibridan se puede determinar con referencia a la ubicación de los elementos de ácido nucleico en la matriz.

Los elementos de ácido nucleico se pueden producir usando técnicas establecidas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la transcripción inversa (RT). Estos métodos son similares a los ya conocidos actualmente en la materia (véanse, por ejemplo, PCR Strategies, Michael A. Innis (Editor), et al., 1995 y PCR: Introduction to Biotechniques Series, C. R. Newton, A. Graham, 1997). Los ácidos nucleicos amplificados se purifican por métodos bien conocidos en la materia (por ejemplo, purificación en columna o precipitación con alcohol). Un ácido nucleico se considera puro cuando se ha aislado de forma que esté prácticamente exento de cebadores y productos incompletos producidos durante la síntesis de los ácidos nucleicos deseados. Preferentemente, un ácido nucleico purificado también estará prácticamente exento de contaminantes que pudieran impedir o enmascarar de otra manera la actividad de unión específica de la molécula.

Una matriz, de acuerdo con un aspecto de la invención, comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos unidos a una superficie de un soporte a una densidad que supera 20 ácidos nucleicos diferentes/cm², en el que cada uno de los ácidos nucleicos se sujeta a la superficie del soporte en una región preseleccionada no idéntica (por ejemplo, una micromatriz). Cada muestra asociada en la matriz comprende una composición de ácidos nucleicos, de identidad conocida, normalmente de secuencia conocida, que se describe con mayor detalle en lo sucesivo. En la invención se puede utilizar cualquier sustrato imaginable.

65 En una realización, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte es ADN. En una realización, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte es ADNc o ARN. En otra realización, el ácido nucleico unido a la superficie del

soporte es ADNc sintetizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Normalmente, un elemento de ácido nucleico en la matriz, de acuerdo con la invención, tiene al menos 10, 25, 50, 60 nucleótidos de longitud. En una realización, un elemento de ácido nucleico tiene al menos 150 nucleótidos de longitud. Preferentemente, un elemento de ácido nucleico tiene menos de 1000 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, un elemento de ácido nucleico tiene menos de 500 nucleótidos de longitud.

En las matrices de la invención, las composiciones de ácidos nucleicos están asociadas de forma estable a un soporte, donde el soporte puede ser un soporte flexible o rígido. Por "asociado de forma estable" se entiende que cada elemento de ácido nucleico mantiene una posición única con respecto al soporte en las condiciones de hibridación y lavado. De esta forma, las muestras están asociadas de forma estable covalentemente o no covalentemente con la superficie del soporte. Los ejemplos de asociación no covalente incluyen la adsorción no específica, unión basada en interacciones electrostáticas (por ejemplo, interacciones de pares de iones), interacciones hidrófobas, interacciones de enlace de hidrógeno, unión específica mediante un elemento enlazador específico covalentemente unido a la superficie del soporte, y similares. Los ejemplos de unión covalente incluyen enlaces covalentes formados entre los ácidos nucleicos y un grupo funcional presente sobre la superficie del soporte rígido (por ejemplo, -OH), donde el grupo funcional puede ser de origen natural o presente como elemento de un grupo enlazador introducido, que se describe con mayor detalle en lo sucesivo.

La cantidad de ácido nucleico presente en cada composición será suficiente para proporcionar una hibridación y detección adecuadas de las secuencias de ácido nucleico diana durante el ensayo en el que se utiliza la matriz. En general, la cantidad de cada elemento de ácido nucleico asociado de forma estable con el soporte de la matriz es al menos de 0,001 ng, preferentemente al menos aproximadamente 0,02 ng y más preferentemente al menos aproximadamente 0,05 ng, donde la cantidad puede ser tan alta como 1000 ng o superior, pero normalmente no supera aproximadamente 20 ng. Donde el elemento de ácido nucleico se "mancha" sobre el soporte en un punto que comprende una dimensión global circular, el diámetro del "punto" por lo general estará comprendida de aproximadamente 10 a 5,000 μm , normalmente de aproximadamente 20 a aproximadamente 2.000 μm y más normalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 μm .

Los elementos de ácido nucleico de control pueden estar presentes en la matriz incluidos los elementos de ácido nucleico que comprenden oligonucleótidos o ácidos nucleicos correspondientes a ADN genómico, genes constitutivos, secuencias de vectores, secuencia de ácidos nucleicos vegetales, genes de control positivo y negativo, y similares. Los elementos de ácido nucleico de control son genes de calibración o de control cuya función no es decir si un gen de interés "clave" concreto se expresa, sino en su lugar proporcionar otra información útil, tal como el nivel de expresión de fondo o inicial.

Otros ácidos nucleicos de control se disponen sobre la matriz y se utilizan como ácidos nucleicos de control de la expresión y nucleicos de control de emparejamiento incorrecto para vigilar la unión no específica o la hibridación cruzada con un ácido nucleico de la muestra diferente a la diana a la que se dirige la sonda. Por tanto, las sondas de emparejamientos incorrectos indican si una hibridación es específica o no. Por ejemplo, si la diana está presente, las sondas de emparejamientos correctos deberían ser coherentemente más brillantes que las de los emparejamientos incorrectos. Además, si todos los controles de emparejamientos incorrectos están presentes, las sondas de emparejamientos incorrectos se utilizan para detectar una mutación.

Se pueden usar numerosos métodos para unir los elementos de ácido nucleico de la invención al sustrato (un proceso que se denomina como "punteado"). Por ejemplo, los ácidos nucleicos se unen usando las técnicas de, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.807.522, que se ha incorporado por referencia en este documento por sus enseñanzas sobre métodos de unión del polímero. Como alternativa, el punteado se puede llevar a cabo usando tecnología de impresión de contacto como se conoce en la técnica.

La medida de la expresión del producto de ARN de la invención se puede llevar a cabo usando aquellos polinucleótidos que son específicas y/o selectivos de los productos de ARN de la invención para cuantificar la expresión del producto de ARN. En una realización específica de la invención, los polinucleótidos que son específicos y/o selectivos de los productos de ARN son sondas o cebadores. En una realización, estos polinucleótidos están en forma de sondas de ácido nucleico que se pueden puntear sobre una matriz para medir el ARN de una muestra de un individuo a medir. En otra realización, se pueden usar matrices comerciales para medir la expresión del producto de ARN. En otra realización más, los polinucleótidos que son específicos y/o selectivos de los productos de ARN de la invención se utilizan en forma de sondas y cebadores en técnicas tales como la RT PCR en tiempo real, usando, por ejemplo SYBR@Green, o usando TaqMan® o técnicas de baliza molecular, donde los polinucleótidos usados se utilizan en la forma de un cebador directo, un cebador inverso, una sonda TaqMan marcada o una sonda de baliza molecular marcada.

En realizaciones donde se van a analizar solamente uno o dos genes, el ácido nucleico derivado de una o varias células de muestra se puede amplificar preferentemente mediante el uso de cebadores adecuados de forma que solamente se van a amplificar los genes que se van a analizar para reducir las señales de fondo de otros genes expresados en la célula de mama. Como alternativa, y cuando se van a analizar múltiples genes, o donde se utilizan muy pocas células (o una célula), el ácido nucleico de la muestra se puede amplificar globalmente antes de su

hibridación con los polinucleótidos inmovilizados. Por supuesto, el ARN o su ADNc correspondiente se pueden marcar y utilizar directamente, sin amplificación, según los métodos conocidos en la técnica.

4. Uso de una micromatriz

5 Una "micromatriz" es una matriz lineal o tridimensional de regiones preferentemente discretas, teniendo cada una un área, formada sobre la superficie de un soporte sólido tal como, pero sin limitaciones, vidrio, plástico, o membrana sintética. La densidad de las regiones discretas de una micromatriz se determina por el número total de polinucleótidos inmovilizados a detectar sobre la superficie de un único soporte en fase sólida, preferentemente al menos aproximadamente 50/cm², más preferentemente al menos aproximadamente 100/cm², incluso más preferentemente al menos aproximadamente 500/cm², pero preferentemente por debajo de aproximadamente 1,000/cm². Preferentemente, las matrices contienen menos de aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 2500 o aproximadamente 3000 polinucleótidos inmovilizados en total. Tal como se usa en el presente documento, una micromatriz de ADN es una matriz de oligonucleótidos o polinucleótidos situados sobre una oblea u otras superficies utilizada para hibridarse con polinucleótidos amplificados o clonados procedentes de una muestra. Como la posición de cada grupo particular de cebadores en la matriz es conocida, las identidades de los polinucleótidos de una muestra se pueden determinar dependiendo de su unión a una posición determinada de la micromatriz.

20 La determinación de los niveles de expresión génica se puede llevar a cabo utilizando micromatrices. En general, pueden incluirse las siguientes etapas: (a) obtener una muestra de ARNm de un sujeto y preparar ácidos nucleicos marcados a partir de la misma (los "ácidos nucleicos diana" o "dianas"); (b) poner en contacto los ácidos nucleicos diana con una matriz en condiciones suficientes para que los ácidos nucleicos diana se unan a las correspondientes sondas de la matriz, por ejemplo, mediante hibridación o unión específica; (c) eliminación opcional de las dianas no unidas a la matriz; (d) detectar las dianas unidas, y (e) analizar los resultados, por ejemplo, usando métodos de análisis informatizados. Tal como se usa en el presente documento, "sondas de ácido nucleico" o "sondas" son ácidos nucleicos unidos a la matriz, mientras que los "ácidos nucleicos diana" son los ácidos nucleicos que se hibridan con la matriz.

30 Se puede obtener un espécimen de ácido nucleico de un sujeto a analizar usando métodos de muestreo "invasivos" o "no invasivos". Se dice que un muestreo es "invasivo" si implica la recogida de ácidos nucleicos del interior de la piel o los órganos de un animal (incluidos los móridos, seres humanos, óvidos, équidos, bóvidos, suínidos, cánidos o félicos). Los ejemplos de un medio de muestreo invasivo incluyen, extracción de sangre, recogida de semen, biopsia con aguja, aspiración pleural, biopsia del cordón umbilical. Los ejemplos de dichos métodos se analizan en Kim, et al., J. Virol., 1992, 66:3879-3882, Biswas, et al., Ann. NY Acad. Sci., 1990, 590:582-583, y Biswas, et al., J. Clin. Microbiol., 1991, 29:2228-2233.

40 Por el contrario, un método de muestreo "no invasivo" es aquel donde las moléculas de ácidos nucleicos se recuperan de una superficie interna o externa del animal. Los ejemplos de un medio de muestreo no invasivo incluyen, "hisopos", recogida de lágrimas, saliva, orina, material fecal, o similares.

45 En una realización de la presente invención, una o más células, es decir, una muestra, de un sujeto a analizar se obtienen y el ARN se aísla de las células. Es también posible obtener una muestra de células de un sujeto, y posteriormente enriquecer la muestra para un tipo de célula deseado. Por ejemplo, las células se pueden aislar de otras células mediante varias técnicas, tales como aislamiento con un anticuerpo que se une a un epítipo en la superficie celular del tipo de célula deseado. Cuando las células deseadas están en un tejido sólido, las células concretas se pueden extirpar, por ejemplo, mediante microextirpación o microextirpación con captura láser (LCM) (véanse por ejemplo, Bonner, et al., Science, 1997, 278:1481, Emmert-Buck, et al., Science, 1996, 274:998, Fend, et al., Am. J. Path., 1999, 154:61, y Murakami, et al., Kidney Int., 2000, 58:1346.

50 El ARN se puede extraer de las muestras de tejido o células por varios métodos, por ejemplo, lisis con tiocianato de guanidinio seguido de centrifugación con CsCl (Chirgwin, et al., Biochemistry, 1979, 18:5294-5299). El ARN de células individuales se puede obtener según se describe en los métodos para preparar bibliotecas de ADNc a partir de células individuales (véanse por ejemplo, Dulac, Curr. Top. Dev. Biol., 1998, 36:245, y Jena, et al., J. Immunol. Methods, 1996, 190:199).

60 La muestra de ARN se pueden enriquecer adicionalmente en una especie concreta. En una realización, por ejemplo, el poli(A)+ARN se puede aislar a partir de una muestra de ARN. En otra realización, la población de ARN se puede enriquecer en secuencias de interés mediante síntesis de ADNc específica de cebador, o múltiples ciclos de ampliación lineal basada en la síntesis de ADNc y transcripción in vitro dirigida por molde (véanse por ejemplo, Wang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:9717; Dulac, et al., anteriormente; Jena, et al., supra). Además, la población de ARN, enriquecida o no en especies o secuencias concretas, se puede amplificar adicionalmente mediante varios métodos de amplificación que incluyen, PCR, reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse por ejemplo, Wu y Wallace, Genomics, 1989, 4:560; Landegren, et al., Science, 1988, 241:1077), replicación de secuencia automantenida (SSR) (véanse por ejemplo, Guatelli, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:1874), amplificación de secuencia basada en ácido nucleico (NASBA) y amplificación de la transcripción (véanse por

ejemplo, Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:1173). Los métodos de la tecnología PCR son bien conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, ed. H. A. Erlich, Freeman Press, N.Y., N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila, et al., Nucleic Acids Res., 1991, 19:4967; Eckert, et al., PCR Methods and Applications, 1991, 1:17; PCR, eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford; y la patente de Estados Unidos n.º 4.683.202). Los métodos de amplificación se describen, por ejemplo, en Ohyama, et al., BioTechniques, 2000, 29:530; Luo, et al., Nat. Med., 1999, 5:117; Hegde, et al., BioTechniques, 2000, 29:548; Kacharina, et al., Meth. Enzymol., 1999, 303:3; Livesey, et al., Curr. Biol., 2000, 10:301; Spirin, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1999, 40:3108; y Sakai, et al., Anal. Biochem., 2000, 287:32. La amplificación del ARN y la síntesis de ADNc también se pueden realizar en las células in situ (véanse, por ejemplo, Eberwine, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:3010).

En otra realización más de la invención, todo o parte de la secuencia de marcadores divulgada se puede amplificar y detectar por métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de la misma, tal como, pero sin limitaciones, PCR cuantitativa (Q-PCR), PCR con transcripción inversa (RTPCR), y PCR en tiempo real, opcionalmente, RT-PCR en tiempo real. Dichos métodos utilizarían uno o dos cebadores que son complementarios de partes de una secuencia divulgada, donde los cebadores se utilizan para cebar la síntesis de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos sintetizados de nuevo opcionalmente se marcan, y se pueden detectar directamente o mediante hibridación con un polinucleótido de la invención.

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar marcadas para permitir la detección de la hibridación de las moléculas de ácido nucleico a una micromatriz. Es decir, la sonda puede comprender un miembro de un sistema productor de señal y, por tanto, es detectable, bien directamente o mediante la acción combinada con uno o más miembros adicionales de un sistema productor de señal. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden marcar con un dNTP marcado de forma fluorescente (véase, por ejemplo, Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, Calif., 1992), dNTP biotinilados, o rNTP seguido por la adición de estreptavidina marcada, marcas quimioluminiscentes, o isótopos. Otro ejemplos de marcas incluye las "balizas moleculares" que se describen en Tyagi y Kramer, Nature Biotech., 1996, 14:303. Los ácidos nucleicos nuevamente sintetizados se pueden poner en contacto con polinucleótidos (que contiene secuencias) de la invención en condiciones que permiten su hibridación. La hibridación también se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón (véase, por ejemplo, Thiel, et al., Anal. Chem., 1997, 69:4948).

En una realización, una pluralidad, por ejemplo, dos conjuntos de ácidos nucleicos diana están marcados y usados en una reacción de hibridación (análisis multiplexado). Un conjunto de ácidos nucleicos puede corresponder al ARN de una célula y otro conjunto de ácidos nucleicos puede corresponder al ARN de otra célula. La pluralidad de conjuntos de ácidos nucleicos se pueden marcar con etiquetas diferentes, tales como diferentes etiquetas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y rodamina), que pueden tener diferentes espectros de emisión, de forma que se pueden distinguir. A continuación, los conjuntos se pueden mezclar e hibridar simultáneamente a una micromatriz (véase, por ejemplo, Shena, et al., Science, 1995, 270:467-470).

Los expertos en la materia conocen numerosas configuraciones de micromatrices y métodos para su producción, y se describen en las patentes de Estados Unidos números: 5.242.974; 5.384.261; 5.405.783; 5.412.087; 5.424.186; 5.429.807; 5.436.327; 5.445.934; 5.556.752; 5.405.783; 5.412.087; 5.424.186; 5.429.807; 5.436.327; 5.472.672; 5.527.681; 5.529.756; 5.545.531; 5.554.501; 5.561.071; 5.571.639; 5.593.839; 5.624.711; 5.700.637; 5.744.305; 5.770.456; 5.770.722; 5.837.832; 5.856.101; 5.874.219; 5.885.837; 5.919.523; 6.022.963; 6.077.674; y 6.156.501; Shena, et al., Tibtech 16:301, 1998; Duggan, et al., Nat. Genet. 21:10, 1999; Bowtell, et al., Nat. Genet. 21:25, 1999; Lipshutz, et al., 21 Nature Genet. 20-24, 1999; Blanchard, et al., 11 Biosensors and Bioelectronics, 687-90, 1996; Maskos, et al., 21 Nucleic Acids Res. 4663-69, 1993; Hughes, et al., Nat. Biotechnol. (2001) 19:342; Las patentes que describen métodos para usar matrices en diferentes aplicaciones incluyen: las patentes de los Estados Unidos n.º 5.143.854; 5.288.644; 5.324.633; 5.432.049; 5.470.710; 5.492.806; 5.503.980; 5.510.270; 5.525.464; 5.547.839; 5.580.732; 5.661.028; 5.848.659; y 5.874.219.

En una realización, una matriz de oligonucleótidos se puede sintetizar sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos ilustrativos incluyen vidrio, plásticos, polímeros, metales, metaloides, cerámicas, compuestos orgánicos, etc. Usando tecnologías de enmascaramiento de chip y química fotoprotectora, es posible generar matrices ordenadas de sondas de ácido nucleico. Estas matrices, que se conocen, por ejemplo, como "chips de ADN" o matrices poliméricas a muy gran escala (matrices "VLSIPS®"), pueden incluir millones de regiones de sonda definidas sobre un sustrato que tiene un área de aproximadamente 1 cm² a varios cm², incorporando de esta forma de unos pocos a millones de sondas (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.631.734).

Para comparar los niveles de expresión, los ácidos nucleicos marcados se pueden poner en contacto con la matriz en condiciones suficientes para unirse entre el ácido nucleico diana y la sonda de la matriz. En una realización, se pueden seleccionar las condiciones de hibridación para proporcionar el nivel de especificidad de hibridación deseado; es decir, condiciones suficientes para que se produzca la hibridación entre los ácidos nucleicos marcados y las sondas de la micromatriz.

La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones que permitan esencialmente la hibridación específica. La longitud y el contenido de GS del ácido nucleico determinará el punto de fusión térmica y, por tanto, las condiciones de hibridación necesarias para obtener la hibridación específica de la sonda al ácido nucleico diana. Estos factores

5 son bien conocidos por la persona experta en la materia, y también se pueden analizar en los ensayos. Una extensa guía relativa a la hibridación de ácidos nucleicos se puede encontrar en Tijssen, et al., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y., 1993.

10 Los métodos anteriormente descritos darán como resultado la producción de patrones de hibridación de ácidos nucleicos diana marcados sobre la superficie de la matriz. Los patrones de hibridación resultantes de los ácidos nucleicos marcados se pueden visualizar o detectar de diferentes formas, donde la manera de detección concreta seleccionada se basa en la marca concreta del ácido nucleico diana. Los medios de detección representativos incluyen el recuento por centelleo, autorradiografía, medición por fluorescencia, medición calorimétrica, medición de

15 emisión de luz, dispersión de luz, y similares.

Uno de estos métodos de detección utiliza un escáner de matriz que está comercialmente disponible (Affymetrix, Santa Clara, Calif.), por ejemplo, el 417® Arrayer, el 418® Array Scanner, o el Agilent GeneArray® Scanner. El escáner se controla mediante un sistema informático con una interfaz y herramientas informáticas fáciles de usar. La salida puede importarse directamente o leerse directamente en varias aplicaciones informáticas. Los dispositivos de barrido ilustrativos se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.143.854 y 5.424.186.

20

Dosis y rutas de administración

25 Con respecto a los inhibidores de WEE1 de la invención, se pueden seleccionar diversas formas de preparación, y lo ejemplos de las mismas incluyen preparaciones orales tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos o líquidos, o preparaciones parenterales líquidas esterilizadas tales como soluciones o suspensiones, supositorios, pomadas y similares. Los inhibidores de WEE1 están disponibles como sales farmacéuticamente aceptables. Los inhibidores de WEE1 de la invención se preparan con transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

30 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" como se hace referencia en la presente memoria descriptiva significa una sal ordinaria, farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, cuando el compuesto tiene un grupo hidroxilo, o un grupo ácido tal como un grupo carboxilo y un grupo tetrazolilo, a continuación pueden formar una sal de adición de base en el grupo hidroxilo o el grupo ácido; o cuando el compuesto tiene un grupo amino o un grupo heterocíclico

35 básico, a continuación puede formar una sal de adición de ácido en el grupo amino o el grupo heterocíclico básico.

Las sales de adición de base incluyen, por ejemplo, las sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio; sales de amonio; y sales de aminas orgánicas tales como sales de trimetilamina, sales de trietilamina, sales de diciclohexilamina, sales de etanolamina, sales de dietanolamina, sales de trietanolamina, sales de procaína, sales de N,N'-dibenciletildiamina.

40

Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidratos, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos; sales de ácidos orgánicos tales como maleatos, fumaratos, tartratos, citratos, ascorbato, trifluoroacetatos; y sulfonatos tales como metanosulfonatos, isetionatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos.

45

El término "transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable" se refiere a excipientes, (por ejemplo, grasas, cera de abeja, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o hidrogenados, etc.), agua (por ejemplo, agua destilada, particularmente agua destilada para inyección, etc.), solución salina fisiológica, alcohol (por ejemplo, etanol), glicerol, polioles, solución acuosa de glucosa, manitol, aceites vegetales, etc.), y aditivos (por ejemplo, agente extensor, agente disgregante, aglutinante, lubricante, agente humectante, estabilizante, emulsionante, dispersante, conservante, edulcorante, colorante, agente sazonador o aromatizante, agente de concentración, diluyente, sustancia tampón, disolvente o agente solubilizante, sustancia química para conseguir un efecto de almacenamiento, sal para modificar la presión osmótica, agente de revestimiento o antioxidante, y similares).

50

Las preparaciones sólidas se pueden preparar en las formas de comprimidos, cápsula, gránulos y polvos sin ningún aditivo, o preparados utilizando transportadores adecuados (aditivos). Los ejemplos de dichos transportadores (aditivos) pueden incluir sacáridos tales como lactosa o glucosa; almidón de maíz, trigo o arroz; ácidos grasos tales como ácido esteárico; sales inorgánicas tales como metasilicato aluminato de magnesio o fosfato de calcio anhidro; polímeros sintéticos tales como polivinilpirrolidona o polialquilenglicol; alcoholes tales como alcohol estearílico o alcohol bencílico; derivados sintéticos de celulosa tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa; y otros aditivos usados convencionalmente tales como gelatina, talco, aceite vegetal y goma arábica.

60

Estas preparaciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos pueden generalmente contener, por ejemplo, 0,1 a 100 % en peso, y preferentemente 5 to 98 % en peso, del inhibidor WEE1, basado en el peso total de cada preparación.

5 Las preparaciones líquidas se producen en las formas de suspensión, jarabe, inyección e infusión por goteo (fluido intravenoso) utilizando aditivos adecuados que se usan convencionalmente en preparaciones líquidas, tal como agua, alcohol o un aceite derivado de planta tal como aceite de soja, aceite de cacahuete y aceite de sésamo.

10 En particular, cuando la preparación se administra parenteralmente en una forma de inyección intramuscular, inyección intravenosa o inyección subcutánea, el disolvente o diluyente adecuado puede ilustrarse mediante agua destilada para inyección, una solución acuosa de clorhidrato de lidocaína (para inyección intramuscular), solución salina fisiológica, solución acuosa de glucosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, líquida para inyección intravenosa (por ejemplo, una solución acuosa de ácido cítrico, citrato de sodio y similares) o una solución electrolítica (para infusión por goteo intravenoso e inyección intravenosa), o una solución mixta de las mismas.

15 Dicha inyección puede estar en una forma de una solución preliminarmente disuelta de un polvo per se o de un polvo asociado a un transportador adecuado (aditivo) que se disuelve en el momento del uso. La inyección líquida puede contener, por ejemplo, 0,1 a 10 % en peso de un principio activo basado en el peso total de cada preparación.

20 Las preparaciones líquidas tales como una suspensión o jarabe para la administración oral puede contener, por ejemplo, 0,1 a 10 % en peso de un principio activo basado en el peso total de cada preparación.

25 Cada preparación en la invención puede prepararse por una persona normalmente experta en la técnica de acuerdo con los métodos convencionales o las técnicas comunes. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una preparación, si la preparación es una preparación oral, por ejemplo, mezclando una cantidad adecuada del compuesto de la invención con una cantidad adecuada de lactosa y cargando esta mezcla en cápsulas de gelatina dura que son adecuadas para la administración oral. Por otra parte, la preparación puede llevarse a cabo, si la preparación que contiene el compuesto de la invención es una inyección, por ejemplo, mezclando una cantidad adecuada del compuesto de la invención con una cantidad adecuada de solución salina fisiológica al 0,9 % y cargar esta mezcla en viales para inyección.

30 Los componentes de la presente invención puede administrarse a mamíferos, incluyendo seres humanos, tanto solos como en combinación con transportadores, excipiente o diluyentes, en una composición farmacéutica, de acuerdo con una práctica farmacéutica normalizada. Los componentes pueden administrarse por vía oral o parenteral, incluyendo las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

35 Las dosificaciones adecuadas son conocidas por los especialistas médicos a cargo del tratamiento y, dependerán, por supuesto, de la patología concreta, la actividad específica de la composición que se administra, y el tratamiento que experimenta el paciente concreto. En algunos casos, para conseguir la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario proporcionar una administración repetida, es decir, las administraciones individuales repetidas de una dosis vigilada o medida concreta, donde las administraciones individuales se repiten hasta que se consigue una dosis o efecto diario deseado. A continuación se proporciona información adicional acerca de las dosificaciones adecuadas.

40 El término "administración" y variantes del mismo (por ejemplo, "administrar" un compuesto) en referencia a un componente de la invención significa introducir el componente o un profármaco del componente en el sistema del animal que necesita tratamiento. Cuando se proporciona un componente de la invención o profármaco del mismo combinado con uno o más principios activos (por ejemplo, el inhibidor de WEE1), se entiende que cada uno de "administración" y sus variantes incluyen la introducción concurrente y secuencial del componente o profármaco de mismo y otros agentes.

45 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que estimula una respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, animal o ser humano, que está siendo buscada por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico. Esto incluye un tratamiento combinado que implica el uso de múltiples agentes terapéuticos, tal como una cantidad combinada de un primer y un segundo tratamiento donde la cantidad combinada conseguirá la respuesta biológica deseada. La respuesta biológica deseada es la inhibición parcial o total, el retraso o la prevención de la progresión del cáncer incluyendo la metástasis del cáncer; la inhibición, retraso o prevención de la recurrencia del cáncer incluyendo la metástasis del cáncer; o la prevención del inicio o desarrollo del cáncer (quimioprevención) en un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

Una cantidad adecuada de un inhibidor WEE1 se administra a un paciente que experimenta tratamiento de cáncer. En una realización, se administra un inhibidor de WEE1 en dosis que varían desde aproximadamente 100 mg por día a 250 mg por día. En una realización de la invención, se administra un inhibidor de WEE1 dos veces al día (BID), durante un ciclo de dos días y medio, para un total de 5 dosis. En otra realización de la invención, se administra un inhibidor de WEE1 una vez al día (QD) durante un ciclo de dos días, para un total de 2 dosis.

En una realización de la invención, se puede administrar un inhibidor de WEE1 5 veces por semana. En otra realización de la invención, se puede administrar un inhibidor de WEE1 2 veces por semana.

10 Indicaciones

En una realización, La invención del presente documento es un inhibidore de WEE1 para su en el tratamiento de un paciente al que se ha diagnosticado un cáncer asociado a WEE1, en el que dicho paciente se caracteriza por tener una baja expresión de PKMYT1. El inhibidor de WEE1 de la invención tiene un efecto inhibidor de la quinasa, especialmente, un efecto inhibidor de la quinasa WEE1, y, de esta forma, es por tanto útil como remedio para diversos cánceres asociados con la quinasa WEE1. Los ejemplos de una quinasa WEE1 asociada a cáncer incluyen, cáncer de cerebro, cáncer cervicocerebral, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer microcítico, cáncer no microcítico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de la vesícula/conducto biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de ovarios, coriocarcinoma, cáncer del cuerpo uterino, cáncer uterocervical, cáncer de la pelvis renal/uréter, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer fetal, cáncer de Wilms, cáncer de piel, melanoma maligno, neuroblastoma, osteosarcoma, tumor de Ewing, sarcoma de las partes blandas, leucemia aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica, linfoma de Hodgkin, o como sensibilizadores para quimioterapia o radioterapia de dichos cánceres.

En particular, el inhibidor de WEE1 de la invención es útil como remedio, por ejemplo, para el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovarios, leucemia aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica, linfoma de Hodgkin, o como sensibilizador para quimioterapia o radioterapia de dichos cánceres.

Además del tratamiento de los cánceres anteriores asociados con la quinasa WEE1, el inhibidor de WEE1 puede ser también útil para el tratamiento de los siguientes cánceres: Cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; Pulmón: carcinoma broncogénico (escamocelular, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; Gastrointestinal: esófago (carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma), colon, colorrectal, rectal; Tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); Hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma reticulocelular), mieloma múltiple, cordoma maligno de tumor de células gigantes, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; Sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformans), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); Ginecológico: útero (carcinoma endometrial), cuello de útero (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma sin clasificar], tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células transparentes, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides (rabdomiosarcoma embrionario), trompas de Falopio (carcinoma); Hematológico: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin [linfoma maligno]; y Piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares llamados nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma. Por tanto, la expresión "célula cancerosa" como se proporciona en el presente documento, incluye una célula afectada por una cualquiera de las dolencias anteriormente identificadas.

Incluido además en el alcance de la invención se encuentra un inhibidor de WEE1 para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en la que está implicada la angiogénesis, que comprende administrar a un mamífero

que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación de la presente invención. Las enfermedades neovasculares oculares son un ejemplo de dolencias donde mucho del daño en el tejido resultante puede atribuirse a una infiltración anómala de vasos sanguíneos en el ojo (documento 2000/30651). La infiltración indeseable puede dispararse por la retinopatía isquémica, tal como la resultante de retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, oclusiones de las venas retinales, etc., o por enfermedades degenerativas, tales como la neovascularización coroidal observada en la degeneración macular relacionada con la edad. Inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos mediante la administración de los presentes compuestos evitaría por tanto la infiltración de los vasos sanguíneos y evita o trata enfermedades donde está implicada la angiogénesis, tales como enfermedades oculares del tipo de la vascularización retinal, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, y similares.

Incluido además en el alcance de la invención se encuentra un inhibidor de WEE1 para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad no maligna en la que está implicada la angiogénesis. Dichas enfermedades incluyen: enfermedades oculares (tales como, vascularización retinal, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad), aterosclerosis, artritis, psoriasis, obesidad y enfermedad de Alzheimer (Dredge, et al., Expert Opin. Biol. Ther., 2002, 2(8):953-966). En una realización diferente, un inhibidor de WEE1 para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en la que está implicada la angiogénesis. Dichas enfermedades incluyen: enfermedades oculares (tales como, vascularización retinal, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad), aterosclerosis, artritis y psoriasis.

Incluido además en el alcance de la invención se encuentra un inhibidor de WEE1 para uso en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tal como, reestenosis, inflamación, enfermedades autoinmunitarias, y alergia/asma.

Incluido además en el alcance de la invención está el uso de la presente combinación para revestir stents y, por lo tanto, el uso de los presentes compuestos sobre stents revestidos para el tratamiento y/o la prevención de la restenosis (documento WO 2003/032809).

Incluido además en el alcance de la invención se encuentra el uso de la presente combinación para el tratamiento y/o la prevención de la osteoartritis (documento WO 2003/035048).

Incluido además en el alcance de la invención se encuentra un inhibidor de WEE1 para uso en el tratamiento del hipoinsulinismo.

Un ejemplo de la invención es el uso del inhibidor de WEE1 descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer asociado a WEE1.

Agentes anticancerosos adicionales

El inhibidor de WEE1 administrado en los métodos de la presente invención es también útil combinado con un agente terapéutico adicional, agentes quimioterapéuticos y agentes anticancerígenos. La combinación adicional de un inhibidor de WEE1 de la presente invención con agentes terapéuticos, quimioterapéuticos y anticancerígenos está comprendida en el alcance de la invención. Se pueden encontrar ejemplos de dichos agentes en Cancer Principles and Practice of Oncology por V.T. Devita y S. Hellman (editores), 6ª edición (15 de febrero, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Una persona normalmente experta en la técnica sería capaz de discernir qué combinaciones de agentes serían útiles basándose en las características concretas de los fármacos y el cáncer implicado. Dichos agentes adicionales incluyen lo siguiente: moduladores de los receptores de estrógenos, moduladores de los receptores de andrógenos, moduladores de los receptores retinoides, agentes citotóxicos/citostáticos, agentes antiproliferativos, inhibidores de la prenil-proteína transferasa, inhibidores de la HMG-CoA reductasa y otros inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteasa de VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de la señalización de la proliferación y la supervivencia celular, bisfosfonatos, inhibidores de la aromatasa, compuestos terapéuticos de ARNip, inhibidores de la γ -secretasa, agentes que interfieren con los receptores de las tirosina quinasas (RTK) y agentes que interfieren con los puntos de control del ciclo celular. La combinación del inhibidor de mTOR y el antagonista de la integrina $\alpha\beta 3$ de la presente invención pueden ser particularmente útil cuando se administran simultáneamente con radioterapia.

"Moduladores de los receptores de estrógenos" se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión del estrógeno al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de los moduladores de los receptores de estrógenos incluyen, aunque sin limitación, tamoxifeno, raloxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopirán-3-il]-fenil)-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona, y SH646.

"Moduladores de los receptores de andrógeno" se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los andrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores de los receptores de andrógenos incluyen finasterida y otros inhibidores de la 5α -reductasa, nilutamida, flutamida, bicalutamida, liarozol, y acetato de abiraterona.

"Moduladores de los receptores retinoides" se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los retinoides al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de dichos moduladores de los receptores retinoides incluyen bexaroteno, tretinoína, ácido 13-cis-retinoico, ácido 9-cis-retinoico, α -difluorometilornitina, ILX23-7553, trans-N-(4'-hidroxifenil) retinamida, y N-4-carboxifenil retinamida.

5 "Agentes citotóxicos/citostáticos" se refiere a compuestos que producen la muerte celular o inhiben la proliferación celular principalmente interfiriendo directamente el funcionamiento de la célula o inhiben o interfieren la meiosis celular, incluyendo agentes alquilantes, factores de necrosis tumoral, intercaladores, compuestos activables por hipoxia, agentes inhibidores de los microtúbulos/estabilizantes de los microtúbulos, inhibidores de las quinesinas mitóticas, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de las quinasas implicadas en la progresión mitótica, inhibidores de las quinasas implicadas en el factor de crecimiento y rutas de transducción de la señal de las citoquinas, antimetabolitos, modificadores de la respuesta biológica, agentes terapéuticos hormonales/antihormonales, factores de crecimiento hematopoyético, agentes terapéuticos dirigidos contra anticuerpos monoclonales, inhibidores de la topoisomera, inhibidores del proteosoma, inhibidores de la ubiquitina ligasa, e inhibidores de la quinasa aurora.

Los ejemplos de agentes citotóxicos/citostáticos incluyen, sertenef, cachectina, ifosfamida, tasonermina, lonidamina, carboplatino, altretamina, prednimustina, dibromodulcitol, ranimustina, fotemustina, nedaplatino, oxaliplatino, temozolomida, heptaplatino, estramustina, tosilito de improsulfano, trofosfamida, nimustina, cloruro de dibrospidio, pumitepa, lobaplatino, satraplatino, profiromicina, cisplatino, irofulveno, dexifosfamida, cis-aminodicloro(2-metilpiridina)platino, bencilguanina, glufosfamida, GPX100, (trans, trans, trans)-bis-mu-(hexano-1,6-diamina)-mu-[diamina-platino(II)] tetracloruro de bis[diamina(cloro)platino (II)], diarizidinilespermina, trióxido de arsénico, 1-(11-dodecilamino-10-hidroxiundecyl)-3,7-dimetilxantina, zorrubicina, idarrubicina, daunorrubicina, bisantreno, mitoxantrona, pirarrubicina, pinafida, valrubicina, amrubicina, antineoplaston, 3'-desamino-3'-morfolino-13-desoxo-10-hidroxicarminomicina, anamicina, galarrubicina, elinafida, MEN10755, 4-demetoxi-3-desamino-3-aziridinil-4-metilsulfonil-daunorrubicina (véase el documento WO 00/50032), Inhibidores de la quinasa Raf (tales como Bay43-9006) e inhibidores de mTOR, tales como ridaforolimus, everolimus, temsirolimus, sirolimus o un análogo de rapamicina.

30 Un ejemplo de compuesto activado por hipoxia es tirapazamina.

Los ejemplos de inhibidores del proteosoma incluyen lactacistina y MLN-341 (Velcade).

Los ejemplos de agentes inhibidores de microtúbulos/agentes estabilizantes de microtúbulos incluyen paclitaxel, sulfato de vindesina, 3',4'-didehidro-4'-desoxi-8'-norvincalécoblastina, docetaxol, rizoxina, dolastatina, isetonato de mivobulina, auristatina, cernadotina, RPR109881, BMS184476, vinflunina, criptoficina, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil) benceno sulfonamida, anhidrovinblastina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-L-prolina-t-butilamida, TD258, los epotilonos (véanse por ejemplos patentes de Estados Unidos números 6.284.781 y 6.288.237) y BMS188797. En una realización, los epotilonos no están incluidos en los agentes inhibidores de los microtúbulos/estabilizantes de los microtúbulos.

Algunos ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa son topotecán, haptamina, irinotecán, rubitecán, 6-etoxipropionil-3',4'-O-exo-bencilideno-chartreusina, 9-metoxi-N,N-dimetil-5-nitropirazolo[3,4,5-k]acridina-2-(6H) propanamina, 1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':b,7]-indolizino[1,2b]quinolina-10,13(9H,15H)diona, lurtotecan, 7-[2-(N-isopropilamino)etil]-(20S)camptotecina, BNP1350, BNP1100, BN80915, BN80942, fosfato de etopósido, tenipósido, sobuzoxano, 2'-dimetilamino-2'-desoxi-etopósido, GL331, N-[2-(dimetilamino)etil]-9-hidroxi-5,6-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-1-carboxamida, asulacrina, (5a, 5aB, 8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(dimetilamino)etil]-N-metilamino]etil]-5-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-5,5a,6,8,8a,9-hexahidrofuro(3',4':6,7)nafto(2,3-d)-1,3-dioxol-6-ona, 2,3-(metilendioxi)-5-metil-7-hidroxi-8-metoxibenzo[c]-fenantridinio, 6,9-bis[(2-aminoetil)amino]benzo[g]isoquinolina-5,10-diona, 5-(3-aminopropilamino)-7,10-dihidroxi-2-(2-hidroxietilaminometil)-6H-pirazolo[4,5,1-de]acridin-6-ona, N-[1-[2(dietilamino)etilamino]-7-metoxi-9-oxo-9H-tioxanten-4-ilmetil]formamida, N-(2-(dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida, 6-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-3-hidroxi-7H-indeno[2,1-c]quinolin-7-ona, y dimesna.

Los ejemplos de inhibidores de quinesinas mitóticas, y en particular la quinesina mitótica humana KSP, como se describe en las publicaciones WO 2003/039460, WO 2003/050064, WO 2003/050122, WO 2003/049527, WO 2003/049679, WO 2003/049678, WO 2004/039774, WO 2003/079973, WO 2003/099211, WO 2003/105855, WO 2003/106417, WO 2004/037171, WO 2004/058148, WO 2004/058700, WO 2004/126699, WO 2005/018638, WO 2005/019206, WO 2005/019205, WO 2005/018547, WO 2005/017190, documento US 2005/0176776. En una realización, los inhibidores de las quinesinas mitóticas incluyen, inhibidores de KSP, inhibidores de MKLP1, inhibidores de CENP-E, inhibidores de MCAK, e inhibidores de Rab6-KIFL.

Los ejemplos de "inhibidores de las histonas desacetilasas" incluyen, SAHA, TSA, oxamflatina, PDX101, MG98 y scriptaid. Se pueden encontrar referencias adicionales a otros inhibidores de las histonas desacetilasas en el siguiente manuscrito; Miller, T.A., et al., J. Med. Chem., 2003, 46(24):5097-5116.

Los "inhibidores de las quinasas implicados en la progresión mitótica" incluyen, inhibidores de la quinasa aurora, inhibidores de las quinasas de tipo Polo (PLK; en inhibidores concretos de PLK-1), inhibidores de bub-1 e inhibidores de bub-R1. Un ejemplo de un "inhibidor de la quinasa aurora" es VX-680.

- 5 Los "agentes antiproliferativos" incluyen oligonucleótidos de ARN y ADN de sentido contrario tales como G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231, e INX3001, y antimetabolitos tales como encitabina, carmofur, tegafur, pentostatina, doxifluridina, trimetrexato, fludarabina, capecitabina, galocitabina, octofosfato de citarabina, fosteabina de sodio hidratada, raltitrexed, paltitrexid, emitefur, tiazofurina, decitabina, nolatrexed, pemetrexed, nelzarabina, 2'-desoxi-2'-metilidencitidina, 2'-fluorometilen-2'-dexoxicidina, N-[5-(2,3-dihidrobencofuril)sulfonil]-N'-(3,4-diclorofenil)urea, N6-[4-desoxi-4-[N2-[2(E),4(E)-tetradecadienoil]glicilamino]-L-glicero-B-L-manoheptopiranosil]adenina, aplidina, ecteinascidina, troxacitabina, ácido 4-[2-amino-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-3H-pirimidino[5,4-b][1,4]tiazin-6-il-(S)-etil]-2,5-tienoyl-L-glutámico, aminopterina, 5-fluorouracilo, alanosina, éster del ácido 11-acetil-8-(carbamoiloximetil)-4-formil-6-metoxi-14-oxa-1,11-diazatetraciclo(7.4.1.0.0)-tetradeca-2,4,6-trien-9-il acético, swainsonina, lometrexol, dexrazoxano, metioninasa, 2'-ciano-2'-desoxi-N4-palmitoil-1-B-D-arabino furanosil citosina, 3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona, y trastuzumab.

Los ejemplos de agentes terapéuticos dirigidos contra anticuerpos monoclonales incluyen aquellos agentes terapéuticos que tienen agentes citotóxicos o radioisótopos unidos a una célula cancerosa específica o aun anticuerpo monoclonal específico de una célula diana. Los ejemplos incluyen Bexxar.

- 20 "Inhibidores de la HMG-CoA reductasa" se refiere a inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. Los ejemplos de inhibidores de la HMG-CoA reductasa que se pueden usar incluyen, lovastatina (MEVACOR®; véanse las patentes de Estados Unidos números 4.231.938, 4.294.926 y 4.319.039), simvastatina (ZOCOR®; véanse las patentes de Estados Unidos números 4.444.784, 4.820.850 y 4.916.239), pravastatina (PRAVACHOL®; véanse las patentes de Estados Unidos números 4.346.227, 4.537.859, 4.410.629, 5.030.447 y 5.180.589), fluvastatina (LESCOL®; véanse las patentes de Estados Unidos números 5.354.772, 4.911.165, 4.929.437, 5.189.164, 5.118.853, 5.290.946 y 5.356.896), atorvastatina (LIPITOR®; véanse las patentes de Estados Unidos números 5.273.995, 4.681.893, 5.489.691 y 5.342.952) y cerivastatina (conocida también como rivastatina y BAYCHOL®; véase la patente de Estados Unidos 5.177.080). Las fórmulas estructurales de estos inhibidores y de inhibidores de la HMG-CoA reductasa adicionales que se pueden usar en los presentes tratamientos se describen en la página 87 de M. Yalpani, Cholesterol Lowering Drugs, Chemistry & Industry, 1996, páginas 85-89 y en las patentes de Estados Unidos números 4.782.084 y 4.885.314. La expresión inhibidor de la HMG-CoA reductasa como se usa en el presente documento incluyen todas las formas de lactonas y formas ácidas abiertas farmacéuticamente aceptables (es decir, cuando el anillo de lactona está abierto para formar el ácido libre) así como las formas salinas y ésteres de los compuestos que tienen actividad inhibitoria de la HMG-CoA reductasa, y por tanto, el uso de dichas sales, ésteres, formas ácidas abiertas y formas de lactonas se incluyen en el alcance de la presente invención.

- 35 "Inhibidor de la prenil-proteína transferasa" se refiere a un compuesto que inhibe una cualquiera o cualquier combinación de enzimas prenil-proteínas transferasas, incluyendo farnesil-proteína transferasa (FPTasa), geranilgeranil-proteína transferasa de tipo I (GGPTasa-I), y geranilgeranil-proteína transferasa de tipo-II (GGPTasa-II, denominada también Rab GGPTasa).

- 45 Se pueden encontrar ejemplos de inhibidores de la prenil-proteína transferasa en las siguientes publicaciones y patentes: WO 96/30343, WO 97/18813, WO 97/21701, WO 97/23478, WO 97/38665, WO 98/28980, WO 98/29119, WO 95/32987, patente de Estados Unidos n.º 5.420.245, patente de Estados Unidos n.º 5.523.430, patente de Estados Unidos n.º 5.532.359, patente de Estados Unidos n.º 5.510.510, patente de Estados Unidos n.º 5.589.485, patente de Estados Unidos n.º 5.602.098, publicación de patente europea 0 618 221, publicación de patente europea 0 675 112, publicación de patente europea 0 604 181, publicación de patente europea 0 696 593, WO 94/19357, WO 95/08542, WO 95/11917, WO 95/12612, WO 95/12572, WO 95/10514, patente de Estados Unidos n.º 5.661.152, WO 95/10515, WO 95/10516, WO 95/24612, WO 95/34535, WO 95/25086, WO 96/05529, WO 96/06138, WO 96/06193, WO 96/16443, WO 96/21701, WO 96/21456, WO 96/22278, WO 96/24611, WO 96/24612, WO 96/05168, WO 96/05169, WO 96/00736, patente de Estados Unidos n.º 5.571.792, WO 96/17861, WO 96/33159, WO 96/34850, WO 96/34851, WO 96/30017, WO 96/30018, WO 96/30362, WO 96/30363, WO 96/31111, WO 96/31477, WO 96/31478, WO 96/31501, WO 97/00252, WO 97/03047, WO 97/03050, WO 97/04785, WO 97/02920, WO 97/17070, WO 97/23478, WO 97/26246, WO 97/30053, WO 97/44350, WO 98/02436, patente de Estados Unidos n.º 5.532.359. Para un ejemplo del papel de un inhibidor de la prenil-proteína transferasa sobre la angiogénesis, véase, European J. of Cancer, 1999, 35(9):1394-1401.

- 60 "Inhibidores de la angiogénesis" se refiere a compuestos que inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de inhibidores de la angiogénesis incluyen, inhibidores de tirosina cinasa, tales como los inhibidores de los receptores de la tirosina quinasa Flt-1 (VEGFR1) y Flk-1/KDR (VEGFR2), inhibidores de los factores de crecimiento derivados de epidermis, derivados de fibroblastos o derivados de plaquetas, inhibidores de MMP (metaloproteasas de matriz), bloqueantes de la integrina, interferón- α , interleucina -12, polisulfato de pentosán, inhibidores de la ciclooxigenasa, incluyendo antiinflamatorios no esteroideos (AINE) de tipo aspirina e ibuprofeno, así como inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 similares a celecoxib y rofecoxib (PNAS, 1992, 89:7384; JNCI, 1982, 69:475; Arch. Ophthalmol., 1990, 108:573; Anat. Rec., 1994, 238:68; FEBS

Letters, 1995, 372:83; Clin. Orthop., 1995, 313:76; J. Mol. Endocrinol., 1996, 16:07; Jpn. J. Pharmacol., 1997, 75:105; Cancer Res., 1997, 57:1625; Cell, 1998, 93:705; Intl. J. Mol. Med., 1998, 2:715; J. Biol. Chem., 1999, 274:9116), antiinflamatorios esteroideos (tales como corticoesteroides, mineralocorticoides, dexametasona, prednisona, prednisolona, metilpred, betametasona), carboximidotriazol, combretastatina A-4, escualamina, 6-O-cloroacetil-carbonol-fumagilol, talidomida, angiostatina, troponina-1, antagonistas de la angiotensina II (véase, Fernandez, et al., J. Lab. Clin. Med., 1985, 105:141-145), y anticuerpos dirigidos contra VEGF (véase, Nature Biotechnology, 1999, 17:963-968); Kim, et al., Nature, 1993, 362:841-844; WO 2000/44777; y WO 2000/61186).

Otros agentes terapéuticos que modulan o inhiben la angiogénesis y se pueden utilizar también combinados con los compuestos de la presente invención, incluyen agentes que modulan o inhiben los sistemas de coagulación y fibrinólisis (véase la revisión en Clin. Chem. La. Med., 2000, 38:679-692). Los ejemplos de dichos agentes que modulan o inhiben las rutas de coagulación y fibrinólisis incluyen, aunque sin limitación, heparina (véase, Thromb. Haemost., 1998, 80:10-23), heparinas de bajo peso molecular e inhibidores de la carboxipeptidasa U (conocidos también como, inhibidores del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina [TAFIa]) (véase, Thrombosis Res., 2001, 101:329-354). Se han descrito inhibidores de TAFIa en la publicación internacional PCT WO 2003/013526. "Agentes que interfieren con los puntos de control del ciclo celular" se refiere a compuestos que inhiben las proteínas quinasas que transducen las señales de los puntos de control del ciclo celular, sensibilizando por tanto la célula cancerosa a los agentes que dañan el ADN. Dichos agentes incluyen inhibidores de las quinasas ATR, ATM, y CHK1 e inhibidores de las quinasas cdk y cdc y se ilustran específicamente por la 7-hidroxi-estaurosporina, flavopiridol, CYC202 (Cyclacel) y BMS-387032.

"Agentes que interfieren con los receptores de las tirosinas quinasas (RTK)" se refiere a compuestos que inhiben las RTK y por tanto los mecanismos implicados en la oncogénesis y la progresión tumoral. Dichos agentes incluyen inhibidores de c-Kit, Eph, PDGF, Flt3 y c-Met. Los agentes adicionales incluyen inhibidores de RTK, como se describe por Bume-Jensen y Hunter, Nature, 2001,411:355-365.

"Inhibidores de las rutas de señalización de la proliferación celular y señalización de la supervivencia" se refiere a los compuestos que inhiben las cascadas de transducción de la señal posteriormente a los receptores superficiales celulares. Dichos agentes incluyen inhibidores de la serina/treonina quinasas (incluyendo inhibidores de Akt tales como los descritos en los documentos WO 02/083064, WO 02/083139, WO 02/083140, US 2004-0116432, WO 02/083138, US 2004-0102360, WO 03/086404, WO 03/086279, WO 03/086394, WO 03/084473, WO 03/086403, WO 2004/041162, WO 2004/096131, WO 2004/096129, WO 2004/096135, WO 2004/096130, WO 2005/100356, WO 2005/100344, US 2005/029941, US 2005/44294, US 2005/43361, WO 2006/135627, WO 2006/091395, WO 2006/110638), inhibidores de la quinasa Raf (por ejemplo BAY-43-9006), inhibidores de MEK (por ejemplo, CI-1040 y PD-098059), inhibidores de mTOR (por ejemplo Wyeth CCI-779), e inhibidores de of PI3K (por ejemplo LY294002).

Los anticuerpos específicos dirigidos contra IGF-1R incluyen, dalotuzumab, figitumumab, cixutumumab, SHC 717454, Roche R1507, EM164 o Amgen AMG479.

Como se ha descrito anteriormente, las combinaciones con AINE se dirigen al uso de AINE, que son potentes agentes inhibidores de COX-2. Para los fines de esta memoria descriptiva, un AINE es potente si posee una CI_{50} para la inhibición de COX-2 de 1 μ M o menos como se midió mediante los ensayos celulares o microsomales.

La invención abarca también combinaciones con AINE que son inhibidores selectivos de COX-2. Para los fines de esta memoria descriptiva, los AINE que son inhibidores selectivos de COX-2 se definen como aquellos que poseen una especificidad para inhibir COX-2 sobre COX-1 de al menos 100 veces, como se midió por la relación de la CI_{50} para COX-2 sobre la CI_{50} para COX-1 evaluadas mediante los ensayos celulares o microsomales. Dichos compuestos incluyen, aunque sin limitación, los divulgados en la patente de Estados Unidos 5.474.995, patente de Estados Unidos 5.861.419, patente de Estados Unidos 6.001.843, patente de Estados Unidos 6.020.343, patente de Estados Unidos 5.409.944, patente de Estados Unidos 5.436.265, patente de Estados Unidos 5.536.752, patente de Estados Unidos 5.550.142, patente de Estados Unidos 5.604.260, patente de Estados Unidos 5.698.584, patente de Estados Unidos 5.710.140, WO 94/15932, patente de Estados Unidos 5.344.991, patente de Estados Unidos 5.134.142, patente de Estados Unidos 5.380.738, patente de Estados Unidos 5.393.790, patente de Estados Unidos 5.466.823, patente de Estados Unidos 5.633.272, y patente de Estados Unidos 5.932.598.

Los inhibidores de COX-2 que son particularmente útiles en el presente método de tratamiento son: 3-fenil-4-(4-(metilsulfonil)fenil)-2-(5H)-furanona; y 5-cloro-3-(4-metilsulfonil) fenil-2-(2-metil-5-piridinil)piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los compuestos que se han descrito como inhibidores de COX-2 y son por tanto útiles en la presente invención incluyen, los siguientes: parecoxib, BEXTRA® y CELEBREX® o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otros ejemplos de inhibidores de la angiogénesis incluyen, endostatina, ucraína, ranpirnasa, IM862, 5-metoxi-4-[2-metil-3-(3-metil-2-butenil)oxiranil]-1-oxaspiro[2,5]oct-6-il(cloroacetil)carbamato, acetildinanalina, 5-amino-1-[[3,5-dicloro-4-(4-clorobenzoil)fenil]metil]-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida, CM101, escualamina, combretastatina, RPI4610,

NX31838, manopentaosa fosfato sulfatada, 7,7-(carbonil-bis[imino-N-metil-4,2-pirrolocarbonilimino[N-metil-4,2-pirrol]-carbonilimino]-bis-(1,3-naftaleno disulfonato), y 3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il)metilen]-2-indolinona (SU5416).

5 Como se ha utilizado anteriormente, "bloqueantes de la integrina" se refiere a compuestos que antagonizan, inhiben o contrarrestan selectivamente la unión de un ligando fisiológico a la integrina $\alpha_v\beta_3$, a compuestos que antagonizan, inhiben o contrarrestan selectivamente la unión de un ligando fisiológico a la integrina $\alpha_v\beta_5$, a compuestos que antagonizan, inhiben o contrarrestan selectivamente la unión de un ligando fisiológico a la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la integrina $\alpha_v\beta_5$, y a compuestos que antagonizan, inhiben o contrarrestan la actividad de la(s) integrina(s) concreta(s) expresadas en las células endoteliales capilares. El término se refiere también a antagonistas de las integrinas $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, y $\alpha_6\beta_4$. El término se refiere también a antagonistas de cualquier combinación de las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, y $\alpha_6\beta_4$.

15 Algunos ejemplos específicos de inhibidores de las tirosinas quinasas incluyen N-(trifluorometilfenil)-5-metilisoxazol-4-carboxamida, 3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il)metilidenil]indolin-2-ona, 17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina, 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxil]quinazolona, N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina, BIBX1382, 2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-(hidroximetil)-10-hidroxi-9-metil-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1-ona, SH268, genisteína, STI571, CEP2563, sulfonato de 4-(3-clorofenilamino)-5,6-dimetil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinametano, 4-(3-bromo-4-hidroxifenil)amino-6,7-dimetoxiquinazolona, 4-(4'-hidroxifenil)amino-6,7-dimetoxiquinazolona, SU6668, STI571A, N-4-clorofenil-4-(4-piridilmetil)-1-ftalazinamina, y EMD121974.

25 Las combinaciones con compuestos diferentes que los compuestos anticancerígenos están también abarcadas en los presentes métodos. Por ejemplo, las combinaciones del inhibidor de mTOR y la combinación del antagonista de la integrina $\alpha_v\beta_3$ de la presente invención con agonistas de PPAR- γ (es decir, PPAR-gamma) y agonistas de PPAR- δ (i.e., PPAR-delta) son útiles en el tratamiento de determinadas neoplasias malignas. PPAR- γ y PPAR- δ son los receptores γ y δ activados del proliferador de peroxisomas nucleares. Se ha notificado en la bibliografía la expresión de PPAR- γ en células endoteliales y su implicación en la angiogénesis (véanse, J. Cardiovasc. Pharmacol., 1998, 31:909-913; J. Biol. Chem., 1999, 274:9116-9121; Invest. Ophthalmol Vis. Sci., 2000, 41:2309-2317). Más recientemente, Los agonistas de PPAR- γ han mostrado inhibir la respuesta angiogénica a VEGF in vitro; los maleatos de troglitazona y rosiglitazona inhiben el desarrollo de la neovascularización retinal en ratones (Arch. Ophthalmol., 2001; 119:709-717). Los ejemplos de agonistas de PPAR- γ y agonistas de PPAR- γ /a incluyen, tiazolidinodionas (tales como DRF2725, CS-011, troglitazona, rosiglitazona, y pioglitazona), fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato, GW2570, SB219994, AR-H039242, JTT-501, MCC-555, GW2331, GW409544, NN2344, KRP297, NP0110, DRF4158, NN622, GI262570, PNU182716, DRF552926, ácido 2-[(5,7-dipropil-3-trifluorometil-1,2-benzisoxazol-6-il)oxi]-2-metilpropiónico (divulgado en el documento USSN 09/782.856), y ácido 2(R)-7-(3-(2-cloro-4-(4-fluorofenoxi)propoxi)-2-etilcromano-2-carboxílico (divulgado en los documentos USSN 60/235.708 y 60/244.697).

40 Otra realización de la presente invención es el uso de los compuestos actualmente divulgados combinados con la terapia génica para el tratamiento del cáncer. Para un panorama general de las estrategias genéticas para tratar el cáncer, véase, Hall, et al., Am. J. Hum. Genet., 1997, 61:785-789 y Kufe, et al., Cancer Medicine, 5ª Ed., B.C. Decker, Hamilton, 2000, pp 876-889. Se puede usar la terapia génica para administrar cualquier gen supresor del tumor. Los ejemplos de dichos genes incluyen, p53, que se puede administrar mediante transferencia génica mediada por virus recombinante (véase la patente de Estados Unidos n.º 6.069.134), un antagonista de uPA/uPAR (Gene Therapy, 1998, 5(8): 1105-13), y el interferón gamma (J. Immunol., 2000, 164:217-222).

50 Los compuestos de la presente invención pueden también administrarse con un inhibidor de la resistencia multifármaco inherente (MDR), en particular MDR asociada con altos niveles de expresión de proteínas transportadoras. Dichos inhibidores de MDR incluyen inhibidores de la glucoproteína-p (P-gp), tales como LY335979, XR9576, OC144-093, R101922, VX853 y PSC833 (valsopodar).

55 Se puede emplear un compuesto de la presente invención junto con agentes antieméticos para tratar la náusea o la emesis, incluyendo la emesis aguda, retrasada, de fase tardía, y anticipada, que puede ser el resultado del uso de un compuesto de la presente invención, solo o con radioterapia. Para la prevención o tratamiento de la emesis, se puede utilizar un compuesto de la presente invención junto con otros agentes antieméticos, especialmente, antagonistas de los receptores de la neuroquinina-1, antagonistas de los receptores de 5HT3, tales como ondansetron, granisetron, tropisetron, y zatisetron, antagonistas de los receptores de GABAB, tales como baclofeno, un corticoesteroide tal como Decadron (dexametasona), Kenalog, Aristocort, Nasalide, Preferid, Benecorten u otros, tales como los divulgados en las patentes de Estados Unidos números 2.789.118, 2.990.401, 3.048.581, 3.126.375, 3.929.768, 3.996.359, 3.928.326 y 3.749.712, un antidopaminérgico, tal como, las fenotiazinas (por ejemplo, proclorperazina, flufenazina, tiordazina y mesoridazina), metoclopramida o dronabinol. En otra realización, se divulga el tratamiento conjunto con un agente antiemético seleccionado entre un antagonista del receptor de la neuroquinina 1, un antagonista del receptor de 5HT3 y un corticoesteroide para el tratamiento o la prevención de la emesis que pueda dar como resultado tras la administración de los presentes compuestos.

65 Se describen completamente los antagonistas de receptores de la neuroquinina-1 de uso junto con los compuestos

de la presente invención, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.162.339, 5.232.929, 5.242.930, 5.373.003, 5.387.595, 5.459.270, 5.494.926, 5.496.833, 5.637.699, 5.719.147; publicaciones de patentes europeas números EP 0 360 390, 0 394 989, 0 428 434, 0 429 366, 0 430 771, 0 436 334, 0 443 132, 0 482 539, 0 498 069, 0 499 313, 0 512 901, 0 512 902, 0 514 273, 0 514 274, 0 514 275, 0 514 276, 0 515 681, 0 517 589, 0 520 555, 0 522 808, 0 528 495, 0 532 456, 0 533 280, 0 536 817, 0 545 478, 0 558 156, 0 577 394, 0 585 913, 0 590 152, 0 599 538, 0 610 793, 0 634 402, 0 686 629, 0 693 489, 0 694 535, 0 699 655, 0 699 674, 0 707 006, 0 708 101, 0 709 375, 0 709 376, 0 714 891, 0 723 959, 0 733 632 y 0 776 893; publicaciones de patentes internacionales PCT números WO 90/05525, 90/05729, 91/09844, 91/18899, 92/01688, 92/06079, 92/12151, 92/15585, 92/17449, 92/20661, 92/20676, 92/21677, 92/22569, 93/00330, 93/00331, 93/01159, 93/01165, 93/01169, 93/01170, 93/06099, 93/09116, 93/10073, 93/14084, 93/14113, 93/18023, 93/19064, 93/21155, 93/21181, 93/23380, 93/24465, 94/00440, 94/01402, 94/02461, 94/02595, 94/03429, 94/03445, 94/04494, 94/04496, 94/05625, 94/07843, 94/08997, 94/10165, 94/10167, 94/10168, 94/10170, 94/11368, 94/13639, 94/13663, 94/14767, 94/15903, 94/19320, 94/19323, 94/20500, 94/26735, 94/26740, 94/29309, 95/02595, 95/04040, 95/04042, 95/06645, 95/07886, 95/07908, 95/08549, 95/11880, 95/14017, 95/15311, 95/16679, 95/17382, 95/18124, 95/18129, 95/19344, 95/20575, 95/21819, 95/22525, 95/23798, 95/26338, 95/28418, 95/30674, 95/30687, 95/33744, 96/05181, 96/05193, 96/05203, 96/06094, 96/07649, 96/10562, 96/16939, 96/18643, 96/20197, 96/21661, 96/29304, 96/29317, 96/29326, 96/29328, 96/31214, 96/32385, 96/37489, 97/01553, 97/01554, 97/03066, 97/08144, 97/14671, 97/17362, 97/18206, 97/19084, 97/19942 y 97/21702; y en las publicaciones de patentes británicas números 2 266 529, 2 268 931, 2 269 170, 2 269 590, 2 271 774, 2 292 144, 2 293 168, 2 293 169, y 2 302 689. La preparación de dichos compuestos se describe completamente en las patentes y publicaciones anteriormente mencionadas.

En una realización, el antagonista del receptor de la neuroquinina 1 para uso junto con los compuestos de la presente invención se selecciona entre: 2-(R)-(1-(R)-(3,5-bis (trifluorometil)fenil)etoxi)-3-(S)-(4-fluorofenil)-4-(3-(5-oxo-1H,4H-1,2,4-triazolo) metil)morfolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.719.147.

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede administrarse también con un agente útil en el tratamiento de la anemia. Dicho agente de tratamiento de la anemia es, por ejemplo, un activador continuo del receptor de la eritropoyesis (tal como Epoetina alfa).

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede administrarse también con un agente útil en el tratamiento de la neutropenia. Dicho agente de tratamiento de la neutropenia es, por ejemplo, un factor de crecimiento hematopoyético que regula la producción y función de los neutrófilos tales como el factor de estimulación de colonias de granulocitos humanos, (G-CSF). Los ejemplos de un G-CSF incluyen filgrastim.

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede administrarse también con un fármaco potenciador inmunológico, tal como levamisol, isoprinosina y Zadaxin.

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede ser también útil para tratar o prevenir el cáncer, incluyendo el cáncer de hueso, combinado con bisfosfonatos (entendiéndose que incluye los bisfosfonatos, difosfonatos, ácidos bisfosfónicos y ácidos difosfónicos). Los ejemplos de bisfosfonatos incluyen, aunque no de forma limitativa: etidronato (Didronel), pamidronato (Aredia), alendronato (Fosamax), risedronato (Actonel), zoledronato (Zometa), ibandronato (Boniva), incadronato o cimadronato, clodronato, EB-1053, minodronato, neridronato, piridronato y tiludronato incluyendo cualquiera y todas las sales farmacéuticamente aceptables, los derivados, hidratos y las mezclas de los mismos.

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede ser también útil para tratar o prevenir el cáncer de mama combinado con inhibidores de la aromatasasa. Los ejemplos de inhibidores de la aromatasasa incluyen, aunque no de forma limitativa: anastrozol, letrozol y exemestano.

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede ser también útil para tratar o prevenir el cáncer en combinación con agentes terapéuticos de ARNip.

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede administrarse también combinado con inhibidores de la γ -secretasa y/o inhibidores de la señalización de NOTCH. Dichos inhibidores incluyen los compuestos descritos en los documentos WO 01/90084, WO 02/30912, WO 01/70677, WO 03/013506, WO 02/36555, WO 03/093252, WO 03/093264, WO 03/093251, WO 03/093253, WO 2004/039800, WO 2004/039370, WO 2005/030731, WO 2005/014553, USSN 10/957.251, WO 2004/089911, WO 02/081435, WO 02/081433, WO 03/018543, WO 2004/031137, WO 2004/031139, WO 2004/031138, WO 2004/101538, WO 2004/101539 y WO 02/47671 (incluyendo LY-450139).

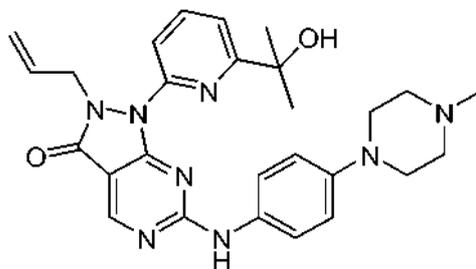
El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede ser también útil para tratar o prevenir el cáncer en combinación con inhibidores de Akt. Dichos inhibidores incluyen los compuestos descritos en, las siguientes publicaciones: WO 02/083064, WO 02/083139, WO 02/083140, US 2004-0116432, WO 02/083138, US 2004-0102360, WO 03/086404, WO 03/086279, WO 03/086394, WO 03/084473, WO 03/086403, WO 2004/041162, WO 2004/096131, WO 2004/096129, WO 2004/096135, WO 2004/096130, WO 2005/100356, WO 2005/100344, US 2005/029941, US

2005/44294, US 2005/43361, WO 2006/135627, WO 2006091395, WO 2006/110638).

El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede ser también útil para tratar o prevenir el cáncer en combinación con inhibidores de PARP.

5 La propia radioterapia significa un método ordinario en el campo del tratamiento del cáncer. Para la radioterapia, son empleables diversas radiaciones tales como rayos X, rayos γ , rayos de neutrones, haces de electrones, haces de protones; y fuentes de radiación. En una radioterapia más popular, se usa un acelerador lineal para la irradiación con radiaciones externas, rayos γ .

10 El inhibidor de WEE1 de la presente invención puede ser también útil para tratar el cáncer en una combinación adicional con los siguientes agentes terapéuticos: abarelix (Plenaxis depot®); acetato de abiraterona (Zytiga®); (Actiq®); aldesleukina (Prokine®); Aldesleukin (Proleukin®); Alemtuzumab (Campath®); HCl de alfuzosina (UroXatral®); alitretinoína (Panretin®); alopurinol (Zyloprim®); altretamina (Hexalen®); amifostina (Ethylol®); anastrozol (Arimidex®); (Anzemet®); (Anexsia®); aprepitant (Emend®); trióxido de arsénico (Trisenox®); asparaginasa (Elspar®); azacitidina (Vidaza®); clorhidrato de bendamustina (Treanda®); bevacuzimab (Avastin®); cápsulas de bexaroteno (Targretin®); gel de bexaroteno (Targretin®); bleomicina (Blenoxane®); bortezomib (Velcade®); (Brofenac®); busulfan intravenoso (Busulflex®); busulfan oral (Myleran®); cabazitaxel (Jevtana®); calusterona (Methosarb®); capecitabina (Xeloda®); carboplatino (Paraplatin®); carmustina (BCNU®, BiCNU®); carmustina (Gliadel®); carmustina con Polifeprosan 20 Implant (Gliadel Wafer®); celecoxib (Celebrex®); cetuximab (Erbix®); clorambucilo (Leukeran®); cinacalcet (Sensipar®); cisplatino (Platinol®); cladribina (Leustatin®, 2-CdA®); clofarabina (Clolar®); ciclofosfamida (Cytoxan®, Neosar®); ciclofosfamida (Cytoxan Injection®); ciclofosfamida (Cytoxan Tablet®); citarabina (Cytosar-U®); citarabina liposómica (DepoCyt®); dacarbazina (DTIC-Dome®); dactinomicina, actinomicina D (Cosmegen®); Darbepoetin alfa (Aranesp®); dasatinib (Sprycel®); daunorrubicina liposómica (DanuoXome®); daunorrubicina, daunomicina (Daunorubicin®); daunorrubicina, daunomicina (Cerubidine®); decitabina (Dacogen®); degarelix (Degarelix®); Denileukin difitox (Ontak®); denosumab (Xgeva®); dexrazoxano (Zinecard®); docetaxel (Taxotere®); doxorubicina (Adriamycin PFS®); doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®); doxorubicina (Adriamycin PFS Injection®); doxorubicina liposómica (Doxil®); propionato de dromostanolona (dromostanolone®); propionato de dromostanolona (masterone injection®); solución B de Elliott (Elliott's B Solution®); epirubicina (Ellence®); Epoetin alfa (epogen®); mesilato de eribulina (Halaven®); erlotinib (Tarceva®); estramustina (Emcyt®); fosfato de etopósido (Etopophos®); etopósido, VP-16 (Vepesid®); everolimus (Afinitor®); exemestano (Aromasin®); fentanilo bucal (Onsolis®); citrato de fentanilo (Fentora®); comprimidos de fentanilo sublingual (Abstral®); Filgrastim (Neupogen®); floxuridina (intraarterial) (FUDR®); fludarabina (Fludara®); fluorouracilo, 5-FU (Adrucil®); flutamida (Eulexin®); fulvestrant (Faslodex®); gefitinib (Iressa®); gemcitabina (Gemzar®); gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®); acetato de goserelina (Zoladex Implant®); acetato de goserelina (Zoladex®); granisetron (Kytril Solution®) (Sancuso®); acetato de histrelina (Histrelin implant®); vacuna bivalente del virus del papiloma humano (Cervarix®); hidroxirueta (Hydrea®); Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®); idarrubicina (Idamycin®); ifosfamida (IFEX®); mesilato de imatinib (Gleevec®); interferon alfa 2a (Roferon A®); Interferon alfa-2b (Intron A®); ipilimumab (Yervoy®); irinotecan (Camptosar®); (Kadian®); ixabepilona (Ixempra®); lapatinib (Tykerb®); lenalidomida (Revlimid®); letrozol (Femara®); leucovorina (Wellcovorin®, Leucovorin®); Acetato de Leuprólido (Eligard®); (Lupron Depot®); (Viadur®); levamisol (Ergamisol®); levoleucovorina (Fusilev®); lomustina, CCNU (CeeBU®); mecloretamina, mostaza de nitrógeno (Mustargen®); acetato de megestrol (Megace®); melfalán, L-PAM (Alkeran®); mercaptopurina, 6-MP (Purinethol®); mesna (Mesnex®); mesna (Mesnex tabs®); metotrexato (Methotrexate®); metoxsalen (Uvadex®); mitomicina C (Mutamycin®); mitomicina C (Mitozytrex®); mitotano (Lysodren®); mitoxantrona (Novantrone®); fenpropionato de nandrolona (Durabolin-50®); nelarabina (Arranon®); clorhidrato de nilotinib monohidratado (Tasigna®); Nofetumomab (Verluma®); ofatumumab (Arzerra®); ondansetron (Zuplenz®); Oprelvekin (Neumega®); (Neupogen®); oxaliplatino (Eloxatin®); paclitaxel (Paxene®); paclitaxel (Taxol®); partículas unidas a la proteína paclitaxel (Abraxane®); palifermina (Kepivance®); palonosetron (Aloxi®); pamidronato (Aredia®); panitumumab (Vectibix®); pazopanib (Votrient®); pegademasa (Adagen (Pegademase Bovine)®); pegaspargasa (Oncaspar®); Pegfilgrastim (Neulasta®); peginterferon alfa-2B (Sylatron®); pemetrexed disodio (Alimta®); pentostatina (Nipent®); pipobroman (Vercyte®); inyección de plerixafor (Mozobil®); plicamicina, mitramicina (Mithracin®); porfímero de sodio (Photofrin®); inyección de pralatrexato (Foloty®); procarbazona (Matulane®); (Quadramet®); vacuna recombinante del virus del papiloma humano cuadrivalente (tipos 6, 11, 16, 18) (Gardasil®); quinacrina (Atabrine®); clorhidrato de raloxifeno (Evista®); Rasburicase (Elitek®); Rituximab (Rituxan®); romidepsina (Istodax®); sargramostim (Leukine®); Sargramostim (Prokine®); secretina (SecreFlo®); sipuleucel-T (Provenge®); sorafenib (Nexavar®); estreptozocina (Zanosar®); maleato de sunitinib (Sutent®); talco (Sclerosol®); tamoxifeno (Nolvadex®); temozolomida (Temodar®); temsirolimus (Torisel®); tenipósido, VM-26 (Vumon®); (Temodar®); testolactona (Teslac®); talidomida (Thalomid®); tioguanina, 6-TG (Thioguanine®); tiotepa (Thioplex®); topotecan (Hycamtin®); toremifeno (Fareston®); Tositumomab (Bexxar®); Tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®); Trastuzumab (Herceptin®); (Trelstar LA®); tretinoína, ATRA (Vesanoid®); pamoato de triptorelina (Trelstar Depot®); (UltraJect®); Mostaza de Uracilo (Uracil Mustard Capsules®); valrubicina (Valstar®); vandetanib (Vandetanib®); vinblastina (Velban®); vincristina (Oncovin®); vinorelbina (Navelbine®); vorinostat (Zolinza®); (Zofran ODT®); y zoledronato (Zometa®).

Ejemplos**Ejemplo 1**5 Preparación de WEE1-110 Producción de 2-alil-1-[6-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-2-il]-6-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil-1-amino]-1,2-dihidro-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona

Etapa 1) Producción de 2-(6-bromo-2-piridinil)-2-propanol:

15 En una atmósfera de nitrógeno, 30 ml de yoduro de metil magnesio 3 M en dietil éter se añadieron a 300 ml de una solución de dietil éter de 8,72 g de 6-bromopiridina-2-carboxilato de metilo. Se añadieron agua y ácido clorhídrico 2 N al líquido de reacción, y se extrajo con acetato de etilo. Este se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua salina saturada, y se secó con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida para obtener 2-(6-bromo-2-piridinil)-2-propanol en bruto en forma de una sustancia oleosa de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,56 (1H, t, J=7,8 Hz), 7,38 (1H, dd, J = 7,8, 1,0 Hz), 7,36 (1H, dd, J = 7,8, 1,0 Hz), 1,55 (6H, s). IEP-EM Encontrado: m/z[M+H]⁺ 216, 218.

Etapa 2) Producción de 2-alil-1-[6-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-piridinil]-6-(metiltio)-1,2-dihidro-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona:

25 El compuesto del título se obtuvo de la misma forma que en Ejemplo preparativo 1-1, para el cual, sin embargo, el compuesto obtenido en la reacción anterior se usó en lugar de la 2-yodopiridina usada en el Ejemplo preparativo 1-1. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,95 (1H, s), 7,91 (1H, t, J=8,0 Hz), 7,76 (1H, d, J=7,3 Hz), 7,40 (1H, dd, J = 7,8, 1,0 Hz), 5,70 (1H, ddt, J=17,1, 10,2, 6,3 Hz), 5,06 (1H, dd, J = 10,2, 1,0 Hz), 4,93 (1H, dd, J = 17,1, 1,2 Hz), 4,81 (2H, d, J=6,3 Hz), 2,59 (4H, s), 1,59 (6H, s). IEP-EM Encontrado: m/z[M+H]⁺: 358.

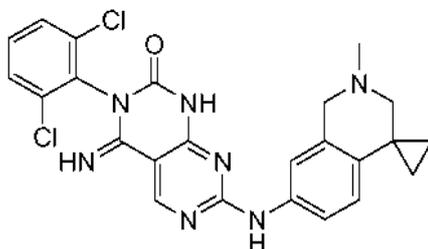
Etapa 3) Producción de 2-alil-1-[6-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-2-il]-6-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]amino]-1,2-dihidro-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona:

35 817 mg de ácido m-cloroperbenzoico (> 65 %) se añadió a una solución de tolueno (20 ml) de 1,10 g del producto anterior, y se agitó durante 20 minutos. 1,61 ml de N,N-diisopropiletilamina y 706 mg de 4-(4-metilpiperazin-1-il)anilina se añadieron al líquido de reacción, y se agitó durante la noche. Se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio al líquido de reacción, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con una solución de agua salina saturada, y se secó con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se evaporó, y el residuo que se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice básica (hexano/acetato de etilo = 1/1 a 0/1, acetato de etilo/etanol = 98/2). Tras concentrar, esta se recristalizó en acetato de etilo para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,83 (1H, s), 7,86 (1H, dd, J = 8,0, 7,8 Hz), 7,75 (1H, d, J=7,3 Hz), 7,49 (1H, s a), 7,48 (2H, d, J=9,0 Hz), 7,34 (1H, d, J=7,4 Hz), 6,93 (2H, d, J=9,0 Hz), 5,70 (1H, ddt, J=17,2, 10,0, 6,5 Hz), 5,04 (1H, d, J=10,0 Hz), 4,94 (1H, d, J=17,2 Hz), 4,74 (2H, d, J=6,5 Hz), 3,26 (4H, t, J=4,8 Hz), 2,73 (4H, s a), 2,44 (3H, s), 1,59 (6H, s). IEP-EM Encontrado: m/z[M+H]⁺ 501.

45 Ejemplo preparativo 1-1

Producción de 2-alil-6-(metiltio)-1-piridin-2-il-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona:

50 2,4 ml of N,N'-dimetiletilendiamina se añadieron a una solución de 1,4-dioxano (50 ml) de 4,44 g de 2-alil-6-(metiltio)-1,2-dihidro-3H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ona, 3,80 g de yoduro de cobre(I), 5,33 g de 2-yodopiridina y 3,80 g de carbonato de potasio, y se agitó durante toda la noche a 95 °C. El líquido de reacción se enfrió, se añadió a lo anterior una solución acuosa de amoníaco, y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con una solución de agua salina saturada, y se secó con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida, y se cristalizó en acetato de etilo para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,94 (1H, s), 8,52 (1H, d, J=5,1 Hz), 7,90 (2H, d, J=3,5 Hz), 7,29-7,25 (1H, m), 5,68 (1H, ddt, J=17,0, 10,2, 6,3 Hz), 5,05 (1H, d, J=10,2 Hz), 4,91 (1H, d, J=17,0 Hz), 4,85 (1H, d, J=6,3 Hz), 2,58 (3H, s).

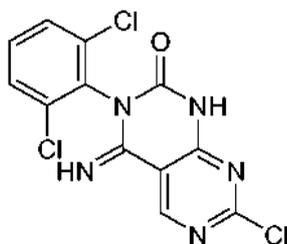
Ejemplo 2Preparación de WEE 1-2

5

Producción de 3-(2,6-diclorofenil)-4-imino-7-[(2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-il)amino]-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-ona

- 10 Una solución de 1-butanol de 1,5 g de 7-cloro-3-(2,6-diclorofenil)-4-imino-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-ona obtenida en el Ejemplo preparativo 2-1, 1 g de 2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-amina obtenida en el Ejemplo preparativo 2-2, y 0,83 g de ácido p-toluenosulfónico monohidrato se agitó a 90 °C durante 15 minutos. El líquido de reacción se enfrió, se diluyó con cloroformo, y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y a continuación con agua salina saturada, y se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró, y el disolvente se evaporó. Así obtenido, el compuesto mal purificado se purificó mediante una columna de cromatografía de gel de sílice para obtener 3-(2,6-diclorofenil)-4-imino-7-[(2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-il)amino]-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-ona. Esta se disolvió en un disolvente mixto cloroformo/metanol, y 1,5 equivalentes de la solución acuosa de ácido clorhídrico se añadieron a lo anterior, y se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, el disolvente se eliminó por evaporación, y el residuo se lavó con acetato de etilo para obtener diclorhidrato de 3-(2,6-diclorofenil)-4-imino-7-[(2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-il)amino]-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-ona en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11,83 (1H, s a), 10,05 (1H, s a), 9,10 (1H, s), 8,88 (1H, s), 7,79-7,68 (1H, m), 7,63-7,59 (2H, m), 7,47 (1H, t, J=8,2 Hz), 7,38 (1H, d, J=8,3 Hz), 6,63 (1H, d, J=8,5 Hz), 3,59 (2H, s), 2,44 (2H, s), 2,32 (3H, s), 0,90-0,81 (4H, m) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H]⁺ 494

25

Ejemplo preparativo 2-1

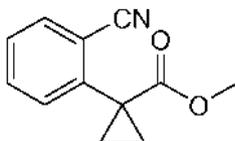
- 30 Producción de 7-cloro-3-(2,6-diclorofenil)-4-imino-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-ona

- 1,12 g de hidruro de sodio se añadieron a una solución de N,N-dimetilformamida (35 ml) de 3,0 g de 4-amino-2-cloropirimidina-5-carbonitrilo, y se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. 4,38 g de isocianato de 2,6-diclorofenilo se añadieron al líquido de reacción, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron acetato de etilo y una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N a la solución de reacción, y la capa orgánica se lavó. Esta se lavó con agua salina saturada, se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se eliminó mediante evaporación. El sólido precipitado se solidificó en un disolvente mixto de metanol/acetato de etilo, y se capturó mediante filtración para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9, (1H, s), 7,66 (2H, d, J=8,2 Hz), 7,53 (1H, t, J=8,2 Hz) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H]⁺ 342

40

Ejemplo preparativo 2-2

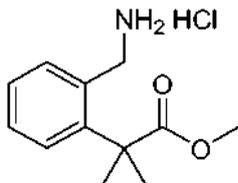
Producción de 2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-amina



45

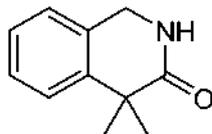
Etapa 1) Producción de 1-(2-cianofenil)ciclopropanocarboxilato de metilo:

1,5 g de bromuro de tetra-n-butilamonio, 6,5 g de 1,2-dibromoetano y 20 ml de una solución acuosa al 50 % de hidróxido sódico se añadieron a una solución de tolueno (40 ml) de 4,0 g de 2-cianofenilacetato de metilo, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua al líquido de reacción, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua salina saturada, se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo) para obtener el compuesto del título en forma de un compuesto incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,66 (1H, dd, J = 7,6, 1,2 Hz), 7,55 (1H, td, J = 7,6, 1,2 Hz), 7,43-7,36 (2H, m), 3,66 (3H, s), 1,82 (2H, c, J=3,7 Hz), 1,30 (2H, c, J=3.7 Hz) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 202



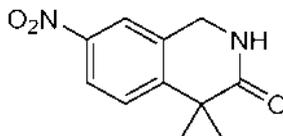
Etapa 2) Producción de monoclorohidrato 1-[2-(aminometil)fenil]ciclopropanocarboxilato de metilo:

1,6 g de paladio al 10 % sobre carbono se añadió a una solución de etanol (50 ml) de 2,95 g del compuesto obtenido en la Etapa 1) de la reacción anterior, y se agitó con dos atmósferas de presión de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. El complejo de paladio-carbono se eliminó mediante filtración, el filtrado se concentró a presión reducida, y el producto en bruto se lavó con éter dietílico para obtener el compuesto del título en forma de un sólido incoloro. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,47 (2H, s), 7,55 (1H, d, J=6,8 Hz), 7,38 (3H, td, J = 7,2, 2,1 Hz), 7,36-7,29 (2H, m), 4,04 (2H, d, J=4,9 Hz), 3,54 (3H, s), 1,61-1,56 (2H, m), 1,33-1,29 (2H, m) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 206



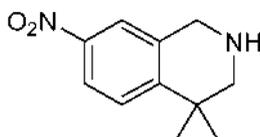
Etapa 3) Producción de 1',2'-dihidro-3'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-3'-ona:

4 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 5 N se añadieron a una solución de metanol (50 ml) de 3,2 g del compuesto obtenido en la Etapa 2) de la reacción anterior, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta se neutralizó con una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N, y el metanol se evaporó a presión reducida. El residuo se diluyó con agua, y se extrajeron tres veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua salina saturada, se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto del título en forma de un sólido incoloro. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,23 (1H, td, J = 7,8, 1,1 Hz), 7,18 (1H, td, J = 7,3, 1,1 Hz), 7,10 (1H, dd, J = 7,3, 1,0 Hz), 6,73 (1H, dd, J = 7,8, 1,0 Hz), 4,69 (2H, d, J=1,5 Hz), 1,85 (2H, c, J=3,7 Hz), 1,24 (2H, c, J=3.7 Hz) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 174



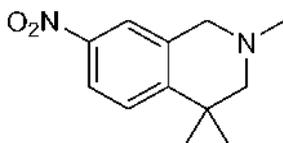
Etapa 4) Producción de 7'-nitro-1',2'-dihidro-3'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-3'-ona:

1,3 g de nitrato de potasio se añadieron por partes a una solución de ácido sulfúrico (60 ml) de 2,1 g del compuesto obtenido en la anterior reacción 3), lo que tardó 5 minutos, y se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 10 minutos. La líquido de reacción se vertió en agua/hielo, el cristal precipitado se capturó mediante filtración, y se lavó con agua para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 8,09 (1H, dd, J = 8,8, 2,4 Hz), 8,01 (1H, t, J=2,4 Hz), 6,86 (1H, d, J=8,8 Hz), 6,30 (1H, s), 4,78 (2H, d, J=1,5 Hz), 2,01 (2H, c, J=4,1 Hz), 1,35 (2H, c, J=4.1 Hz) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 219



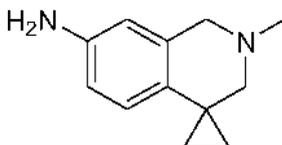
Etapa 5) Producción de 7'-nitro-1',2'-dihidro-3'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolina]:

5 Con enfriamiento con hielo, 6,3 g de complejo de boro triflururodielil éter se añadió a una suspensión de tetrahidrofurano de 1,3 g de borohidruro de sodio, y se agitó durante 1 hora. Una solución en tetrahidrofurano (100 ml) de 2,4 g del compuesto obtenido en la reacción de la Etapa 4) anterior se añadió al líquido de reacción y se calentó a temperatura de reflujo durante 2 horas. El líquido de reacción se enfrió, y a continuación se neutralizó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en etanol, se añadió al mismo ácido clorhídrico 5 N, y se calentó a temperatura de reflujo durante 1 hora. El líquido de reacción se enfrió, a continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo se neutralizó con una solución acuosa de carbonato de potasio. La capa acuosa se extrajo con cloroformo, la capa orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto del título. IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 205



Etapa 6) Producción de 2'-metil-7'-nitro-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolina]:

20 1,5 g de cianoborohidruro de sodio se añadieron a una solución de metanol (50 ml) del compuesto (2,3 g) obtenido en la reacción de la Etapa 5 anterior), 2,7 ml de una solución acuosa de formaldehído al 37 %, y 0,7 ml de ácido acético, y se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. El líquido de reacción se neutralizó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y el metanol se evaporaron a presión reducida. El residuo se diluyó con agua y se extrajo tres veces con cloroformo. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a presión reducida, y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo) para obtener el compuesto del título en forma de un sólido incoloro. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,97 (1H, dd, J = 8,8, 2,4 Hz), 7,91 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,78 (1H, d, J=8,8 Hz), 3,77 (2H, s), 2,57 (2H, s), 2,48 (3H, s), 1,16-1,12 (2H, m), 1,10-1,06 (2H, m) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 219



Etapa 7) Producción de 2'-metil-2',3'-dihidro-1'H-spiro[ciclopropano-1,4'-isoquinolin]-7'-amina:

35 800 mg de paladio al 10 % sobre carbono se añadió a una solución de etanol (20 ml) de 1,7 g del compuesto obtenido en la Etapa 6) de la reacción anterior, y se agitó en 1 atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 15 horas. El complejo de paladio-carbono se eliminó mediante filtración, el filtrado se concentró a presión reducida, y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel sílice básica (hexano/acetato de etilo) para obtener el compuesto del título en forma de un sólido incoloro. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 6,50-6,48 (2H, m), 6,38-6,36 (1H, m), 3,61 (2H, s), 3,50 (2H, s), 2,49 (2H, s), 2,42 (3H, s), 0,91 (2H, dd, J = 6,3, 4,6 Hz), 0,81 (2H, dd, J=6,3, 4,6 Hz) IEP-EM Encontrado: m/z [M+H] 189

Ejemplo 3

Materiales y Métodos generales

45 A. Cultivo celular, ensayos de proliferación y desactivación genética del ARNip de MYT1

50 Todas las líneas celulares de cáncer se hicieron crecer en medio recomendado por el proveedor de la línea celular (ATCC). El medio de cultivo de tejido, el suero y los suplementos se adquirieron a Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). Para el cribado del ensayo de proliferación (Figura 1), las células se sembraron en placas de cultivo de tejido de 384 pocillos y crecieron con tratamiento de compuesto o vehículo. Después de 96 horas, Se usó CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante para aproximar el contenido celular. Las muestras se analizaron por triplicado y el crecimiento se calculó como el valor bruto de CellTiter-Glo de muestras tratadas con respecto a los pocillos de control tratados con vehículo.

55 Para los estudios de desactivación génica, NCI-H460 y KNS62, dos líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico, American Type Culture Collection, Manassas, VA, se transfectaron con combinados de ARNip (SMARTpool, Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con cualquiera de las secuencias no dirigidas de

control o con secuencias de PKMYT1. Las células se sembraron 48 horas después de la transfección en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, y el día siguiente se trataron con el compuesto o con vehículo durante 72 horas. Para aproximar el contenido celular, se usó Via-Light (Lonza, Basel, Suiza) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se analizaron por triplicado, y el crecimiento se calculó determinando el porcentaje de valor bruto del control para cada tratamiento.

B. Transferencia Western

Las células se lisaron en reactivo de extracción de proteínas de mamíferos (MPER, Thermo Fisher 78505, Waltham, MA) y posteriormente se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa PVDF. Los anticuerpos utilizados en la transferencia Western procedían de las siguientes fuentes: CDK1 total, pCDK1^{Y15}, pCDK1^{T14}, pCHK1^{S345}, pStathmin^{S38}, pLaminaA/C^{S22}, motivo sustrato CDK, γ H2AX, Ciclina A, y PKMYT1 total de Cell Signaling Technologies (Beverly, MA); actina-HRP de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anticuerpos secundarios dirigidos contra IgG de ratón y conejo conjugados con HRP de GE Healthcare (Waukesha, WI). Las transferencias se expusieron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Pierce, Waltham, MA).

C. Citometría de flujo

Para detectar roturas del ADN bicatenario, las células se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra γ H2AX (S139) conjugado con aFITC (kit 17-344, Millipore, Billerica, MA) tras haberse fijado durante la noche en solución yoduro de propidio (PI) al 70 % en etanol. RNasa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) se usó para detectar el contenido de ADN total. Para los estudios relativos a la mitosis prematura, se añadió un anticuerpo dirigido contra pHH3-Alexa 647 (BD Biosciences 558217).

Para los estudios de sincronización, las células se incubaron en medio exento de suero durante 36 horas, seguido por rellenado con FBS al 20 %. Una hora antes de la cada recogida, las células se pulsaron con bromodeoxiuridina 10 μ M (BrdU). Las células se fijaron y se tiñeron para determinar el contenido de BrdU y ADN con un anticuerpo dirigido contra BrdU conjugado con FITC y colorante 7-aminoactinomicina-D (7-AAD), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones de BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Todos los datos citométricos se recogieron en el citómetro de flujo BD LSR II usando el programa informático BD FACS Diva™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), y los resultados se analizaron en la versión FlowJo 7.5.

D. Estudios de eficacia *in Vivo*

Ratones hembra CD-1 Nu/Nu de 5-6 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (Wilmington, DE) y se alojaron en la instalación de cuidado animal de los solicitantes en condiciones normalizadas de laboratorio y recibieron pienso 2018S autoclavable (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) y agua *ad libitum*. El protocolo fue aprobado por el comité de cuidado y uso animal interno de los solicitantes. Los ratones se inocularon con células (Matrigel:PBS 1:1) por vía subcutánea (SC) en el flanco derecho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 200 mm³ (+/- 50) ratones se emparejaron de forma que cada grupo tuviera una media y desviación estándar similar. El volumen tumoral y los pesos corporales se registraron quincenalmente. Los ratones recibieron cuatro ciclos de tratamiento con dosis diarias (BID) durante dos días, recibiendo vehículo o WEE1-1 (60 mpk).

Ejemplo 4

La inhibición de WEE 1 perturba la proliferación celular en diferentes líneas celulares

La pérdida de la expresión de WEE 1 en ratones mediante direccionamiento genético es letal, perturbando el desarrollo incluso antes de que los embriones alcancen el estado de blastocitos (día preembrionario 3,5). Este fenotipo está causado por la apoptosis y mitosis prematura en embriones, así como por daños en el ADN en los fibroblastos embrionarios de ratón que carecen del gen WEE1 (Tominaga, Y., et al., J. Biol. Sciences, 2006, 2(4): 161-170). Además, el silenciamiento mediado por ARNi de WEE1 conduce a una viabilidad alterada en numerosas líneas celulares humanas transformadas. WEE1-1 es un potente inhibidor de WEE1 competitivo del ATP y sensibiliza las células cancerosas al daño exógeno en el ADN (Hirai, H., et al., Mol. Cancer Ther., 2009, 8(11):2992-3000). Los solicitantes usaron este inhibidor de molécula pequeña para investigar los efectos de la inhibición farmacológica de WEE 1 en un panel diverso de líneas de células tumorales humanas (Figura 1).

Se observó una amplia gama de respuestas cuando 522 líneas de cáncer, que representaban 16 tipos diferentes de tumores, se cribaron con WEE1-1 en un ensayo de proliferación celular (Figura 1). Los valores de CE₅₀ estuvieron comprendidos de $\leq 0,1 \mu$ M en 2 % (9/522) a $\geq 1 \mu$ M en 19 % (98/522) para las líneas celulares analizadas. La comparación entre valores medios de CE₅₀ de los diferentes tipos tumorales reveló que, como grupo, las líneas celulares de cáncer colorrectal eran menos sensibles (valor medio de la CE₅₀ = 1,16 μ M, n = 66, intervalo 0,17 a >10 μ M) y que las líneas de células tumorales de neuroblastoma eran, de promedio, más sensibles al tratamiento con WEE1-1 (valor medio de la CE₅₀ = 0,28 μ M, n = 7, intervalo de 0,12 a 0,45 μ M). El tamaño de muestra del último grupo fue limitado, pero el hallazgo de que las células de neuroblastoma tendían a ser más sensibles a la inhibición

de WEE1 es consistente con hallazgos recientes (Russell et al., manuscrito enviado). Es notable que muchas líneas celulares continuarán creciendo y dividiéndose incluso en presencia de concentraciones más elevadas de WEE1-1. Estos datos demuestran el potencial antiproliferativo de la inhibición farmacológica de WEE1 y la diversidad entre líneas de células tumorales humorales.

5

Ejemplo 5

La inhibición de WEE1 activa la respuesta al daño en el ADN

10 Los cribados genómicos funcionales y los estudios de validación han demostrado que la inactivación genética de WEE conduce a roturas del ADN bicatenario y a la activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR). Los solicitantes utilizaron pCHK1^{S345} como un marcador de la DDR activada para examinar el efecto de la inhibición farmacológica de WEES en seis líneas celulares de sensibilidad variable a WEE1-1: ES-2 (EC₅₀ = 2,56 nM), A2058 (EC₅₀ = 22,5 nM), A431 (EC₅₀ = 170 nM), A427 (EC₅₀ = 116 nM), KNS62 (EC₅₀ = 487 nM), y NCI-H460 (EC₅₀ = 535 nM). Las transferencias Western de pCHK1^{S345} demostraron una activación dependiente de la dosis de DDR en las 15 seis líneas celulares, y una evidencia de un aumento en pCHK1^{S345} con una cantidad tan baja como 50 nM de WEE1-1 en las líneas celulares más sensibles, es decir, ES-2, A2058, A431, y A427 (Figura 2A). Una actividad CDK elevada como resultado del tratamiento con WEE1-1 se confirmó en las células ES-2 (Figura 8A). Como se esperaba, también se observó una reducción en pCDK1^{Y15} dependiente de la dosis en las seis líneas celulares, proporcionando un vínculo entre la inducción de la DDR y la actividad CDK elevada como resultado de la inhibición de WEE. La fosforilación de CDK1 y CDK2 en T14 mediante PKMYT1 también es conocida por alterar la actividad 20 quinasa CDK1/2 y WEE1-1 inhibe PKMYT1 *in vitro* a concentraciones aproximadamente 100 veces las necesarias para inhibir WEES (Hirai, H., *et al.*, 2009). Los solicitantes se preguntaron si los niveles de pCDK1^{T14} se veían afectados por concentraciones de WEE1-1 que inducían daños en el ADN. Con la posible excepción de la línea celular A427, los solicitantes no observaron un efecto dependiente de WEE1-1 sobre pCDK1^{T14} (Figura 2A).

25

Ejemplo 6

L inhibición de WEE perturba la dinámica de la fase S y la integridad de la replicación del ADN

30

Para comprender donde se produce el daño en el ADN dependiente de WEE1-1, los solicitantes analizaron células de cáncer de ovario TOV21G mediante citometría de flujo. En células TOV21G con crecimiento exponencial, 1 % a 2 % de la población mostró tinción positiva para el marcador de roturas en el ADN bicatenario γH2AX. Sin embargo, un periodo de tratamiento con WEE1-1 tan corto como 2 horas dio como resultado un 23 % con tinción positiva para γH2AX (Figura 2B, panel izquierdo). El contenido cromosómico de las células positivas para γH2AX fue >2 N, lo que sugiere que el daño en el ADN derivado de la inhibición de WEES se produce durante o después del inicio de la replicación del ADN en la fase S. Cuando las células TOV21G se trataron con WEE1-1 y se marcaron en pulsos con BrdU, el daño en el ADN se detectó casi exclusivamente en las células positivas para BrdU (95 % a 2 horas, 92 % a 35 6 horas) que respalda la observación de los solicitantes de que las roturas del ADN bicatenario son una consecuencia de la inhibición de WEE1 durante la replicación del ADN (Figura 2B, panel derecho).

40

Se esperaba que las roturas cromosómicas en fase S activaran los puntos de control en la replicación del ADN y ralentizaran el progreso a través de la fase S. Se llevaron a cabo estudios de sincronización celular para confirmar esta expectativa. Las líneas celulares ES-2 se seleccionaron para estos estudios porque eran más susceptibles que 45 otras líneas celulares para la sincronización de G1 inducida por la retirada de mitógeno tras la privación del suero (no se muestran los datos). Otros enfoques de la sincronización en la fase S (por ejemplo, bloque doble timidina, afidicolina, hidroxiurea, actinomicina D, etc.) no se utilizaron porque estos métodos pueden inducir por separado los daños en el ADN, y pueden suponer una perturbación de la dinámica de la replicación del ADN. Como se muestra en la Figura 3A, la retirada de suero durante 36 horas no detuvo completamente las células ES-2 en G1. Sin embargo, la adición de FBS al 20 % provocó que las células ES-2 tratadas con vehículo doblaran su población en fase S en aproximadamente un 40 % en 8 horas con un máximo al 50 % de 12 a 14 horas. Por el contrario, cuando se incluyó el tratamiento con WEE1-1 con adición de FBS al 20 %, no hubo cambio detectable en la población de la fase S durante 8 horas, y los niveles máximos (aproximadamente 50 %) se retrasaron hasta 24 horas después del FBS (Figura 3A). Incluso con este máximo, la intensidad media de la fluorescencia del BrdU incorporado fue mucho 50 más bajo en WEE1-1 en comparación con las células tratadas con vehículo, lo que sugiere una replicación del ADN más lenta en la población positiva para BrdU. El análisis mediante transferencias Western presentado en la Figura 3A confirmó la progresión retrasada de la fase S (ciclina A), una activación más rápida y sólida de la DDR (pCHK1^{S345}), y la inhibición de la actividad de la quinasa WEE1 (pCDK1^{Y15}) en las células tratadas con WEE1-1 con respecto a las células tratadas con vehículo. Curiosamente, la fosforilación de pCDK1^{Y15} aumentó durante el periodo 55 temporal de 24 horas en las células ES-2. El grado de roturas del ADN bicatenario (γH2AX) inducido por 24 horas de tratamiento con WEE1-1 fue apreciablemente mayor en condiciones de estimulación mitógena donde se observa un brusco aumento de la replicación del ADN en comparación con las células que no se habían vuelto a estimular (Figura 3B y Figura 9).

60

Ejemplo 7Daño en el ADN como consecuencia citotóxica principal de la inhibición del WEE1

5 WEES es necesario para la activación temporal de ambas quinasas CDK2 y CDK1 en las fases S y G2 del ciclo celular, respectivamente. La inhibición de WEE1, por lo tanto, se esperaba que condujera a defectos de la fase S (roturas del ADN bicatenario durante la replicación del ADN) y defectos G2-M (mitosis prematura). Para evaluar si uno o ambos de estos efectos son necesarios o suficientes para la sensibilidad a WEE1-1, γ H2AX y la histona fosforilada H3 (pHH3), un marcador de la mitosis, a concentraciones citotóxicas (CE_{90}) de WEE1-1 se examinaron

10 en tres líneas celulares sensibles, A2058, HT-29, y LoVo. Después de 24 horas de tratamiento con WEE1-1, el porcentaje de células positivas para pHH3 se incrementó par las tres líneas celulares (Figura 4). De las tres líneas, solamente las células HT-29 contenían una población mitótica notable, 43 % con ADN 4N y 23 % con < ADN 4N, lo que indica mitosis prematura de las células en fase S sin completar la replicación del ADN. Sin embargo, se observó una población celular positiva para H2AX notable para las tres líneas celulares después del tratamiento con WEE 1-1

15 (8 % en A2058, 59 % en HT-29, 27 % en LoVo). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, estos datos sugieren que la inducción de roturas del ADN bicatenario (γ H2AX) en lugar de la mitosis prematura (pHH3) fue la principal consecuencia citotóxica de la inhibición de WEE1 mediante WEE1-1 en líneas celulares sensibles.

Ejemplo 8

20

Actividad antitumoral *in vivo* derivada de la inhibición de WEE

Para determinar el efecto del tratamiento con WEE1-1 en monoterapia sobre el crecimiento tumoral *in vivo* a dosis toleradas, se estableció la dosis máxima tolerada (MTD) en 60 mg por kg para dos dosis diarias (BID). La pérdida de peso corporal durante el curso de un estudio de 28 días a esta dosis y posología no superó el 5 % en el grupo tratado (no se muestran los datos). WEE1-1 inhibió la proliferación en la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico, A427 a bajas concentraciones ($CE_{50} = 116$ nM) e indujo rápidamente la respuesta al daño en el ADN (Figura 2A). En el modelo de xenoinjerto A427model, el tratamiento con WEE1-1 produjo regresión hasta aproximadamente un 50 % del volumen tumoral medio inicial (Figura 5A). El análisis de los tumores individuales mostró que 9 de los 10 tumores

30 iA427 tratados con vehículo crecieron de 2 a 6 veces respecto a su volumen inicial (Figura 5B). Por el contrario, los volúmenes finales de los 10 tumores tratados con WEE1-1 fueron menores que sus volúmenes iniciales (Figura 5B). Los efectos contra el crecimiento tumoral del tratamiento con WEE1-1 en monoterapia se observaron en modelos de xenoinjerto adicionales (Figura 5C): la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) fue del 92 % en el modelo SK-MES-1 NSCLC, 13 % de regresión del tumor en un modelo de tumor colorrectal LoVo, 88 % de la TGI en un modelo de tumor epidermoide A431, y 64 % de la TGI en un modelo NCI-H2122 NSCLC. El TGI porcentual se calculó como $100 - (100 * \Delta T / \Delta C)$ si $\Delta T > 0$ donde $\Delta T =$ volumen final medio - volumen inicial medio del grupo tratado y $\Delta C =$ volumen final medio- volumen inicial medio del grupo tratado con vehículo control. En su conjunto, estos datos demuestran el potencial terapéutico antitumoral de la inhibición de WEE1 a dosis bien toleradas de WEE1-1.

Ejemplo 9La expresión de PKMYT1 afectó a la sensibilidad al inhibidor de WEES

La expresión de WEE1 es fundamental para la viabilidad embrionica (Tominaga, Y., *et al.*, 2006) y la mayoría de las líneas celulares de cáncer cribadas muestran al menos cierto grado de sensibilidad al tratamiento con WEE1-1 (Figura 1). Sin embargo, no todas las líneas celulares son igualmente susceptibles a la inhibición de WEE1 y las CE_{50} antiproliferativas tienen un intervalo de al menos 10 veces (Figura 1). Los solicitantes han descubierto en el presente documento que un determinante potencial de la sensibilidad a la inhibición de WEE1 es la actividad de una quinasa inhibidora de CDK funcionalmente relacionada, PKMYT1. La fosforilación de CDK1 o CDK2 en cualquiera de los dos sitios del extremo N, T14 o Y15, produce la inactivación de esta quinasa a pesar de la presencia de un ligando de ciclina que por otra parte es activador (ciclina B o ciclina A, respectivamente). Se sabe que WEE1 fosforila Y15 de CDK1 y CDK2, y se ha demostrado que PKMYT1 inhibe de forma similar CDK1 y CDK2 mediante la fosforilación en T14 y/o Y15 (Mueller, P.R., *et al.*, Science, 1995, 270(5233):86-90).

55 En el presente documento, los solicitantes utilizaron la desactivación genética con ARNip para evaluar si la expresión de PKMYT1 puede alterar específicamente la respuesta a la inhibición de WEE1 en dos líneas celulares, NCI-H460 y KNS62. Estas líneas se seleccionaron porque demuestran una relativa insensibilidad al tratamiento con WEE1-1 y tienen una expresión relativamente elevada de PKMYT1 (no se muestran los datos). Las células se transfectaron con una combinación de cuatro ARNip diferentes, todos dirigidos a PKMYT1, y se analizaron en ensayos de proliferación para determinar la sensibilidad a diferentes agentes citotóxicos (Figura 6A). Como se ilustra en la Figura 6A, Las CE_{50} antiproliferativas de WEE1-1 para NCI-H460 (n = 3) y KNS62 (n = 2) pasaron de 677 nM a 104 nM y de 487 nM a 93 nM, respectivamente, cuando PKMYT1 se desactivó genéticamente. De manera notable, el efecto máximo del tratamiento con WEE1-1 no se vio afectado por el agotamiento de PKMYT1. Usando las veces de cambio en la CE_{50} como medidas de potenciación, PKMYT1 potenció WEE1-1 un promedio de 4,7 veces en células NCI-H460 (n=3) y 4,9 veces en células KNS62 (n=2). La especificidad de la sensibilización dependiente de PKMYT1 para WEE1-1 se confirmó mediante curvas de respuestas a las dosis idénticas en células transfectadas

65

- con ARNip de PKMYT1 tanto de control (CT) como tratadas con carboplatino, un inhibidor de MEK (PD-0325901), o doxorubicina (Figura 6A). El análisis mediante transferencias Western de células KNS62 (Figura 6B) indicó que la desactivación genética de PKMYT1 dio como resultado una fosforilación inicial de CDK1 y 2 en Y15 algo menor y una fosforilación inicial en T14 notablemente reducida (hilera 9 comparada con las hileras 1 y 5). La desactivación genética de PKMYT1 también condujo a un aumento global tanto en pCHK1^{S345} como en γ H2AX. Esto fue coherente con la observación de que la citotoxicidad mediada por WEE1-1 da como resultado daño en el ADN (Figuras 4A y 4B) y que la desactivación genética de PKMYT1 da como resultado una mayor sensibilidad a WEE1-1 y su efecto antiproliferativo (Figura 6B).
- 10 En lo que la desactivación genética de PKMYT1 conduce a un aumento en la sensibilidad a WEE1-1, los solicitantes plantearon la posibilidad de que una baja expresión de PKMYT1 también pueda ser predictiva de la mayoría de las líneas celulares sensibles a WEE1-1. Para validar esta hipótesis, se evaluó un panel de 522 líneas celulares para determinar los niveles de ARNm de PKMYT1 usando la Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), una base de datos de líneas celulares disponible para el público, de la colaboración entre el Broad Institute (Cambridge, MA) y el Novartis Institute for Biomedical Research (Cambridge, MA) y su Genomics Institute de la Novartis Research Foundation (San Diego, CA) (Stransky, B. C., et al., Nature, 2012, 483:603-807). De las 522 líneas celulares de cáncer cuya sensibilidad para WEE1-1 se sometió a ensayo, los datos de expresión de PKMYT1 estaban disponibles para 305 líneas. Una representación gráfica de la expresión relativa de PKMYT1 según la base de datos CCLE frente a los datos de la respuesta de la línea celular observada a 450 nM de WEE1-1 no demostró una correlación entre el ARNm de PKMYT1 y la sensibilidad a WEE1-1 (Figura 7A). Sin embargo, 24 de las 33 líneas celulares (73 %) que resultaron destruidas por el tratamiento con WEE1-1 a 450 nM (respuesta < 0,25 en una escala ajustada, indicado por la línea discontinua en la Figura 7a) presentaban un nivel de expresión inferior a la media, es decir, 413 ± 154 , para el ARNm de PKMYT1.
- 25 Para someter a ensayo adicionalmente la hipótesis de que la expresión de PKMYT1 era predictiva de la sensibilidad a WEE1-1, se seleccionaron 13 líneas celulares adicionales de la base de datos CCLE que previamente no se habían tratado con WEE1-1. Los valores de las CE_{50} antiproliferativas de WEE1-1 en estas 13 líneas celulares se correlacionó tanto con la expresión del ARNm (Figura 7B, panel de la izquierda) y los niveles de proteína (Figura 7B, panel de la derecha) de PKMYT1. Tomados en su conjunto, estos datos respaldan la hipótesis de que una baja expresión de PKMYT1 era predictiva de líneas celulares sensibles a WEE1-1, es decir, sensibilidad al tratamiento con WEE1-1.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con un cáncer asociado a la quinasa WEE1, comprendiendo el uso:
- 5 (a) medir el nivel de expresión génica de PKMYT1 en una muestra biológica que comprende células cancerosas obtenidas de dicho paciente y en una muestra de control;
- (b) determinar si el nivel de expresión génica en dicha muestra del paciente está por encima o por debajo del nivel en dicha muestras de control;
- 10 (c) seleccionar a dicho paciente para el tratamiento con un inhibidor de WEE1, en donde el nivel del biomarcador predictivo de dicha muestra de paciente está por debajo del de la muestra de control; y
- (d) administrar un inhibidor de WEE1 al paciente seleccionado.
2. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha muestra de control se obtiene de uno o más sujetos que están libres de la enfermedad o que no se han diagnosticado con un cáncer asociado a la quinasa WEE1.
3. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor de WEE1 es WEE1-1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o WEE1-2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 4. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho inhibidor WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho inhibidor WEE1 es WEE1-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 6. Un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un paciente de cáncer sensible al tratamiento con un inhibidor de WEE1 que comprende:
- 30 (a) medir el nivel de expresión génica de PKMYT1 en una muestra biológica que comprende células cancerosas obtenidas de dicho paciente y en una muestra de control;
- (b) determinar si el nivel de expresión génica en dicha muestra del paciente está por encima o por debajo del nivel en dicha muestras de control;
- 35 (c) identificar dicho paciente sensible para su tratamiento con un inhibidor de WEE1, en donde el nivel de PKMYT1 en dicha muestra de paciente está por debajo del de la muestra de control; y
- (d) administrar un inhibidor de WEE1 al paciente sensible.
7. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha muestra de control se obtiene de uno o más sujetos que están libres de la enfermedad o que no se han diagnosticado con un cáncer asociado a la quinasa WEE1.
- 40 8. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho inhibidor de WEE1 es WEE1-1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o WEE1-2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 45 9. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho inhibidor WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
10. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho inhibidor de WEE es WEE1-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 50 11. El inhibidor de WEE1 para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho cáncer es un cáncer asociado a la quinasa WEE1 seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovarios, leucemia aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica y linfoma de Hodgkin.
- 55 12. Un inhibidor de WEE1 para su uso en el tratamiento de un paciente de cáncer asociado a la quinasa WEE1, en donde el inhibidor de WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o WEE1-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde las células cancerosas de dicho paciente a tratar se caracterizan por una baja expresión de PKMYT1.
- 60 13. El inhibidor de WEE para usar de acuerdo con la reivindicación 12 en donde el inhibidor de WEE1 es WEE1-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

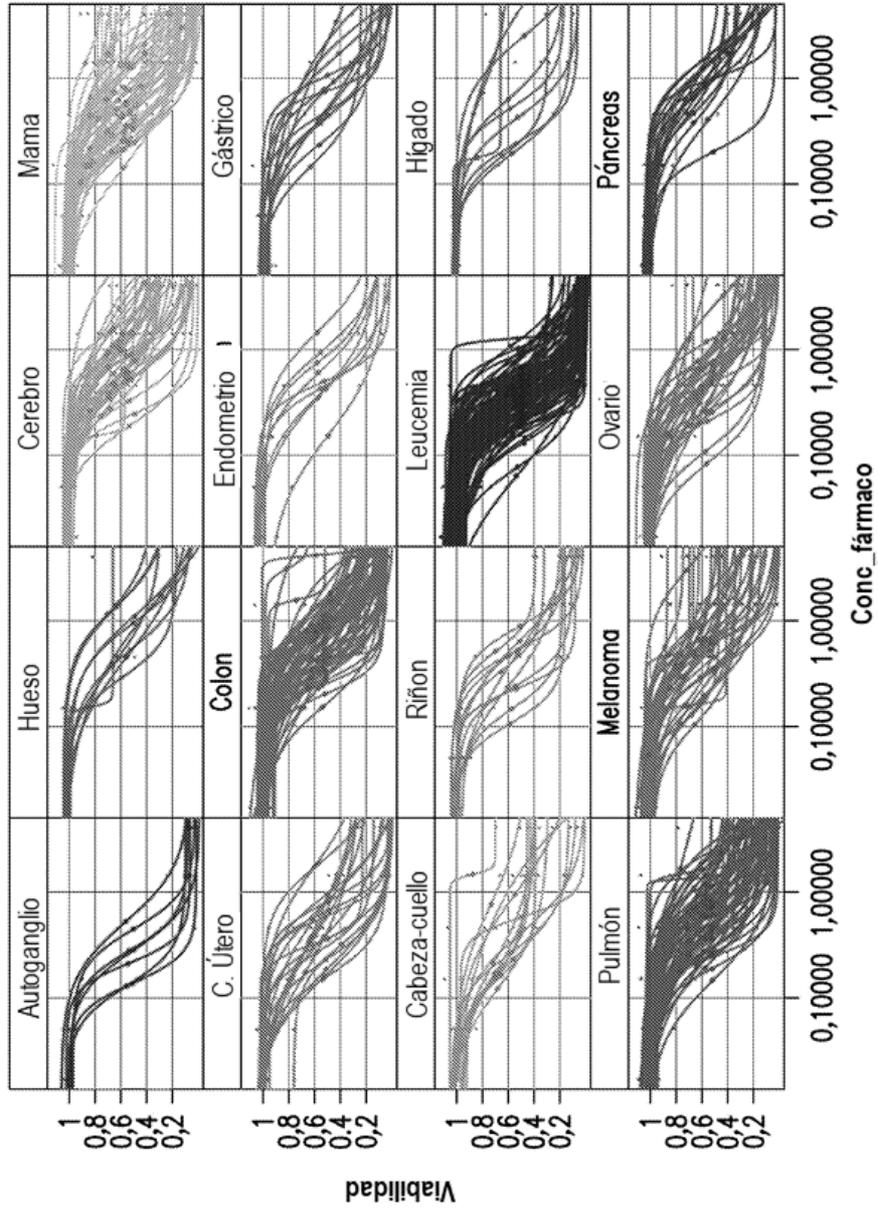


FIG.1

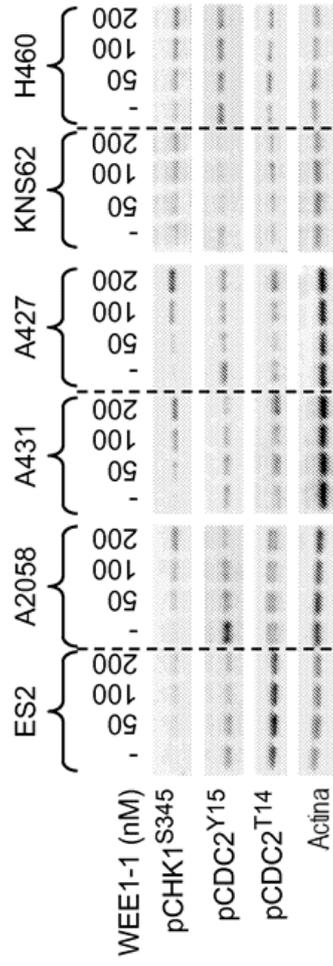


FIG. 2A

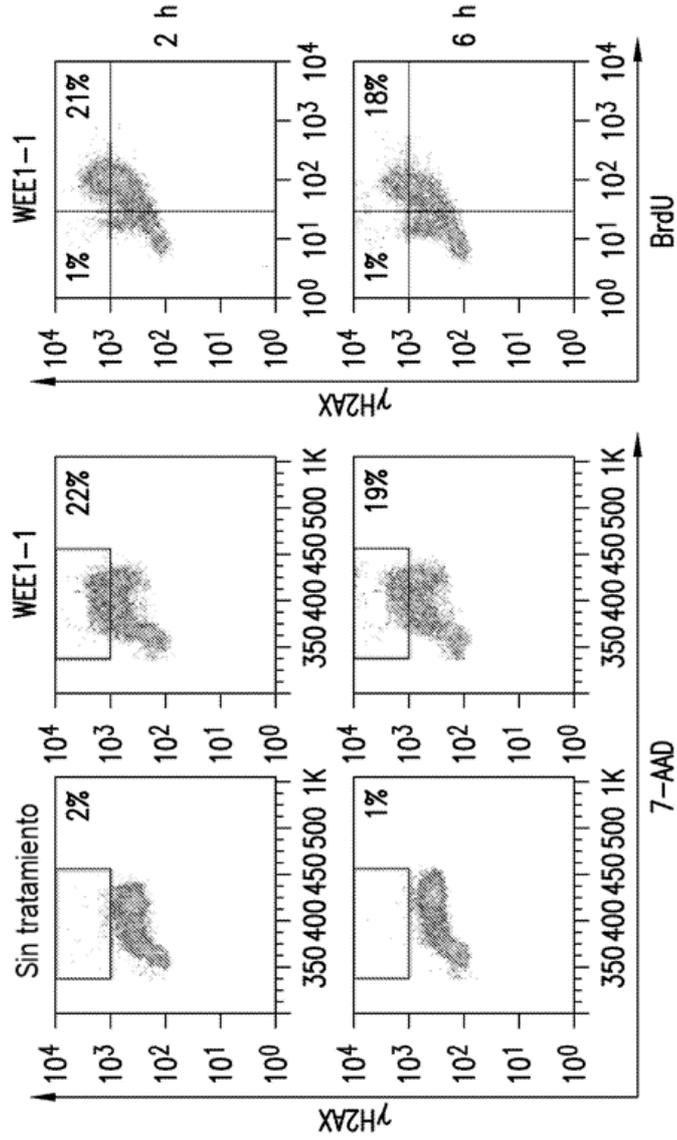


FIG.2B

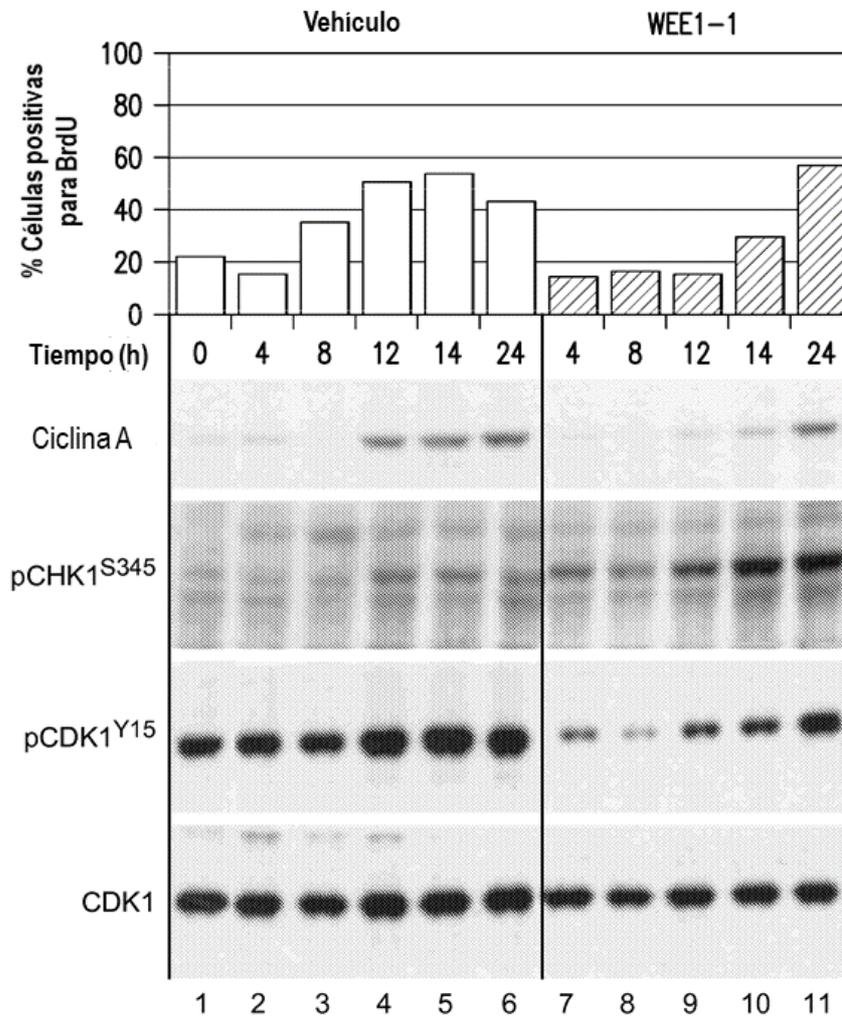


FIG.3A

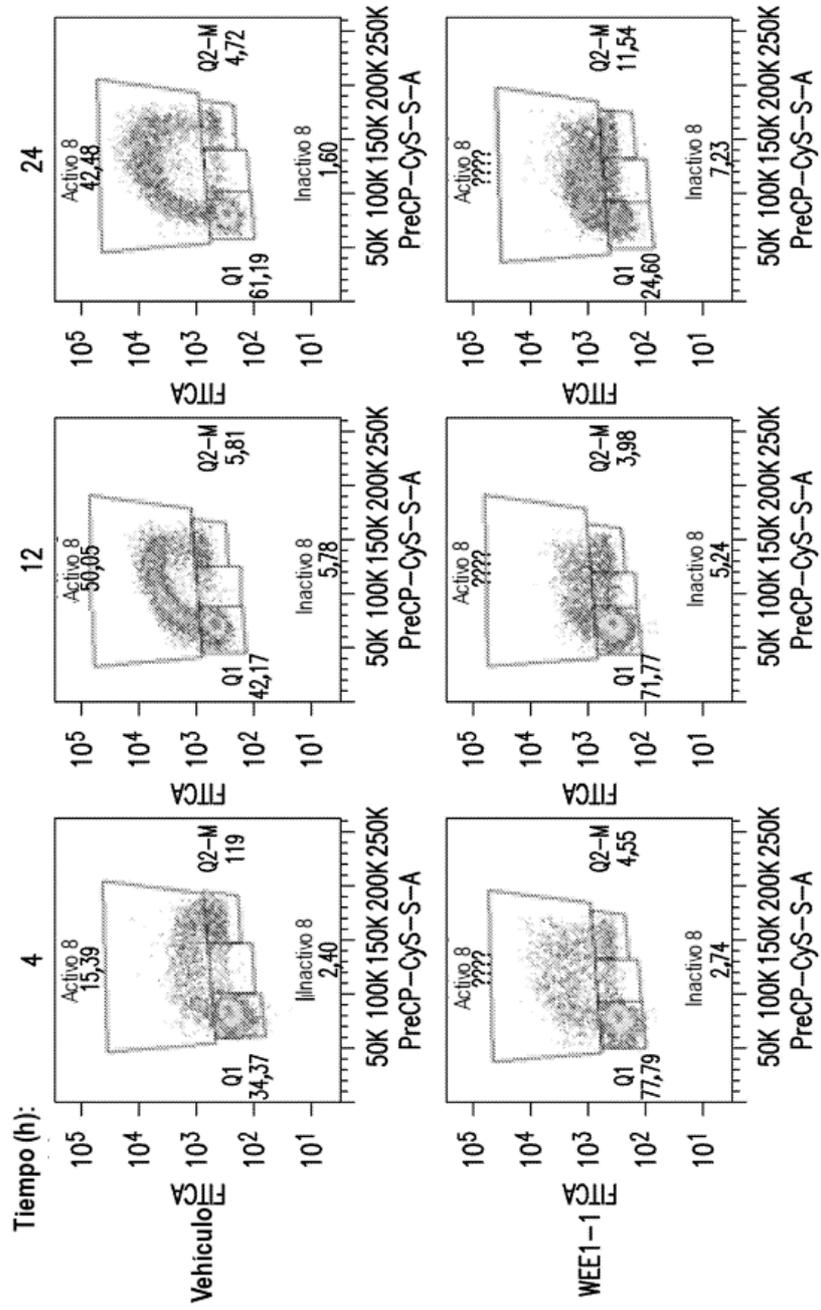


FIG.3B

| | | +WEE1-1 | | | |
|--------|--|---------|-------|-------|---------------|
| | | G1 | S | G2/M | γ H2AX |
| +FBS | | 30,9% | 48,0% | 21,1% | 62,8% |
| No FBS | | 69,0% | 17,7% | 13,3% | 22,7% |

FIG.3C

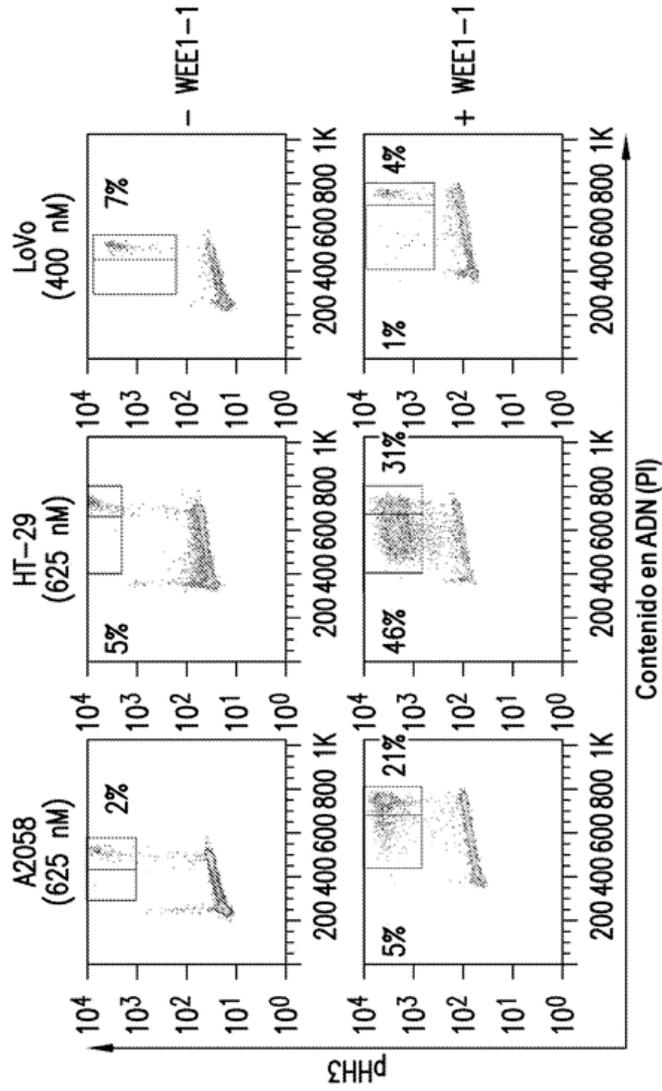


FIG.4A

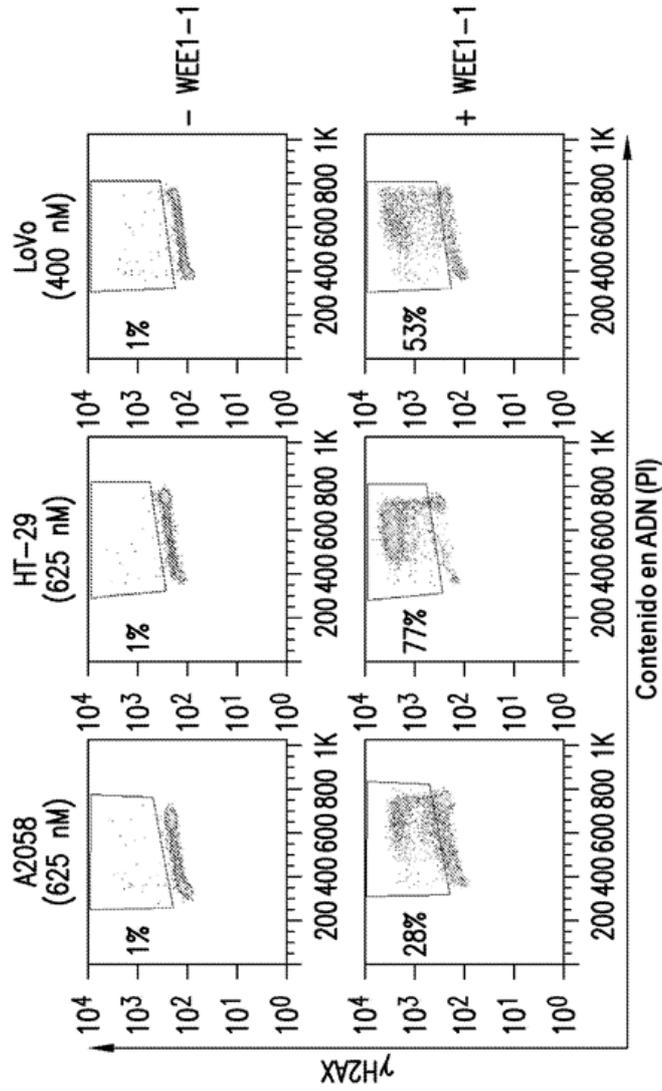


FIG.4B

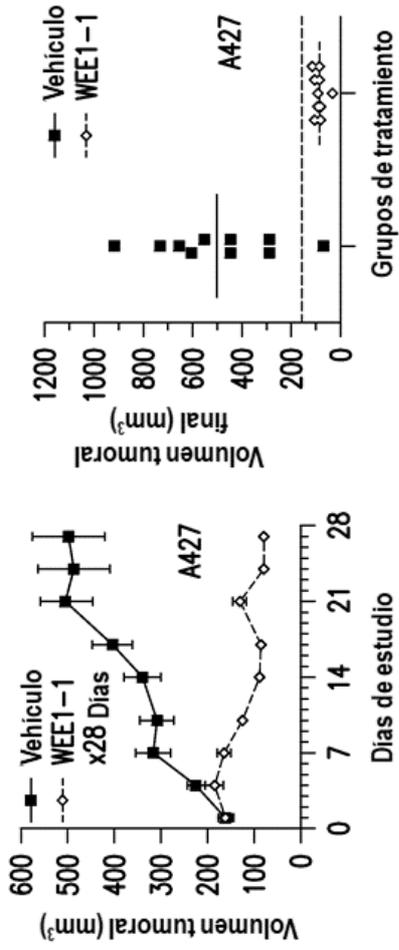


FIG. 5A

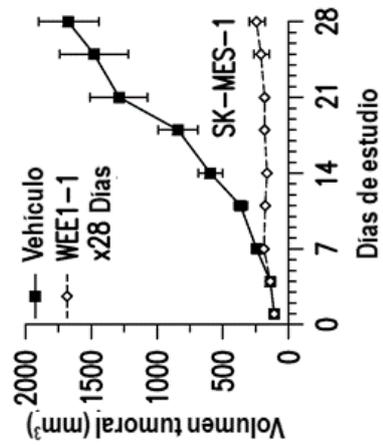


FIG. 5C

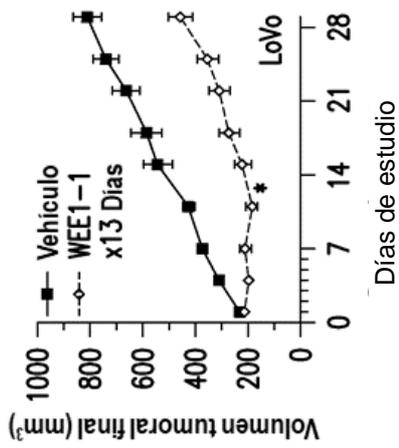


FIG. 5D

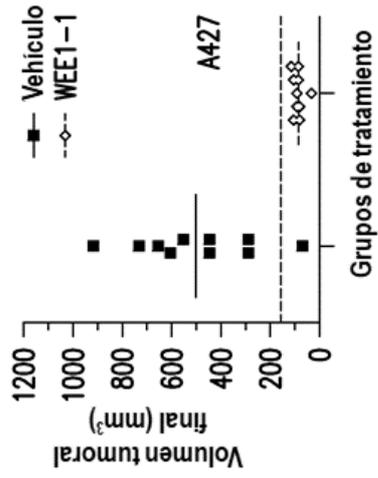


FIG. 5B

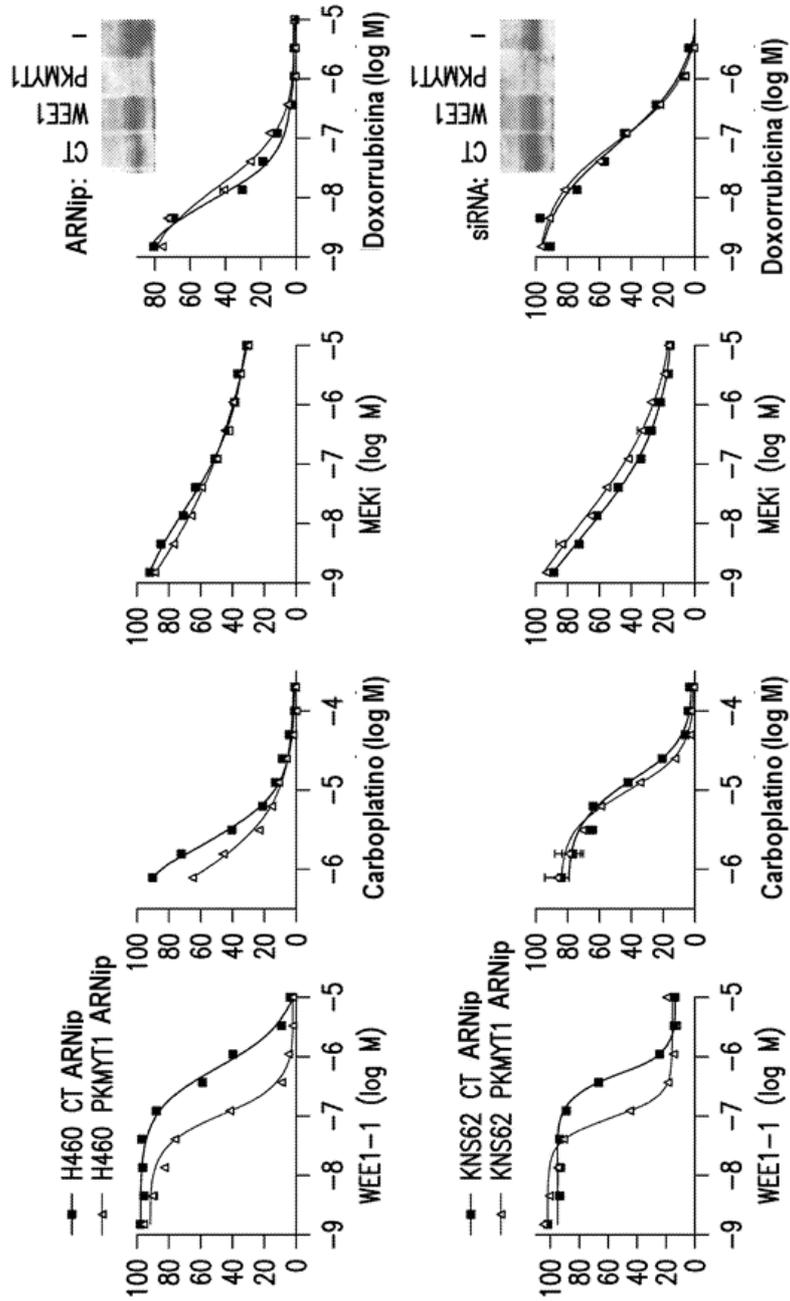


FIG. 6A

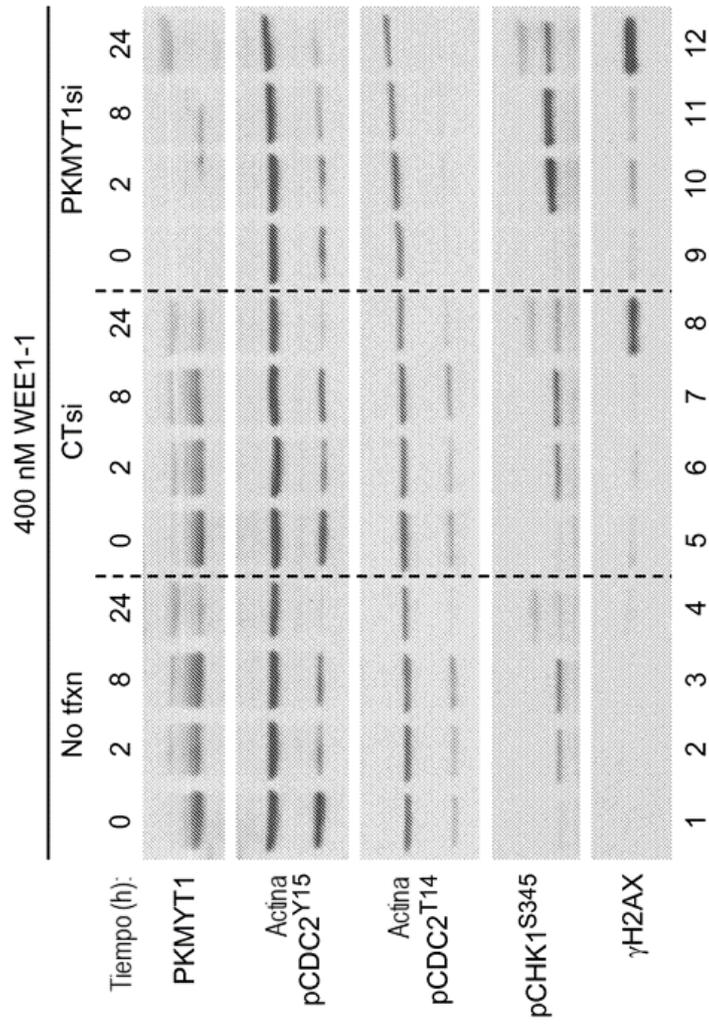


FIG.6B

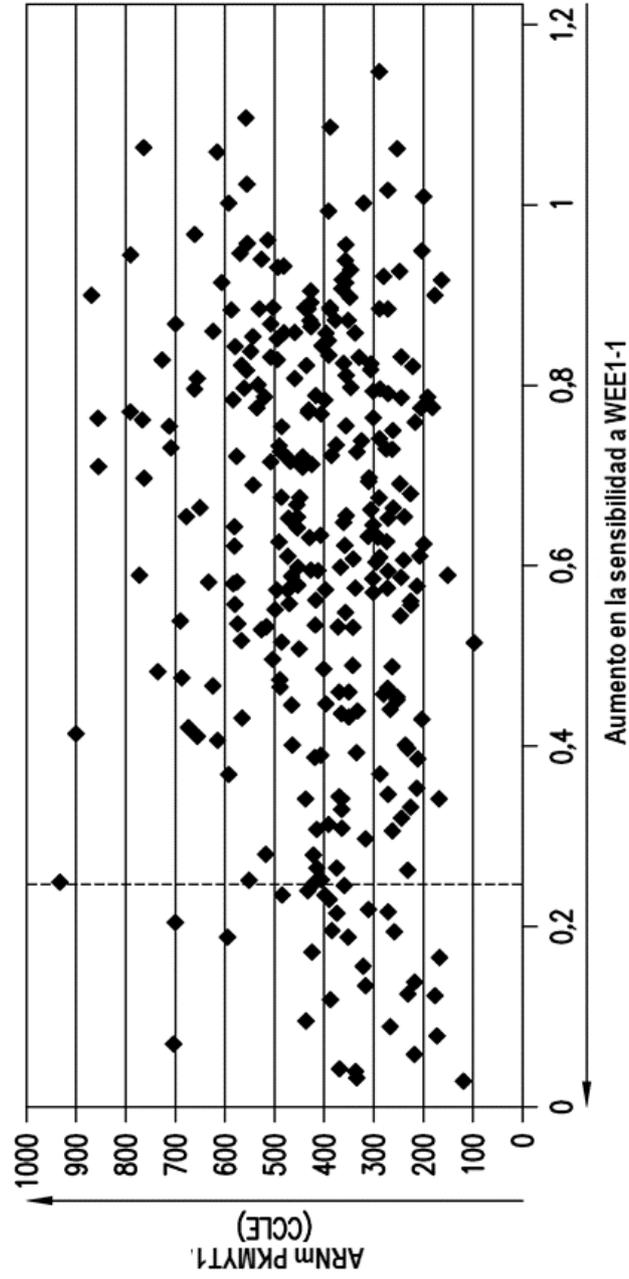


FIG.7A

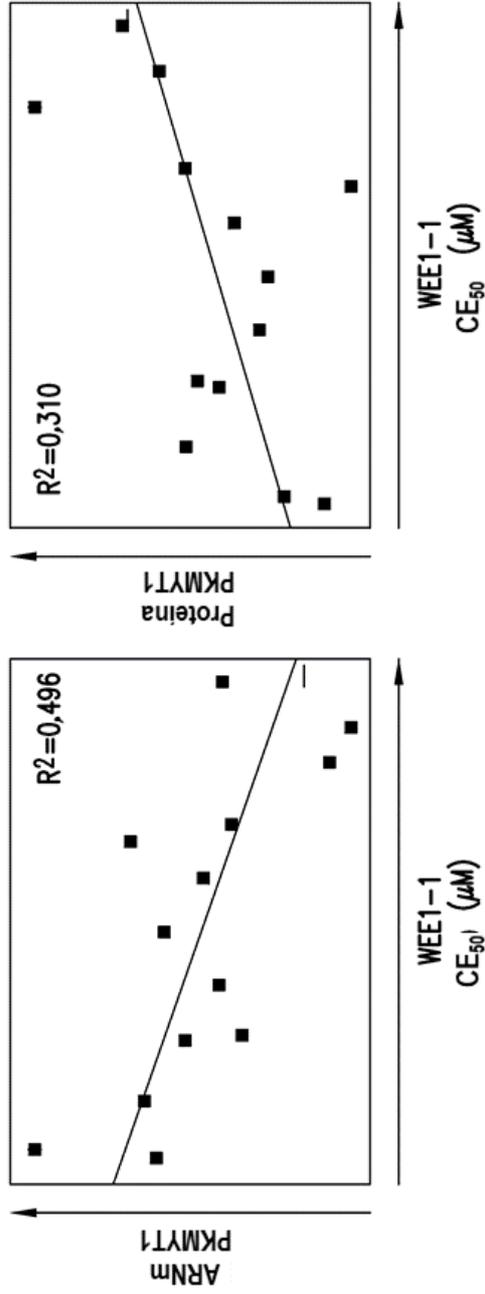


FIG.7B

