

ANEXO 1

ENSAYOS COMPARATIVOS CON COMPUESTOS DIVULGADOS EN US 2004

0209895 (D1)

Materiales y Métodos

Los valores porcentuales que se indican en los ensayos y los ejemplos que se describen a continuación son porcentajes en peso, a menos que se indique lo contrario. Asimismo, las partes son partes en peso. Las proporciones entre los solventes, las proporciones de las diluciones y los datos relacionados con la concentración de las soluciones líquido/líquido se basan en el volumen.

Los compuestos fueron analizados en ensayos biológicos específicos una o más veces. Cuando se los sometió a más de un análisis, los datos informados son los valores promedio o los valores de la mediana, donde

- el valor promedio, que también se conoce como la media aritmética, es la suma de los valores obtenidos dividida por la cantidad de análisis realizados; y
- el valor de la mediana es el valor del medio en el grupo de los valores ordenados de manera ascendente o descendente. Si la cantidad de valores en el conjunto de datos es impar, la mediana es el valor del medio. Si la cantidad de valores en el conjunto de datos es par, la mediana es la media aritmética de los dos valores del medio.

Los compuestos de los ejemplos fueron sintetizados una o más veces. Cuando se los sintetizó más de una vez, los datos de los ensayos biológicos son los valores promedio o los

valores de la mediana que se calcularon sobre la base de los datos que se obtuvieron cuando se analizó cada lote de compuestos.

Las propiedades farmacológicas *in vitro* de los compuestos pueden ser determinadas de acuerdo con los ensayos y los métodos que se describen a continuación.

1. Ensayo de quinasas CDK9/CycT1 en alto ATP

Se cuantificó la actividad inhibitoria de CDK9/CycT1 de los compuestos de la presente invención en una concentración alta de ATP luego de la preincubación de la enzima y compuestos de prueba empleando el ensayo de TR-FRET para CDK9/CycT1 como se describe en los siguientes párrafos.

Se compraron CDK9 y CycT1 humanas de longitud completa recombinantes marcadas con His, expresadas en células de insecto y purificadas por cromatografía de afinidad a Ni-NTA, en Invitrogen (Cat. No PV4131). Como sustrato para la reacción de la quinasas se usó el péptido biotinilado biotin-Ttds-YISPLKSPYKISEG (extremo C terminal en forma de amida) el cual se compró por ejemplo de la compañía JERINI peptide technologies (Berlín, Alemania).

Para el ensayo se cargaron con pipeta 50 nl de una solución concentrada 100 veces del compuesto de prueba en DMSO en una placa para microtitulación de 384 cavidades de volumen reducido negras (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), se agregaron 2 µl de una solución de CDK9/CycT1 en solución amortiguadora de ensayo acuosa [Tris/HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, ditiotretitol 1,0 mM, orto-vanadato de sodio 1,0 mM, Nonidet-P40 0,01% (volumen en volumen) (Sigma)] y la mezcla se incubó durante 15 minutos a 22°C para permitir la unión preliminar de los compuestos de prueba a la enzima antes del inicio de la reacción de la quinasas. Luego se inició la reacción de la quinasas por el agregado

de 3 μ l de una solución de adenosina-tri-fosfato (ATP, 3,3 mM, lo que en el volumen del ensayo, 5 μ l, representó una concentración de 2 mM) y sustrato (1,67 μ M, lo que en el volumen del ensayo, 5 μ l, representó una concentración de 1 μ M) en la solución amortiguadora de ensayo y se incubó la mezcla resultante durante un tiempo de reacción de 25 minutos a 22°C. La concentración de CDK9/CycT1 se ajustó dependiendo de la actividad del lote de enzima y se eligió de manera apropiada como para tener el ensayo en el rango lineal, las concentraciones típicas estuvieron en el rango de 0,5 μ g/ml. La reacción se detuvo por el agregado de 5 μ l de una solución de reactivos de detección de TR-FRET (estreptavidina-XL665 0,2 μ M [Cisbio Bioassays, Codolet, Francia] y anticuerpo anti-RB(pSer807/pSer811) 1 nM de BD Pharmingen [# 558389] y anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con LANCE EU-W1024 1,2 nM [Perkin-Elmer, no. de producto AD0077]) en una solución acuosa de EDTA (EDTA 100 mM, albúmina sérica bovina 0,2 % (peso en volumen) en 100 mM HEPES pH 7,0).

La mezcla resultante se incubó 1 hora a 22°C para permitir la formación de complejo entre el péptido biotinilado fosforilado y los reactivos de detección. Posteriormente la cantidad de sustrato fosforilado se evaluó por medida de la transferencia de energía de resonancia del Quelado con Eu a la estreptavidina-XL. Por lo tanto, las emisiones de fluorescencia a 620 nm y 665 nm luego de la excitación a 350 nm se midieron en un lector de HTRF, por ejemplo un Rubystar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) o un Viewlux (Perkin-Elmer). La relación de las emisiones a 665 nm y a 622 nm se tomó como la medida para la cantidad de sustrato fosforilado. Los datos se normalizaron (reacción enzimática sin inhibidor = 0 % de inhibición, todos los otros componentes del ensayo pero sin enzima = 100 % de inhibición). Usualmente los compuestos de prueba se ensayaron en la misma placa para microtitulación en 11 concentraciones diferentes en el rango entre 20 μ M y 0,1 nM (20 μ M, 5,9 μ M, 1,7 μ M, 0,51 μ M, 0,15 μ M, 44 nM, 13 nM,

3,8 nM, 1,1 nM, 0,33 nM y 0,1 nM, series de diluciones preparadas separadamente antes del ensayo en el nivel de soluciones concentradas 100 veces en DMSO por diluciones seriales de 1:3,4) en valores duplicados para cada concentración y se calcularon los valores de IC₅₀ por ajuste de 4 parámetros usando un programa de computación propio.

2. Ensayo de quinasas CDK2/CycE en alto ATP:

Se cuantificó la actividad inhibitoria de CDK2/CycE de compuestos de la presente invención en adenosina-tri-fosfato (ATP) 2 mM empleando el ensayo de TR-FRET para CDK2/CycE (TR-FRET = transferencia de energía de fluorescencia con resolución temporal) como se describe en los siguientes párrafos.

Se compraron proteínas de fusión recombinantes de GST y CDK2 humana y de GST y CycE humana, expresadas en células de insecto (Sf9) y purificadas por cromatografía de afinidad con glutatión-sefarosa, de ProQinase GmbH (Freiburg, Alemania). Como sustrato para la reacción de la quinasas se usó el péptido biotinilado biotin-Ttds-YISPLKSPYKISEG (extremo C terminal en forma de amida) que pudo comprarse por ejemplo de la compañía JERINI peptide technologies (Berlín, Alemania).

En el ensayo, con una pipeta se colocaron 50 nl de una solución concentrada 100 veces del compuesto de prueba en DMSO en una placa de microtitulación de 384 cavidades con volúmenes reducidos (de Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), donde también se agregaron 2 µl de una solución de CDK2/CycE en un amortiguador acuoso para el ensayo (que comprendió Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, ditioneitol 1,0 mM, ortovanadato de sodio 0,1 mM y 0,01% (volumen en volumen) de Nonidet-P40, de Sigma) y la mezcla se incubó a 22°C durante 15 minutos para permitir que ocurriera la unión preliminar entre los compuestos de prueba y la enzima, antes del inicio de la reacción con la quinasas. Después, la reacción con la quinasas se inició agregando 3 µl de una solución

ATP (3,33 mM, lo que en el volumen del ensayo, 5 μ l, representó una concentración de 2 μ M) y el sustrato (1,25 μ M, lo que en el volumen del ensayo, 5 μ l, representó una concentración de 0,75 μ M) en el amortiguador del ensayo. La mezcla resultante se incubó a una temperatura de 22°C durante un período de 25 minutos. La concentración del complejo de CDK2/CycE se ajustó en base de la actividad del lote de enzimas, y fue apropiadamente elegida para mantener un rango lineal en el ensayo. Las concentraciones típicas estuvieron en el rango de aproximadamente 15 ng/ml. La reacción se detuvo agregando 5 μ l de una solución de los reactivos de terminación para la TR-FRET [estreptavidina-XL665 0,2 μ M, de Cisbio Bioassays, Codolet, Francia], un anticuerpo anti-RB(pSer807/pSer811) 1 nM, de BD Pharmingen, N° 558389, y un anticuerpo anti IgG de ratón marcado con LANCE EU-W1024 1,2 nM (Perkin-Elmer, producto N° AD0077, como alternativa se puede usar el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Terbio-criptato de Cisbio Bioassays]) en una solución acuosa de EDTA (EDTA 100 mM y 0,2% (peso en volumen) de albúmina de suero bovino en HEPES 100 mM, pH 7,0).

La mezcla resultante se incubó a 22°C durante 1 hora para permitir que se formara un complejo con el péptido biotinilado fosforilado y los reactivos de detección. Después, la cantidad del sustrato fosforilado se determinó midiendo la transferencia de energía de resonancia desde el quelato con Eu a la estreptavidina-XL. Se midieron las emisiones de fluorescencia a 620 nm y a 665 nm después de aplicar una excitación a 350 nm en un lector de TR-FRET, por ejemplo, en un lector Rubystar (de BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) o en un lector Viewlux (de Perkin-Elmer). Se tomó la proporción entre las emisiones a 665 nm y a 622 nm como la medida de la cantidad del sustrato fosforilado. Los datos se normalizaron (reacción enzimática sin inhibidor = 0% de inhibición, todos los otros componentes del ensayo pero sin enzima = 100% de inhibición). Usualmente, los compuestos de prueba fueron analizados en la misma placa de microtitulación, en 11

concentraciones diferentes en el rango de entre 20 μM y 0,1 nM (20 μM , 5,9 μM , 1,7 μM , 0,51 μM , 0,15 μM , 44 nM, 13 nM, 3,8 nM, 1,1 nM, 0,33 nM y 0,1 nM; la serie de diluciones fue preparada por separado, antes del ensayo, con soluciones concentradas 100 veces en DMSO, a través de diluciones en serie de 1 en 3,4), con cada concentración por duplicado. Los valores de la IC_{50} se determinaron a través de un ajuste de 4 parámetros usando un programa de computación propio.

3. Análisis de la proliferación

Se plaquearon células tumorales cultivadas (HeLa, células de tumor cervical humano, ATCC CCL-2; NCI-H460, células de carcinoma de células no pequeñas humano, ATCC HTB-177; DU 145, células de carcinoma de próstata humano independiente de hormona, ATCC HTB-81; HeLa-MaTu-ADR, células de carcinoma cervical humano resistentes a multidroga, EPO-GmbH Berlín; Caco-2, células de carcinoma colorrectal humano, ATCC HTB-37; B16F10, células de melanoma de ratón, ATCC CRL-6475) en una densidad de 5.000 células por cavidad (DU145, HeLa-MaTu-ADR), 3.000 células por cavidad (NCI-H460, HeLa), 1.500 células por cavidad (Caco-2), o 1.000 células por cavidad (B16F10) en una placa para microtitulación de 96 cavidades en 200 μL de sus respectivos medios de crecimiento suplementados con 10% de suero fetal bovino. Después de 24 horas, las células de una placa (la placa equivalente a 0%) fueron coloreadas con violeta cristalino (véase la descripción más adelante), mientras que el medio de las otras placas fue cambiado por un medio de cultivo fresco (200 μl), al cual se agregaron las sustancias de prueba en diversas concentraciones (0 μM y un rango de entre 0,001 y 10 μM ; la concentración final del solvente dimetil sulfóxido fue 0.5%). Las células se incubaron durante 4 días en presencia de las sustancias de prueba. La proliferación de las células se determinó coloreándolas con violeta cristalino, para lo cual las células se fijaron agregando

20 µl/punto de medición de una solución de aldehído glutárico al 11%, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de someter las células fijadas a tres ciclos de lavado con agua, se secaron las placas a temperatura ambiente. Las células se colorearon agregando 100 µl/punto de medición de una solución de violeta cristalino al 0,1% (con un pH de 3,0). Después de someter las células coloreadas a tres ciclos de lavado con agua, se secaron las placas a temperatura ambiente. El colorante se disolvió agregando 100 µl/punto de medición de una solución de ácido acético al 10%. La extinción se determinó por medios fotométricos, con una longitud de onda de 595 nm. El cambio en la cantidad de células, que se expresó como un porcentaje, se calculó sometiendo los valores medidos a una normalización en función de la extinción en la placa de control equivalente a 0% y la extinción en las células sin tratar (0 µM), equivalente a 100%. Los valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria al 50% del efecto máximo) se determinaron por medio de un ajuste de 4 aprámetros.

Se sembraron A2780 células de carcinoma de ovario humano (ECACC # 93112519) en una densidad de 2,500 células por cavidad en una placa para microtitulación de 96 cavidades en 200 µL de medio de crecimiento suplementado con 10% de suero fetal bovino. Luego de 24 horas, las células de una placa (la placa equivalente a 0%) fueron coloreadas con violeta cristalino (tal como se describió más arriba), mientras que el medio de las otras placas fue suplementado con las sustancias de prueba en diversas concentraciones (0 µM, y también en el rango de 0.01-10 µM; la concentración final del solvente dimetil sulfóxido se ajustó a 0.1%) empleando un dosificador digital Hewlett-Packard HP D300. Las células fueron encubadas durante 4 días en presencia de las sustancias de prueba. Los valores de IC₅₀ se determinaron de la manera descrita más arriba.

Ejemplos preparativos

Preparación de los compuestos:

Abreviaturas que se emplean en la descripción de las reacciones químicas y en los ejemplos que siguen:

CDCl₃: cloroformo deuterado; cHex: ciclohexano; DCM: diclorometano; DIPEA: diisopropiletilamina; DME: 1,2-dimetoxietano; DMF: N,N-dimetilformamida; DMSO: dimetil sulfóxido; eq: equivalente; ES: electronebulización; EtOAc: acetato de etilo; EtOH: etanol; iPrOH: isopropanol; mCPBA: ácido meta-cloroperoxibenzoico; MeOH: metanol; MS: espectrometría de masa; NBS: N-bromosuccinimida; RMN: resonancia magnética nuclear; Pd(dppf)Cl₂: un complejo formado por dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) y diclorometano; RT: temperatura ambiente; sat. aq.: acuoso y saturado; SiO₂: gel de sílice; TFA: ácido trifluoroacético; TFAC: anhídrido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano.

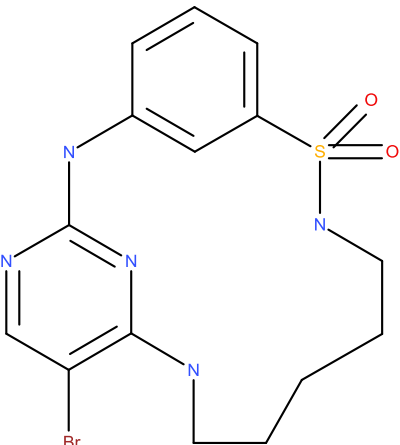
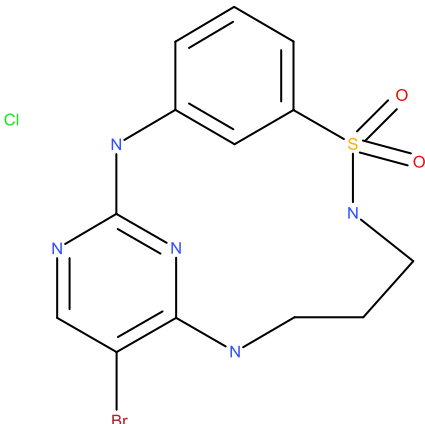
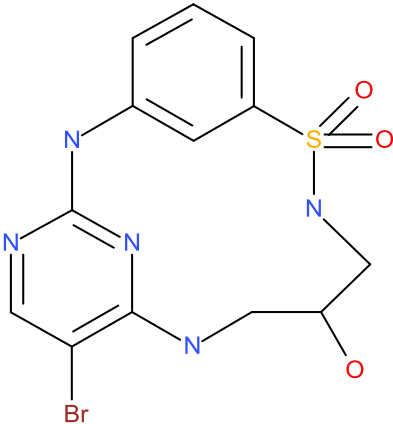
Los nombres IUPAC que se emplean en los ejemplos se generaron usando el programa informático ACD/Name versión del lote 12.01, de ACD LABS.

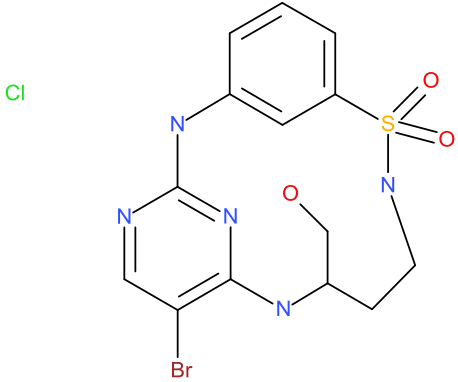
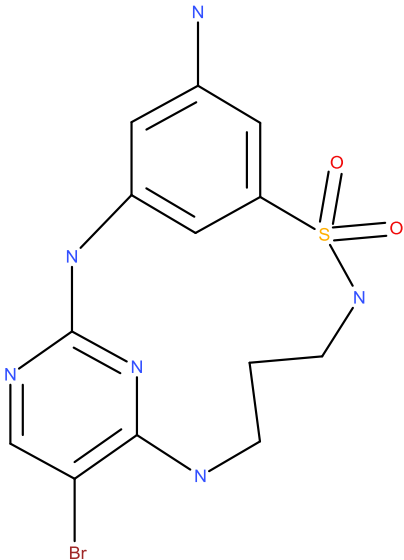
Los compuestos del documento US 2004 0209895 fueron preparados según el método descrito en US 2004 0209895.

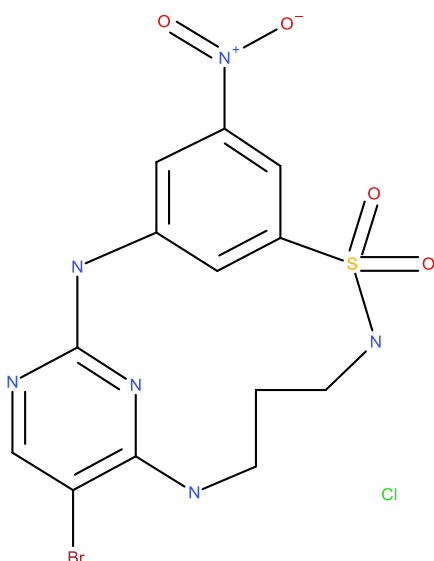
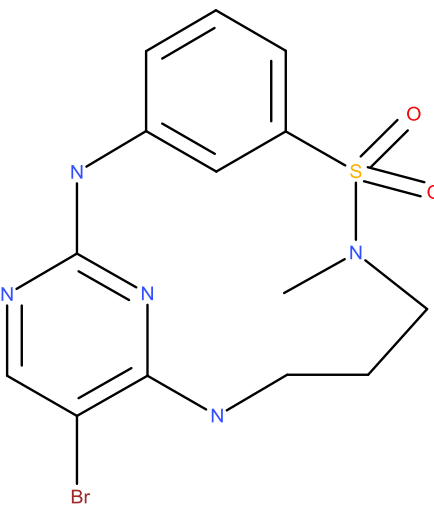
Los compuestos ensayados

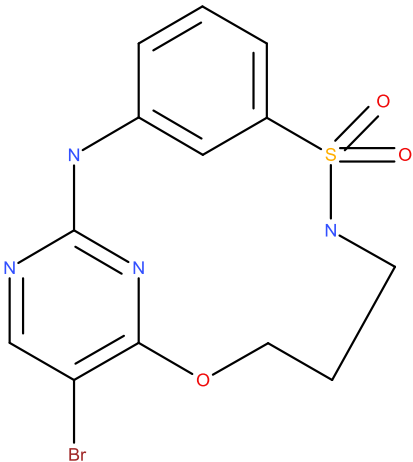
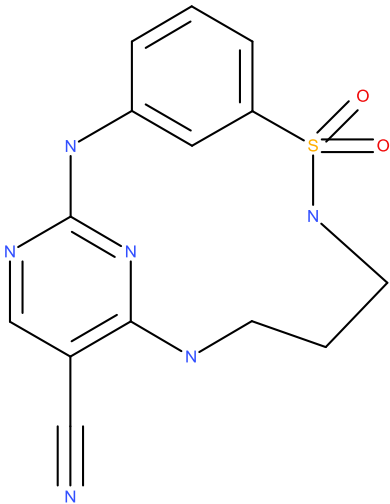
La siguiente Tabla 1 proporciona un resumen de los compuestos comparativos divulgados en US 2004 0209895:

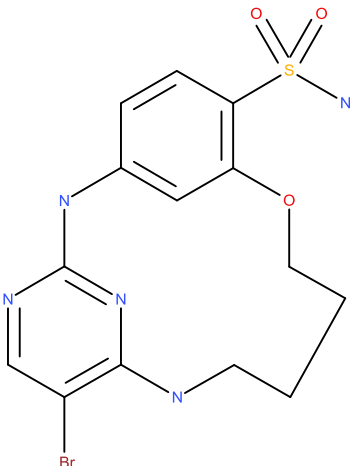
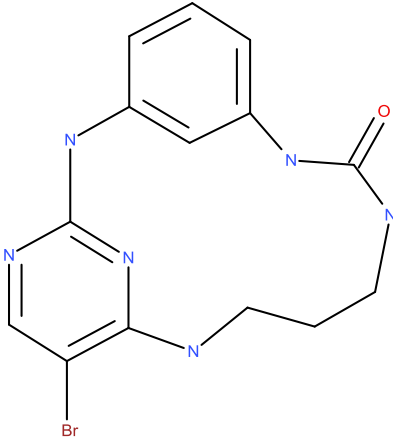
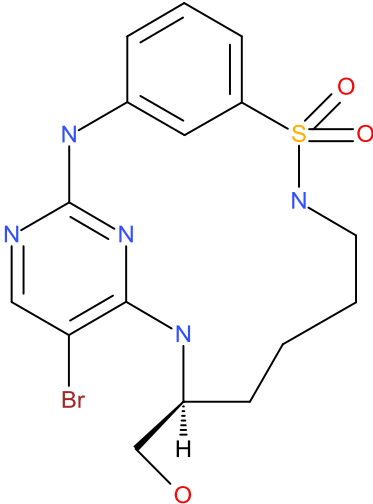
Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
--------------------------	-------------------	---------------------

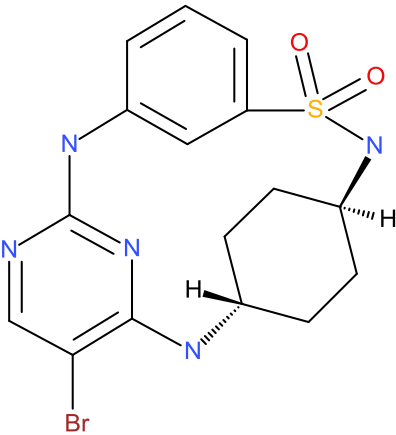
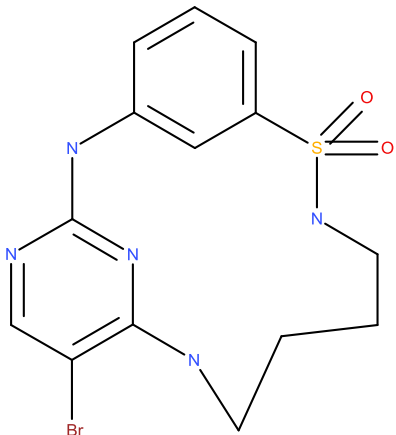
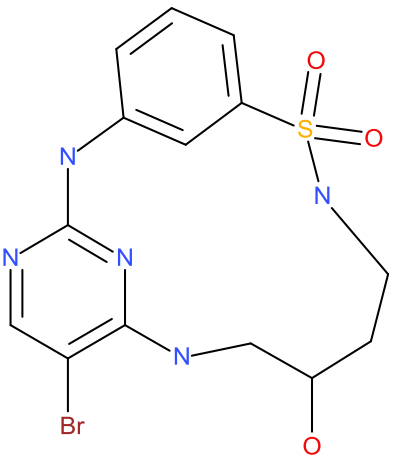
Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
1.0		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,11-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenocicloudECAfano
1.1		Clorhidrato del 4,4-dióxido de 1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-benceno-cyclononafano
1.2		4,4-Dióxido de rac-1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-benzenociclononafan-7-ol

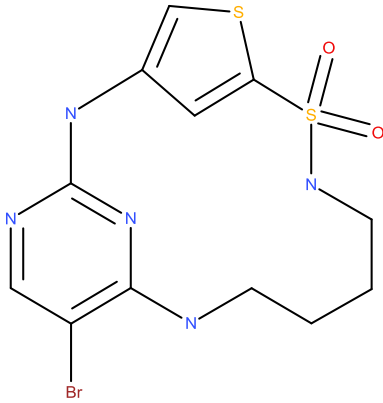
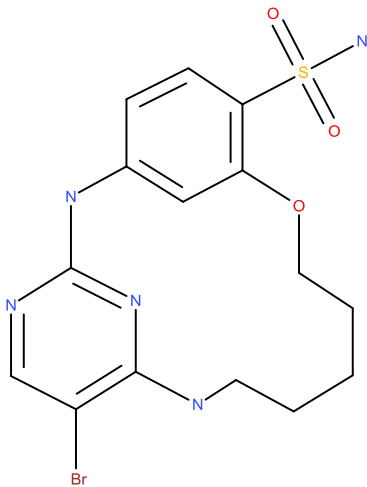
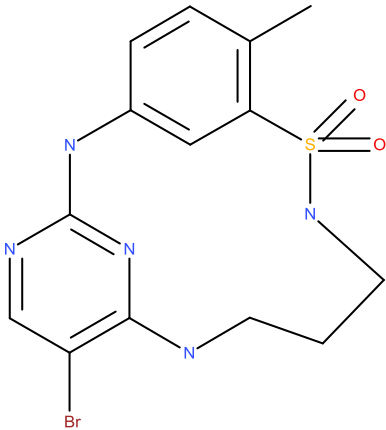
Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
1.3		Clorhidrato de [6-bromo-13,13-dioxido-13-tia-2,4,8,12,19-pentaazatriciclo[12.3.1.1 ^{3,7}]nona-deca-1(18),3(19),4,6,14,16-hexaen-9-yl]metanol
1.4		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidina-3(1,3)-bencenociclononafan-3 ⁵ -amina

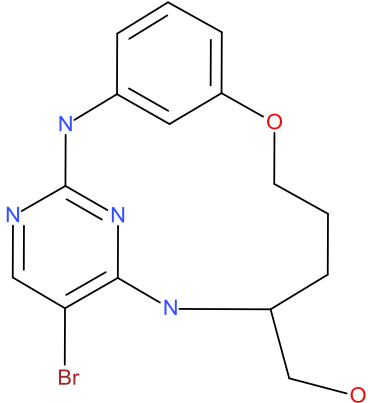
Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
1.5		Clorhidrato del 4,4-dióxido de 1 ⁵ -bromo-3 ⁵ -nitro-4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenociclononafano
2.0		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-5-metil-4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidino-3(1,3)-bencenociclononafano

Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
3.0		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-9-oxa-4-tia-2,5-diaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenociclononafano
5.0		4,4-Dióxido de 4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenociclononafano-1 ⁵ -carbonitrilo

Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
8.0		1 ⁵ -Bromo-4-oxa-2,9-diaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenociclo-nonafano-3 ⁴ -sulfonamida
10.0		1 ⁵ -Bromo-2,4,6,10-tetraaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenociclo-decafan-5-ona
14.4		4,4-Dióxido de (S)-1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,11-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenocicloundecafan-10-metanol

Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
14.15		Trans-1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,7-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-benceno-6(1,4)-ciclohexanocycloheptafano
14.6		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,10-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenocyclodecafano
14.8		4,4-Dióxido de rac-1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,10-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenocyclodecafano-8-ol

Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
14.10		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-4-tia-2,5,10-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(4,2)-tiofenocyclodecafano
14.11		1 ⁵ -Bromo-4-oxa-2,10-diaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenocyclodecafano-3 ⁴ -sulfonamida
14.16		4,4-Dióxido de 1 ⁵ -bromo-3 ⁴ -metil-4-tia-2,5,9-triaza-1(2,4)-pirimidin-3(1,3)-bencenociclononafano

Compuesto No.	Estructura	Nomenclatura
14.18		rac-1 ⁵ -Bromo-4-oxa-2,9-diaza-1(2,4)- pirimidin-3(1,3)- bencenociclononafano-8-metanol

II. Resultados:

A. Potencia y Selectividad

En la Tabla 2a que se indica a continuación se muestra la inhibición para CDK9 y CDK2 de los ejemplos comparativos de US 2004 0209895

Los valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria a 50% del efecto máximo) se indican en nM, “n.t.” significa que los compuestos no han sido evaluados en el ensayo respectivo.

①: Ejemplo Número

②: ensayo de quinasas alto ATP CDK9: CDK9/CycT1 como se describe bajo el Método 1. de Materiales y Métodos

③: ensayo de quinasas alto ATP CDK2: CDK2/CycE como se describe bajo el Método 2. de Materiales y Métodos

④: Relación IC₅₀ (Alto ATP CDK2) / IC₅₀ (Alto ATO CDK9)

Tabla 2a

①	②	③	④
---	---	---	---

①	②	③	④
1.0	855	656	0.77
1.1	>20000	11400	<0.57
1.2	>20000	3280	<0.16
1.3	8510	248	0.03
1.4	12700	1190	0.09
1.5	>20000	791	<0.04
2.0	>20000	4240	<0.2
3.0	>20000	1720	<0.086
5.0	>20000	>20000	-
8.0	>20000	4700	<0.24
10.0	18200	2820	0.15
14.4	>20000	2070	0.10
14.15	>20000	>20000	-
14.6	>20000	917	0.46
14.8	>20000	2630	0.13
14.10	>20000	178	0.009
14.11	>20000	>1630	-
14.16	>20000	859	<0.04
14.18	>20000	2100	<0.1

Conclusión A:

Los compuestos que se ejemplifican en US 2004 0209895 son mucho menos potentes con relación a CDK9 que los compuestos de los ejemplos de la presente invención (véase la

Tabla 2 de la presente solicitud en estudio). El compuesto más potente de US 2004 020 9895 es el compuesto 1.0, con una $IC_{50} = 855$ nM en el ensayo de quinasas ATP CDK9. La mayoría de los compuestos de US 2004 020985 exhiben valores $IC_{50} > 20000$ nM en este ensayo.

Asimismo, todos los compuestos ejemplificados en US 2004 0209895 no muestran selectividad frente a CDK2. Todos los compuestos que se ejemplifican en US 2004 0209895 son más activos en relación a la CDK2 que en relación a la CDK9.

B. Inhibidores de la proliferación

Tablas 3a y 3b: Inhibición de la proliferación de células HeLa, HeLa-MaTu-ADR, NCI-H460, DU145, Caco-2, B16F10 y A2780 por parte de compuestos comparativos, determinada como se describe bajo el Método 3 de Materiales y Métodos. Todos los valores de IC_{50} (concentración inhibitoria a 50% del efecto máximo) se indican en nM, “n.t.” significa que los compuestos no han sido evaluados en el ensayo respectivo.

- ①: Número de Ejemplo
- ②: Inhibición de proliferación celular HeLa
- ③: Inhibición de proliferación celular HeLa-MaTu-ADR
- ④: Inhibición de proliferación celular NCI-H460
- ⑤: Inhibición de proliferación celular DU145
- ⑥: Inhibición de proliferación celular Caco-2
- ⑦: Inhibición de proliferación celular B16F10
- ⑧: Inhibición de proliferación celular A2780

Tabla 3a: Indicaciones representadas por las líneas celulares

Línea celular	Fuente	Indicación
HeLa	ATCC	Tumor cervical humano
HeLa-MaTu-ADR	EPO-GmbH Berlin	Carcinoma cervical humano resistente a multidroga
NCI-H460	ATCC	Carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas
DU 145	ATCC	Carcinoma de próstata humano independiente de hormona
Caco-2	ATCC	Carcinoma colorrectal humano
B16F10	ATCC	Melanoma de ratón
A2780	ECACC	Carcinoma de ovario humano

Tabla 3b: Inhibición de la proliferación

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
1.0							1020
1.1					439		3990
1.2							657
1.3		2830	1720	2920			4120
1.4	101	156	201	794	2650	335	
1.5		635	552	1270			445
2.0							1680
3.0							1480
5.0	298	1270	3110	4770	7490	3010	6400
8.0		433	599	493	>10000		5630
10.0							872
14.4							1080

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
14.15		1260	1160	1170			>10000
14.16							8590
14.8							3470
14.10		205	155	422			155
14.11		1270	941	905			>10000
14.6		312	673	1690			302
14.18							4820

Conclusión B

Los compuestos de US 2004 0209895 tienen una actividad antiproliferativa moderada a débil en diferentes líneas celulares. Debido a su baja actividad respecto de CDK9, es muy probable que la actividad antiproliferativa no esté impulsada por la inhibición de CDK9. Los compuestos de la presente invención son mucho más potentes en las mismas líneas celulares ensayadas (véase la Tabla 3 de la presente solicitud de patente en estudio). Los valores de IC50 de los compuestos conforme a la presente invención fueron determinados en base a los ensayos descritos en la presente solicitud de patente en estudio. Estos ensayos son iguales a los ensayos descritos más arriba para los compuestos comparativos. Sólo el ensayo para A2780 difiere levemente, pero solamente se espera una influencia menor en la variabilidad de las diversas mediciones.

Conclusión general:

A diferencia de US2004 0209895, la presente solicitud en estudio ejemplifica compuestos macrocíclicos que exhiben una actividad alta en contra de la quinasa CDK9 transcripcional y una selectividad alta frente a la quinasa CDK2. Este perfil de actividad se traduce en una actividad antiproliferativa alta en diversas líneas celulares in vitro.