



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 416**

51 Int. Cl.:
C07D 239/48 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05844183 .3**
96 Fecha de presentación : **15.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1824489**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54

Título: **Compuestos de primidindiamina-3-aminocarbonilo o biciclohepteno enriquecidos estereoisoméricamente y sus usos.**

30

Prioridad: **15.11.2004 US 628199 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73

Titular/es: **RIGEL PHARMACEUTICALS, Inc.**
1180 Veterans Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

72

Inventor/es: **Argade, Ankush;**
Singh, Rajinder y
Li, Hui

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 359 416 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de pirimidindiamina 3-aminocarbonilo biciclohepteno enriquecidos estereoisoméricamente y sus usos

2. CAMPO

5 La presente descripción se refiere a composiciones enriquecidas estereoisoméricamente de compuestos de fenil-2,4-pirimidindiamina 4N-(3-aminocarbonilbiciclo-[2.2.1]hept-5-en-2-il)-N2-sustituidos que presentan actividad antiproliferante, a los profármacos de los compuestos, a los productos intermedios y a los métodos de síntesis para la preparación de los compuestos y/o profármacos, a las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y/o a los profármacos y a la utilización de los compuestos y/o profármacos en una variedad de contextos, que incluyen, por ejemplo, el tratamiento de tumores y cánceres.

3. ANTECEDENTES

15 El cáncer es un grupo de enfermedades variadas caracterizadas por el crecimiento incontrolado y extendido de células anormales. Generalmente, todos los tipos de cánceres conllevan alguna anomalía en el control del crecimiento y división celulares. La serie de procesos que regulan la división celular y/o la comunicación celular llega a alterarse en las células cancerosas de modo que los efectos de estos mecanismos reguladores no pueden controlar ni limitar el crecimiento celular o son desviados. Mediante sucesivas rondas de mutación y selección natural, un grupo de células anormales, que se originan generalmente a partir de una sola célula mutante, acumulan otras mutaciones que proporcionan la ventaja del crecimiento selectivo sobre otras células, y de este modo evolucionan en un tipo de célula que predomina en la masa celular. Este proceso de mutación y selección natural está potenciado por la inestabilidad genética presentada por muchos tipos de células cancerosas, inestabilidad que se adquiere en las mutaciones somáticas o por herencia a partir de la línea germinal. El aumento de mutabilidad de las células cancerosas aumenta la probabilidad de su evolución hacia la formación de células malignas. A medida que las células cancerosas evolucionan más, algunas se vuelven localmente invasoras y entonces se metastatizan para colonizar otros tejidos aparte del tejido de la célula cancerosa de origen. Esta propiedad junto con la heterogeneidad de la población de las células tumorales convierte al cáncer en una enfermedad particularmente difícil de tratar y erradicar.

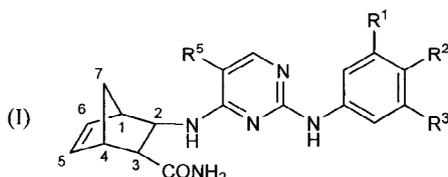
30 Los tratamientos tradicionales del cáncer se benefician de la mayor capacidad proliferante de las células cancerosas y de su aumento de sensibilidad a las alteraciones del ADN. La radiación ionizante, incluyendo los rayos γ y los rayos X, y los agentes citotóxicos, tales como bleomicina, cis-platino, vinblastina, ciclofosfamida, 5'-fluorouracilo y metotrexato, se basan en la alteración generalizada del ADN y en la desestabilización de la estructura cromosómica que conduce finalmente a la destrucción de las células cancerosas. Estos tratamientos son particularmente eficaces para aquellos tipos de cánceres que presentan defectos en el punto de control del ciclo celular, lo que limita la capacidad de estas células para reparar el ADN alterado antes de experimentar la división celular. La naturaleza no selectiva de estos tratamientos, sin embargo, produce con frecuencia efectos secundarios graves y debilitadores. La utilización generalizada de estos fármacos puede producir daños a los órganos y tejidos normalmente sanos y afectar la salud a largo plazo del paciente.

45 Aunque se han desarrollado tratamientos quimioterapéuticos más selectivos basados en el conocimiento de cómo el cáncer desarrolla, por ejemplo, el compuesto antiestrógeno tamoxifeno, la eficacia de todos los tratamientos quimioterapéuticos está sometida al desarrollo de resistencia a los fármacos. El aumento de expresión de los transportadores unidos a la membrana celular, tales como Mdr1, produce un fenotipo con multiresistencia a fármacos caracterizado por el aumento de la salida de fármacos de la célula. Estos tipos de adaptación de la célula cancerosa limitan seriamente la eficacia de determinadas clases de agentes quimioterapéuticos. Por consiguiente, la identificación de otros agentes quimioterapéuticos, particularmente los estereoisómeros activos y/o las mezclas estereoisoméricas es crítica para crear terapias eficaces destinadas a atacar la naturaleza heterogénea de la enfermedad proliferante y para superar cualquier resistencia que pueda desarrollarse durante el transcurso de la terapia con otros

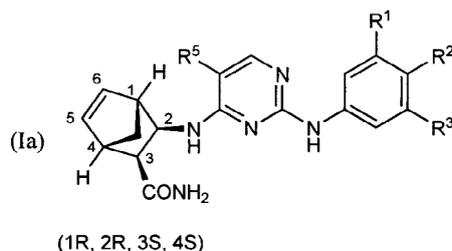
compuestos. Además, la utilización de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, incluyendo diferentes estereoisómeros y/o las mezclas estereoisoméricas de un determinado agente quimioterapéutico, que pueden presentar propiedades y dianas celulares diferentes, aumenta la eficacia de la quimioterapia y limita la generación de resistencia al fármaco.

5 4. SUMARIO

En un aspecto, se proporcionan compuestos de fenil-2,4-pirimidindiamina 4N-(3-aminocarbonilbiciclo-[2.2.1]hept-5-en-2-il)-2N-sustituidos enriquecidos en diastereoisómeros especificados los cuales presentan actividad antiproliferante contra varios tipos diferentes de células tumorales. En algunas formas de realización, se proporcionan compuestos según la fórmula estructural (I):



que comprenden, sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de esta, que están enriquecidos en el correspondiente diastereómero de fórmula estructural (Ia), denominado diastereómero (1R,2R,3S,4S):

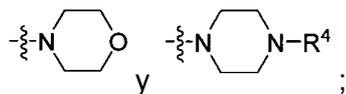


15

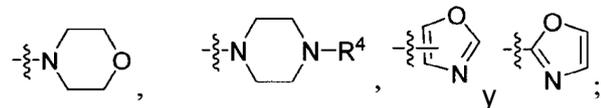
en la que:

cada R¹ se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, -(CH₂)_n-OH, -OR^a, -O(CH₂)_n-R^a, -O(CH₂)_n-R^b, -C(O)OR^a, halo, -CF₃, y -OCF₃;

20 cada R² se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, -OR^a, -O(CH₂)_n-R^a, -O(CH₂)_n-R^b, -NHC(O)OR^a, halo, -CF₃, -OCF₃



cada R³ se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, -(CH₂)_n-OH, -OR^a, -O(CH₂)_n-R^a, -O(CH₂)_n-R^b, halo, -CF₃, -OCF₃,



25 cada R⁴ se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, arilalquilo, -OR^a, -NR^cR^c, -C(O)R^a, -C(O)OR^a y -C(O)NR^cR^c;

R⁵ es hidrógeno, halo, fluoro, -CN, -NO₂, -C(O)OR^a o -CF₃;

cada n es independientemente un número entero de 1 a 3;

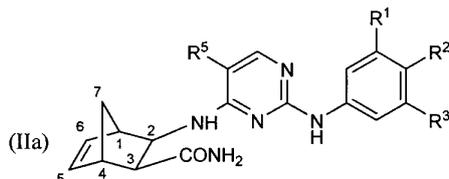
30 cada R^a se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior y cicloalquilo inferior;

cada R^b se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por -OR^a, -CF₃, -OCF₃, -NR^cR^c, -C(O)R^a, -C(O)OR^a y -C(O)NR^cR^c y -C(O)NR^aR^d;

5 cada R^c se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo inferior, o, alternativamente, dos sustituyentes R^c pueden considerarse junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo saturado de 4 a 9 elementos que comprende opcionalmente 1 a 2 grupos heteroatómicos adicionales seleccionados de entre O, NR^a, NR^a-C(O)R^a, NR^a-C(O)OR^a y NR^a-C(O)NR^a; y

cada R^d es independientemente monohidroxiálquilo inferior o dihidroxiálquilo inferior.

En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula estructural (I) es una mezcla racémica de isómeros *cis* (2-*exo*-3-*exo*) según la fórmula estructural (IIa):



10 que comprenden sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de esta, en la que R¹, R², R³ y R⁵ son tal como se definieron para la fórmula estructural (I), *supra*.

15 En algunas formas de realización, el compuesto es un diastereoisómero enriquecido en estereoisómeros según la fórmula estructural (Ia), *supra*, que comprende sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de esta, que está sustancialmente exento de su enantiómero y de cualquier otro de sus diastereómeros.

20 Se describen profármacos de los compuestos enriquecidos en estereoisómeros. Dichos profármacos pueden ser activos en su forma de profármaco o pueden ser inactivos hasta que se convierten, en condiciones de utilización fisiológicas o en otras, en una forma de fármaco activo. En los profármacos, uno o más grupos funcionales de los compuestos enriquecidos en estereoisómeros están incluidos en prorrastos que se escinden de la molécula en las condiciones de utilización, típicamente por hidrólisis, escisión enzimática o algún otro mecanismo de escisión, para proporcionar los grupos funcionales. Por ejemplo, los grupos amino primario o secundario pueden estar incluidos en un prorrasto amida que se escinde en condiciones de utilización para generar el grupo amino primario o secundario. Por este motivo, los profármacos incluyen tipos especiales de grupos protectores, denominados "progrupos", que enmascaran uno o más grupos funcionales de los compuestos que escinden en las condiciones de utilización para proporcionar un compuesto de fármaco activo. Los grupos funcionales dentro de los compuestos enriquecidos en estereoisómeros que pueden enmascarse con progrupos para la inclusión en un progrupo comprenden, pero no se limitan a, aminas (primarias y secundarias), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, carbonilos, etc. Una infinidad de progrupos adecuados para enmascarar dichos grupos funcionales para proporcionar prorrastos que son escindibles en las condiciones deseadas de utilización son conocidos en la técnica. Todos estos progrupos, solos o combinados, pueden estar incluidos en los profármacos. Ejemplos específicos de progrupos que proporcionan grupos amino primario o secundario que pueden estar incluidos en los profármacos comprenden, pero no se limitan a, amidas, carbamatos, iminas, ureas, fosfenilos, fosforilos y sulfenilos. Ejemplos específicos de prorrastos que proporcionan grupos sulfanilo que pueden estar incluidos en los profármacos comprenden, pero no se limitan a, tioéteres, por ejemplo, derivados de S-metilo (acetales monotío, ditío, oxtío, aminotío), tioéteres de sililo, tioésteres, tiocarbonatos, tiocarbamatos, disulfuros asimétricos, etc. Ejemplos específicos de prorrastos que se escinden para proporcionar grupos hidroxilo que pueden estar incluidos en los profármacos comprenden, pero no se limitan a, sulfonatos, ésteres y carbonatos. Ejemplos específicos de prorrastos que proporcionan grupos carboxilo que pueden estar incluidos en los profármacos comprenden, pero no se limitan a, ésteres (incluyendo ésteres de sililo, ésteres del ácido oxámico y tioésteres), amidas e hidrazidas.

45 En otro aspecto todavía, se proporcionan composiciones que comprenden uno o más compuestos enriquecidos en estereoisómeros. Las composiciones comprenden generalmente el o los compuestos y/o profármacos, sales, hidratos, solvatos y/o N-óxidos de estos, y un vehículo,

excipiente y/o diluyente apropiado. La naturaleza exacta del vehículo, excipiente y/o diluyente dependerá de la utilización deseada de la composición, y puede variar entre ser adecuada o aceptable para utilizaciones *in vitro*, ser adecuada o aceptable para utilizaciones veterinarias y ser adecuada o aceptable para utilizaciones en seres humanos.

5 Los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria son inhibidores potentes de la proliferación de células anormales, tales como las células tumorales, en ensayos *in vitro*. Por este motivo, en otro aspecto todavía, se proporcionan usos en métodos de inhibición de la proliferación de células anormales, en particular células tumorales. Los usos implican generalmente poner en contacto una célula anormal, tal como una célula tumoral, con
10 una cantidad de uno o más compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria y/o profármacos, sales, hidratos, solvatos y/o N-óxidos de estos, eficaces para inhibir la proliferación de las células. Las células pueden ponerse en contacto con el compuesto por sí mismas o puede formularse el compuesto en una composición. Los métodos pueden ponerse en práctica en contextos *in vitro*. En contextos *in vivo*, la inhibición de la proliferación de células
15 anormales es un método terapéutico destinado al tratamiento o la prevención de trastornos proliferantes, tales como los cánceres tumorígenos.

Se describe el uso en métodos de tratamiento de trastornos proliferantes. Los usos pueden ponerse en práctica en animales en contextos veterinarios o en seres humanos. Los usos implican generalmente la administración a un paciente animal o humano de una cantidad de uno o más
20 compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria y/o profármacos, sales, hidratos, solvatos y/o N-óxidos de estos, eficaces para tratar o prevenir el trastorno proliferante. El o los compuestos pueden administrarse solos a un paciente, o el o los compuestos pueden administrarse en forma de composición. Los trastornos proliferantes que pueden ser tratados según los métodos comprenden, pero no se limitan a, cánceres tumorígenos.

25 Los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria son potentes inhibidores de las Aurora cinasas. Las Aurora cinasas son una familia de enzimas conocidas por ser reguladoras clave de la división celular. Se han encontrado concentraciones elevadas de Aurora cinasas en varios tipos de células cancerosas humanas, tales como en tumores de mama, de colon, renal, cervical, neuroblastómeros, melanoma, linfoma, pancreático,
30 de próstata y otros tumores sólidos (véase, p. ej., Brischott *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17:3052-3065; Geopfert y Brinkley, 2000, *Curr. Top. Dev. Biol.* 49:331-342; Sakakura *et al.*, 2001, *Br. J. Cancer* 84:824-831), y se ha demostrado que la sobreexpresión de las Aurora cinasas provoca la transformación celular, un proceso mediante el cual las células normales se vuelven cancerosas. Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría particular sobre el modo de actuación, se cree que los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria, así
35 como sus profármacos, sales, hidratos, solvatos y/o N-óxidos, ejercen su actividad antiproliferante inhibiendo una o más Aurora cinasas.

Por este motivo, en otro aspecto todavía, se proporcionan usos en métodos de inhibición de una actividad de una Aurora cinasa. Los métodos comportan generalmente poner en contacto
40 una Aurora cinasa con una cantidad de uno o más compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria y/o de sales, hidratos, solvatos y/o N-óxidos de estos, eficaces para la inhibición de su actividad. Los usos pueden ponerse en práctica en contextos *in vitro* con enzimas de Aurora cinasa purificadas o parcialmente purificadas (p. ej., con extractos de células que expresen una base de Aurora), en contextos *in vitro* con células intactas que expresen una Aurora cinasa. En contextos *in vivo*, la inhibición de una actividad de una Aurora cinasa sirve para
45 inhibir un proceso mediado por Aurora cinasa (por ejemplo, la mitosis celular) y/o como método terapéutico destinado al tratamiento o a la prevención de enfermedades o trastornos que están mediados, por lo menos en parte, por la actividad de la Aurora cinasa.

Se describen usos en métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos mediados por Aurora cinasa. Los usos comportan generalmente la administración a un paciente
50 animal o humano de una cantidad de uno o más compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria y/o de sales, hidratos, solvatos y/o N-óxidos activos de estos, eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno mediado por Aurora cinasa. Las

enfermedades y trastornos mediados por Aurora cinasa comprenden cualquier enfermedad, trastorno u otra afección nociva en la que un miembro de la familia de enzimas Aurora cinasa desempeña una función. Ejemplos específicos de dichas enfermedades o trastornos mediados por Aurora cinasa comprenden, pero no se limitan a, melanoma, leucemia y cánceres de tumores sólidos, tales como, por ejemplo, cánceres de colon, de mama, gástrico, de ovario, cervical, melanoma, renal, de próstata, linfoma, neuroblastoma, pancreático y de vejiga.

Otros aspectos comprenden, pero no se limitan a, productos intermedios y métodos útiles para sintetizar los compuestos enriquecidos en estereoisómeros, tal como se describirán con más detalle en la presente memoria a continuación.

5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGs. 1 a 4 ilustran el efecto inhibidor de la sal bisclorhídrica de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo-[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina (compuesto 60a-2HCl) sobre el crecimiento de varios tipos diferentes de tumores en el tratamiento del xenotrasplante normal y en modelos de regresión.

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA

6.1 Definiciones

Tal como se utilizan en la presente memoria, se propone que los términos siguientes tengan los significados siguientes:

“Alquilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal, ramificada, saturado o insaturado o cíclico que tiene el número indicado de átomos de carbono (es decir, C1-C6 significa de uno a seis átomos de carbono) que procede de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino precursor. Los grupos alquilo típicos comprenden, pero no se limitan a, metilo; etilos tales como etanilo, etenilo y etinilo; propilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo, ciclopropan-1-ilo, prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo, cicloprop-2-en-1-ilo, prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metilpropan-1-ilo, 2-metilpropan-2-ilo, ciclobutan-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metilprop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.; y similares. Cuando se desean niveles de saturación específicos, se utiliza la nomenclatura específica “alcanilo”, “alquenilo” y/o “alquinilo”, como se define a continuación. “Alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

“Alcanilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo de cadena lineal, ramificada saturado o cíclico que procede de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano precursor. Los grupos alcanilo típicos comprenden, pero no se limitan a, metanilo; etanilo; propanilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropilo), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo (*sec*-butilo), 2-metilpropan-1-ilo (isobutilo), 2-metilpropan-2-ilo (*t*-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc.; y similares.

“Alquenilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo de cadena lineal, ramificada insaturado o cíclico con por lo menos un doble enlace carbono-carbono que procede de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alqueno precursor. El grupo puede estar en la conformación *cis* o *trans* respecto al doble o dobles enlaces. Los grupos alquenilo típicos comprenden, pero no se limitan a, etenilo; propenilos tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, prop-2-en-2-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo, cicloprop-2-en-1-ilo; butenilos tales como but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metilprop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, etc.; y similares.

“Alquinilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo de cadena lineal, ramificada insaturado o cíclico con por lo menos un triple enlace carbono-carbono que procede de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alquino precursor. Los grupos alquinilo típicos comprenden, pero no se limitan a, etinilo; propinilos tales como prop-1-

in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos tales como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.; y similares.

“Alquildiilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente de cadena lineal, ramificada, saturado o insaturado o cíclico que tiene el número
5 indicado de átomos de carbono (es decir, C1-C6 significa de uno a seis átomos de carbono) que procede de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino precursor, o de la eliminación de dos átomos de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino precursor. Los dos centros del radical monovalente o cada valencia del centro del radical divalente pueden formar enlaces con el mismo
10 o diferentes átomos. Los grupos alquildiilo típicos comprenden, pero no se limitan a, metandiilo; etildiilos tales como etan-1,1-diilo, etan-1,2-diilo, eten-1,1-diilo, eten-1,2-diilo; propildiilos tales como propan-1,1-diilo, propan-1,2-diilo, propan-2,2-diilo, propan-1,3-diilo, ciclopropan-1,1-diilo, ciclopropan-1,2-diilo, prop-1-en-1,1-diilo, prop-1-en-1,2-diilo, prop-2-en-1,2-diilo, prop-1-en-1,3-diilo, cicloprop-1-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,1-diilo, prop-1-in-1,3-diilo, etc.; butildiilos tales como butan-1,1-diilo, butan-1,2-diilo, butan-1,3-diilo, butan-1,4-diilo, butan-2,2-diilo, 2-metil-propan-1,1-diilo, 2-metil-propan-1,2-diilo, ciclobutan-1,1-diilo, ciclobutan-1,2-diilo, ciclobutan-1,3-diilo, but-1-en-1,1-diilo, but-1-en-1,2-diilo, but-1-en-1,3-diilo, but-1-en-1,4-diilo, 2-metil-prop-1-en-1,1-diilo, 2-metaniliden-propan-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,2-diilo, buta-1,3-dien-1,3-diilo, buta-1,3-dien-1,4-diilo, ciclobut-1-en-1,2-diilo, ciclobut-1-en-1,3-diilo, ciclobut-2-en-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,3-diilo, but-1-in-1,3-diilo, but-1-in-1,4-diilo, buta-1,3-diin-1,4-diilo, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se utiliza la nomenclatura alcanildiilo, alquendiilo y/o alquinildiilo. Cuando se pretende específicamente que las dos valencias estén en el mismo átomo de carbono, se utiliza la nomenclatura “alquilideno”. Un “alquildiilo inferior” es un grupo alquildiilo que contiene de 1 a 6
25 átomos de carbono. En algunas formas de realización, los grupos alquildiilo son grupos alcanildiilo acíclicos saturados en los que los centros del radical están en los carbonos terminales, p. ej., metandiilo (metano); etan-1,2-diilo (etano); propan-1,3-diilo (propano); butan-1,4-diilo (butano); y similares (también denominados alquilenos, definidos a continuación).

“Alquileno” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquildiilo saturado o insaturado de cadena lineal con dos centros de radicales monovalentes terminales procedentes de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de los dos átomos de carbono terminales de un alcano, alqueno o alquino precursor de cadena lineal. La posición de un doble o triple enlace, si está presente, en un alquileno determinado se indica entre corchetes. Los grupos alquileno típicos comprenden, pero no se limitan a, metileno (metano); etilenos tales como etano, eteno y etino; propilenos tales como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, etc.;
35 butilenos tales como butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieno, but[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles de saturación específicos, se utiliza la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino.

En algunas formas de realización, el grupo alquileno es alquileno (C1-C6) o (C1-C3). En algunas formas de realización, el grupo alquileno es un grupo alcano saturado de cadena lineal, p. ej., metano, etano, propano, butano y similares.

“Cicloalquilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a una versión cíclica de un grupo “alquilo”. Los grupos cicloalquilo típicos comprenden, pero no se limitan a, ciclopropilo; ciclobutilos tales como ciclobutanilo y ciclobutenilo; ciclopentilos tales como ciclopentanilo y
45 ciclopentenilo; ciclohexilos tales como ciclohexanilo y ciclohexenilo; y similares.

“Sistema precursor de anillo aromático” se refiere a un sistema de anillo cíclico o policíclico insaturado con un sistema de electrones π conjugados. En la definición de “sistema precursor de anillo aromático” están incluidos particularmente los sistemas con anillos fusionados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos están saturados o insaturados,
50 tales como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, tetrahidronaftaleno, etc. Los sistemas precursores de anillo aromático típicos comprenden, pero no se limitan a, aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno,

octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleyadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, tetrahidronaftaleno, trifenileno, trinaftaleno y similares.

5 “Arilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente que tiene el número indicado de átomos de carbono (es decir, C5-C15 significa de 5 a 15 átomos de carbono) que procede de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema precursor de anillo aromático. Los grupos arilo típicos comprenden, pero no se limitan a, grupos derivados del aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, 10 hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleyadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como sus diversos hidro-isómeros. En algunas formas de realización, el grupo arilo es arilo (C5-C15), siendo más típico (C5-C10). Ejemplos específicos son fenilo y naftilo.

15 “Halógeno” o “halo” solos o como parte de otro sustituyente, a menos que se indique de otro modo, se refieren a flúor, cloro, bromo y yodo.

20 “Haloalquilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos por un halógeno. Por lo tanto, el término “haloalquilo” da a entender que comprende monohaloalquilos, dihaloalquilos, trihaloalquilos, etc. hasta perhaloalquilos. Por ejemplo, la expresión “haloalquilo (C1-C2)” comprende fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluoroetilo, etc.

25 “Hidroalquilo” solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos por un sustituyente hidroxilo. Por lo tanto, el término “hidroalquilo” da a entender que comprende monohidroalquilos, dihidroalquilos, trihidroalquilos, etc.

30 Los grupos definidos anteriormente pueden incluir prefijos y/o sufijos que se utilizan habitualmente en la técnica para crear grupos sustituyentes adicionales muy reconocidos. A título de ejemplo, “alquiloxi” o “alcoxi” se refiere a un grupo de fórmula –OR, “alquilamina” se refiere a un grupo de fórmula –NHR y “dialquilamina” se refiere a un grupo de fórmula –NRR, en la que cada R es independientemente un alquilo. Como otro ejemplo, “haloalcoxi” o “haloalquiloxi” se refiere a un grupo de fórmula –OR’, en la que R’ es un haloalquilo.

35 “Profármaco” se refiere a un derivado de un compuesto activo (fármaco) que puede necesitar una transformación en las condiciones de utilización, como por ejemplo en el interior del cuerpo, para liberar el fármaco activo. Los profármacos son frecuentemente, pero no necesariamente, farmacológicamente inactivos hasta que se transforman en el fármaco activo. Los profármacos se obtienen típicamente enmascarando un grupo funcional en el compuesto del fármaco que se considera en parte necesario para la actividad con un progrupo (definido a continuación) para formar un prorresto que experimenta una transformación, tal como una 40 escisión, en condiciones específicas de utilización para liberar el grupo funcional, y por consiguiente el fármaco activo. La escisión del progrupo puede proceder espontáneamente, tal como mediante una reacción de hidrólisis, o puede estar catalizada o inducida por otro agente, tal como por una enzima, por la luz, por un ácido o una base o por un cambio de un parámetro físico o medioambiental, tal como un cambio de temperatura, o por exposición al mismo. El agente 45 puede ser endógeno en las condiciones de utilización, tal como una enzima presente en las células a las que se administra el profármaco o en las condiciones ácidas del estómago o puede suministrarse de modo exógeno.

50 Son bien conocidos en la técnica una amplia variedad de progrupos, así como los prorrestos resultantes, adecuados para enmascarar los grupos funcionales en los compuestos activos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria para producir profármacos. Por ejemplo, un grupo funcional hidroxilo puede enmascararse como prorresto sulfonato, éster o carbonato, el cual puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo hidroxilo.

Un grupo funcional amino puede enmascarse como proreosto amida, carbamato, imina, urea, fosfenilo, fosforilo o sulfenilo, el cual puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo amino. Un grupo carboxilo puede enmascarse como proreosto éster (incluyendo los ésteres de sililo y los tioésteres), amida o hidrazida, el cual puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo carboxilo. Otros ejemplos específicos de proreostos adecuados y sus respectivos proreostos son evidentes para los expertos en la materia.

“Progrupo” se refiere a un tipo de grupo protector que, cuando se utiliza para enmascarar un grupo funcional en un compuesto de fármaco activo enriquecido en estereoisómeros para formar un proreosto, convierte el fármaco en un profármaco. Los progrupos están típicamente unidos al grupo funcional del fármaco mediante enlaces que pueden escindirse en las condiciones específicas de utilización. De este modo, un progrupo es la parte de un proreosto que se escinde para liberar el grupo funcional en las condiciones especificadas de utilización. A título de ejemplo específico, un proreosto amida de fórmula -NH-C(O)CH_3 comprende el progrupo -C(O)CH_3 .

“Trastorno proliferante” se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por la proliferación de células anormales, por ejemplo, cuando las células se dividen más que sus células normales homólogas. La proliferación anormal puede producirse por cualquier mecanismo o combinación de mecanismos de actuación. Por ejemplo, el ciclo celular de una o más células puede estar afectado de modo que la célula o células se dividan con más frecuencia que sus células normales homólogas, o como otro ejemplo, una o más células pueden desviar las señales inhibitorias, que limitarían normalmente su número de divisiones. Las enfermedades proliferantes comprenden, pero no se limitan a, los tumores y cánceres de desarrollo lento o rápido.

“Compuesto antiproliferante” se refiere a un compuesto que inhibe la proliferación de una célula en comparación con una célula de referencia no tratada de un tipo similar. La inhibición puede ser ocasionada por cualquier mecanismo o combinación de mecanismos y puede operar para inhibir la proliferación citostática o citotóxicamente. Como ejemplo específico, la inhibición tal como se emplea en la presente memoria comprende, pero no se limita a, la interrupción de la división celular, una reducción de la frecuencia de la división celular, la proliferación y/o el crecimiento y/o la provocación de la muerte celular, por cualquier mecanismo de actuación, incluyendo, por ejemplo la apoptosis.

“Aurora cinasa” se refiere a un miembro de la familia de las serina/treonina proteína cinasas que se denominan generalmente “Aurora” cinasas. La familia “Aurora” de las serina/treonina proteína cinasas es esencial para la proliferación celular (véase, p. ej., Bischoff y Plowman, 1999, *Trends Cell Biol.* 9:454-459; Giet y Prigent, 1999, *J. Cell Science* 112:3591-3601; Nigg, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:21-32; Adams *et al.*, 2001, *Trends Cell Biol.* 11:49-54). Actualmente, existen tres miembros conocidos de la familia de mamíferos: Aurora-A (“2”), Aurora-B (“1”) y Aurora-C (“3”) (véase, p. ej., Giet y Prigent, 1999, *J. Cell. Sci.* 112:3591-3601; Bischoff y Plowman, 1999, *Trends Cell Biol.* 9:454-459). Tal como se utiliza en la presente memoria, “Aurora cinasa” comprende no solamente estos tres miembros conocidos de la familia de mamíferos, sino también los miembros de la familia de los mamíferos descubiertos posteriormente y las proteínas homólogas de otras especies y organismos (para ejemplos no limitativos de miembros homólogos de la familia Aurora cinasa de otras especies y organismos, véase Schumacher *et al.*, 1998, *J. Cell Biol.* 143:1635-1646; Kimura *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:13766-13771).

“Proceso mediado por Aurora cinasa” o “enfermedad o trastorno mediado por Aurora cinasa” se refiere a un proceso, enfermedad o trastorno celular en el que una Aurora cinasa desempeña una función. Se cree que las Aurora cinasas desempeñan una función clave en los casos de fosforilación proteica que regulan la fase mitótica del ciclo celular. Las Aurora cinasas humanas presentan distintas posiciones subcelulares durante la mitosis. Por ejemplo, la Aurora-A está regulada por aumento durante la fase M del ciclo celular y se localiza en el polo del huso durante la mitosis, lo que sugiere su implicación en las funciones del centrosoma. Aunque la actividad de la Aurora-A se maximiza durante la profase, se cree que la Aurora-B desempeña una función importante durante la separación de la cromátide y la formación del surco de escisión en la anafase y telofase. La función de la Aurora-C está menos clara, pero se ha demostrado que se localiza en los centrosomas durante la mitosis desde la anafase hasta la citocinesis. Además, la

inhibición de la actividad de la Aurora cinasa en las células de los mamíferos conduce al crecimiento celular anormal y a la poliploidia (Terada *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17:667-676). Por este motivo, se cree que las Aurora cinasas regulan la división celular, la segregación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la citocinesis. Tal como se utilizan en la presente memoria, todos estos procesos están comprendidos en el alcance del “proceso mediado por las Aurora cinasa”.

Además, desde su descubrimiento en 1997, la familia de la Aurora cinasa de mamíferos ha estado estrechamente ligada a la tumorigénesis. La prueba más convincente de esto es que la sobreexpresión de la Aurora-A transforma los fibroblastos de roedores (Bischoff *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17:3052-3065). Las células con elevadas concentraciones de esta cinasa contienen múltiples centrosomas y husos multipolares y se vuelven rápidamente aneuploides. La actividad oncogénica de las Aurora cinasas probablemente debe relacionarse con la generación de dicha inestabilidad genética. De hecho, se ha observado una correlación entre la ampliación del locus de Aurora-A y la inestabilidad cromosómica en los tumores de mama y de estómago (Miyoshi *et al.*, 2001, *Int. J. Cancer* 92:370-373; Sakakura *et al.*, 2001, *Brit. J. Cancer* 84:824-831).

Se ha descrito que las Aurora cinasas se sobreexpresan en una amplia gama de tumores humanos. Se ha detectado expresión elevada de Aurora-A en más del 50% de los tumores colorrectales (Bischoff *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17:3052-3065; Takahashi *et al.*, 2000, *Jpn. J. Cancer Res.* 91:1007-1014), de ovario (Gritsko *et al.*, 2003, *Clinical Cancer Research* 9:1420-1426), y gástricos (Sakakura *et al.*, 2001, *Brit. J. Cancer* 84:824-831), y en el 94% de los adenocarcinomas canaliculares infiltrantes de mama (Tanaka, 1999, *Cancer Research.* 59:2041-2044). Se han descrito asimismo altas concentraciones de Aurora-A en líneas celulares de tumor renal, cervical, neuroblastoma, melanoma, linfoma, pancreático y de próstata (Bischoff *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17:3052-3065; Kimura *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 7334-7340; Zhou *et al.*, 1998, *Nature Genetics* 20:189-193; Li *et al.*, 2003, *Clin. Cancer Res.* 9(3):991-7). Se observa ampliación/sobreexpresión de Aurora-A en los cánceres de vejiga humanos y la ampliación de Aurora-A está relacionada con la aneuploidia y con el comportamiento clínico agresivo (Sen *et al.*, 2002, *J. Natl. Cancer Inst.* 94(17):1320-9. Además, la ampliación del locus (20q13) de Aurora-A se correlaciona con el escaso pronóstico en pacientes de cáncer de mama negativo en los ganglios (Isola *et al.*, 1995, *American Journal of Pathology* 147:905-911). La Aurora-B se expresa en gran medida en múltiples líneas celulares tumorales humanas, incluyendo las líneas leucémicas (Katayama *et al.*, 1998, *Gene* 244:1-7). Las concentraciones de esta enzima aumentan en función de la etapa de Duke en los cánceres colorrectales primarios (Katayama *et al.*, 1999, *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1160-1162). La Aurora-C, que se encuentra normalmente sólo en células germinales, se sobreexpresa también en un gran porcentaje de cánceres colorrectales primarios y en una variedad de líneas celulares tumorales incluyendo las células de adenocarcinoma cervical y de carcinoma de mama (Kimura *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 7334-7340; Takahashi *et al.*, 2000, *Jpn. J. Cancer Res.* 91:1007-1014).

En cambio, la familia Aurora se expresa a baja concentración en la mayoría de los tejidos normales, siendo excepciones los tejidos con una gran proporción de células en división, tales como las del timo y de los testículos (Bischoff *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17:3052-3065).

Para un estudio adicional de la función o funciones que las Aurora cinasas desempeñan en los trastornos proliferantes, véase Bischoff y Plowman, 1999, *Trends Cell Biol.* 9:454-459; Giet y Prigent, 1999, *J. Cell Science* 112:3591-3601; Nigg, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:21-32; Adams *et al.*, 2001, *Trends Cell Biol.* 11:49-54 y Dutertre *et al.*, 2002, *Oncogene* 21:6175-6183.

Aunque la sobreexpresión de las proteínas por las células cancerosas no siempre es indicadora de que la inhibición de la actividad proteica proporcione un efecto antitumoral, se ha confirmado en ensayos funcionales que por lo menos los siguientes tipos de células tumorales son sensibles a la inhibición de la actividad de la Aurora cinasa: próstata (DU145), cervicales (Hela), pancreáticas (Mia-Paca2, BX-PC3), leucemia histológica (U937), adenocarcinoma pulmonar, epidermoide pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, mama, carcinoma renal, Molt3 (todas) y Molt4 (todas).

Basándose en la función demostrada de las Aurora cinasas en una variedad de cánceres, los ejemplos de “enfermedades y trastornos mediados por Aurora cinasas” comprenden, pero no se limitan a, melanoma, leucemia y cánceres de tumor sólido, tales como, por ejemplo, cánceres de colon, mama, estómago, ovario, cervicales, melanomas, renales, de próstata, linfomas, neuroblastomas, de páncreas y de vejiga.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para tratar un trastorno especificado, una enfermedad o uno o más de sus síntomas. En referencia a los trastornos tumorígenos proliferantes, una cantidad terapéuticamente eficaz comprende una cantidad suficiente para, entre otras cosas, dar lugar a que el tumor se reduzca o disminuya el ritmo de crecimiento del tumor.

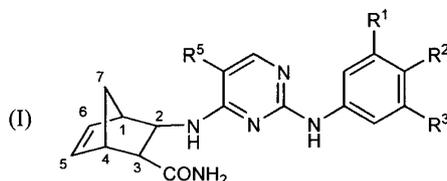
En muchas situaciones, los tratamientos normales para el trastorno proliferante tumorígeno comportan la intervención quirúrgica para eliminar el o los tumores, ya sea sola o en combinación con farmacoterapia (quimio) y/o terapia de radiación. Tal como se utiliza en la presente memoria, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto se pretende que incluya una cantidad de un compuesto que impida la recidiva de tumores en pacientes a los que se les ha extirpado el o los tumor(es) quirúrgicamente o disminuya la frecuencia de recidiva del o de los tumores en dichos pacientes.

Por consiguiente, tal como se utilizan en la presente memoria, las cantidades de los compuestos que proporcionan utilidad terapéutica complementaria con otro tipo de terapia, tal como intervención quirúrgica y/o tratamiento con otros agentes antiproliferantes, incluyendo, por ejemplo, 5-fluorouracilo, vinorelbina, taxol, vinblastina, cisplatino, topotecán, etc., están incluidas en el significado de “cantidad terapéuticamente eficaz”.

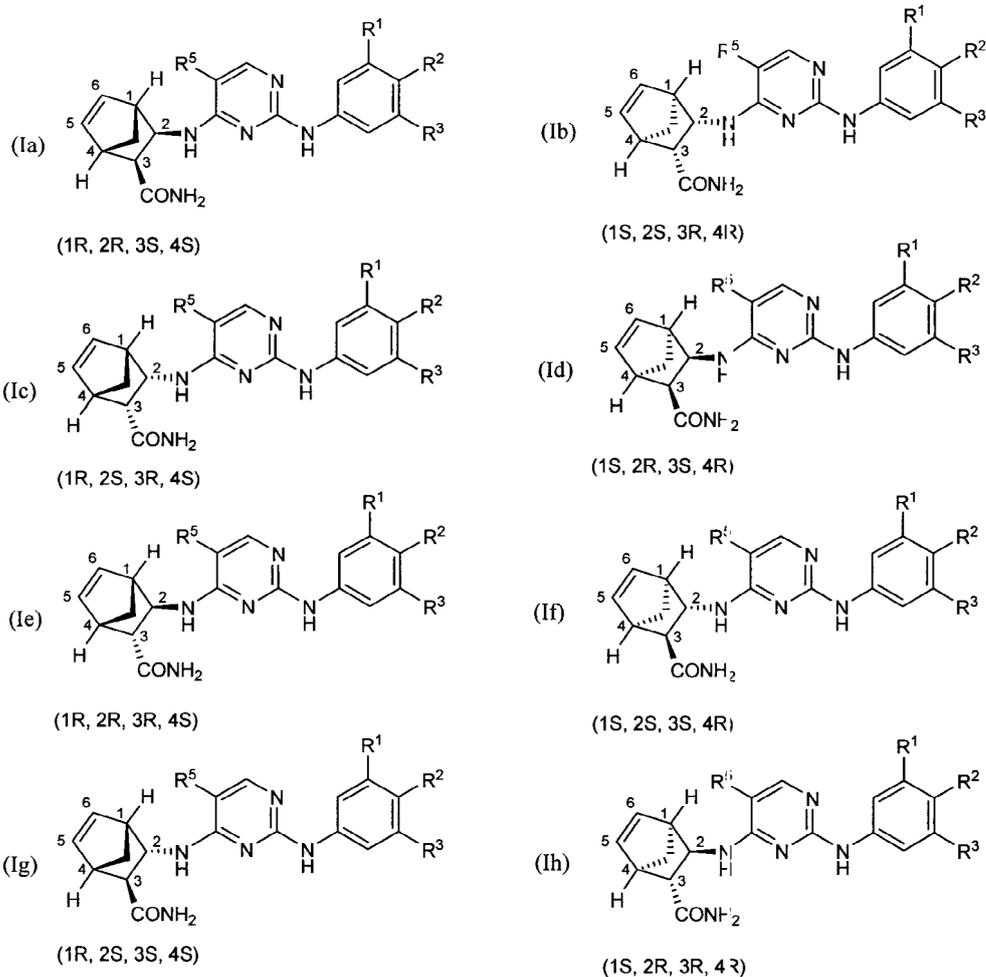
“Cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para impedir que un paciente desarrolle un trastorno o enfermedad especificado. Típicamente, los pacientes en los que se practica profilaxis no padecen el trastorno o enfermedad especificado, pero se reconoce que están en situación de riesgo elevado de desarrollar esta enfermedad o trastorno basándose en factores tales como, pero sin limitarse a, marcadores de diagnóstico y antecedentes familiares.

6.2 Compuestos enriquecidos en estereoisómeros y estereoisoméricamente puros

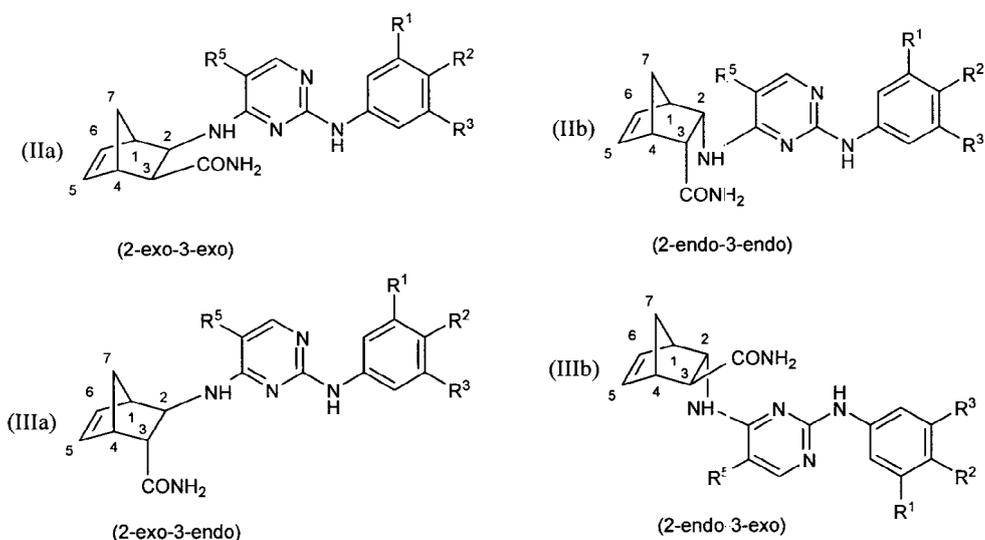
Se ha descubierto recientemente que determinados compuestos de fenil-2,4-pirimidindiamina N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-N2-sustituidos, re-presentados por la fórmula estructural (I) a continuación, son potentes inhibidores de la actividad de la Aurora cinasa y de la proliferación de células tumorales en ensayos *in vitro* (véanse, p. ej., US 2006/0035891-A, US 2006/0166308-A, WO 2005/118544 y las solicitudes de prioridad citadas en estos documentos):



Los expertos en la materia apreciarán que en la fórmula estructural (I), la estereoquímica en los carbonos 1, 2, 3 y 4 no esté especificada, de modo que los compuestos según la fórmula estructural (I) incluyan ocho diastereoisómeros, ilustrados por la fórmula estructural (Ia)-(Ih), a continuación:



Los compuestos de fórmula estructural (I) comprenden también dos racematos *cis*, representados por las dos fórmulas estructurales (IIa) y (IIb), y dos racematos *trans*, representados por las fórmulas estructurales (IIIa) y (IIIb) a continuación:

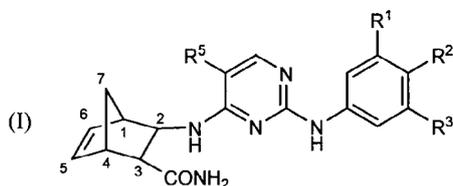


5

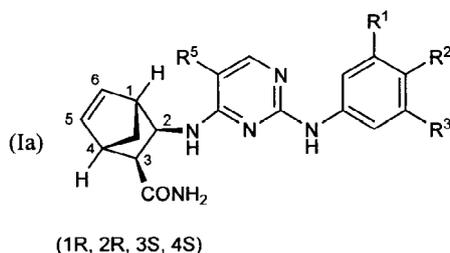
El racemato *cis* de fórmula estructural (IIa) puede denominarse racemato 2-exo-3-exo e incluye los diastereoisómeros (1R,2R,3S,4S) y (1S,2S,3R,4R) de fórmulas estructurales (Ia) y (Ib), respectivamente. El racemato *cis* de fórmula estructural (IIb) puede denominarse racemato 2-endo-3-endo e incluye los diastereoisómeros (1R,2S,3R,4S) y (1S,2R,3S,4R) de fórmulas

estructurales (Ic) y (Id), respectivamente. Como se describe con más detalle en el apartado Ejemplos, para los compuestos en los que R⁵ es flúor, R¹ es hidrógeno, R² es 4-metilpiperazin-1-ilo y R³ es metilo, estos dos racematos *cis* presentan actividad antiproliferante contra una variedad de diferentes líneas celulares tumorales en ensayos de antiproliferación *in vitro*. Sin embargo, este racemato 2-exo-3-exo (racemato **r1**) es aproximadamente veinte veces más potente que el correspondiente racemato 2-endo-3-endo (racemato **r2**) en todas las líneas celulares probadas con ambos racematos. Además, se ha descubierto que el diastereoisómero (1R,2R,3S,4S) del racemato **r1** es en gran parte responsable de la potencia del racemato **r1**. Cuando se probaban como estereoisómeros aislados, este diastereoisómero (1R,2R,3S,4S) (denominado diastereoisómero "a") presentaba generalmente unas IC₅₀ de orden nanomolar, mientras que el diastereoisómero (1S,2S,3R,4R) (denominado enantiómero "b") presentaba generalmente unas IC₅₀ de orden micromolar frente a las mismas líneas celulares. Por lo tanto, en general, el diastereoisómero (1R,2R,3S,4S) de este compuesto es generalmente 1.000 veces más potente que su correspondiente enantiómero (1S,2S,3R,4R). También es aproximadamente 20 a 50 veces más potente que el correspondiente racemato 2-endo-3-endo **r2** en las líneas celulares probadas. El diastereoisómero (1R,2R,3S,4S) presentó de igual forma resultados superiores en comparación con su enantiómero (1S,2S,3R,4R) en los ensayos de inhibición basados en células frente a Aurora cinasa B. Basándose en la potencia observada de este diastereoisómero (1R,2R,3S,4S), es de esperar que la gama completa de diastereoisómeros (1R,2R,3S,4S) según la fórmula estructural (Ia) presente potencias de igual forma superiores en comparación con sus correspondientes enantiómeros (1S,2S,3R,4R), racematos 2-exo-3-exo, racematos 2-endo-3-endo y otros diastereoisómeros correspondientes.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan compuestos que están enriquecidos en este diastereoisómero (1R,2R,3S,4S) particularmente potente. En una forma de realización, dichos compuestos enriquecidos en diastereoisómeros incluyen los compuestos según la fórmula estructural (I):



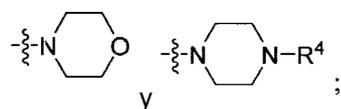
que están enriquecidos en el correspondiente diastereoisómero de fórmula estructural (Ia):



en la que:

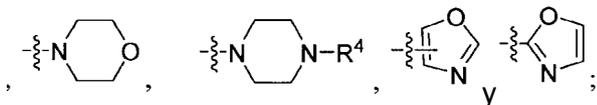
cada R¹ se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, -(CH₂)_n-OH, -OR^a, -O(CH₂)_n-R^a, -O(CH₂)_n-R^b, -C(O)OR^a, halo, -CF₃, y -OCF₃;

cada R² se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, -OR^a, -O(CH₂)_n-R^a, -O(CH₂)_n-R^b, NHC(O)R^a, halo, -CF₃, -OCF₃,



35

cada R³ se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, -(CH₂)_n-OH, -OR^a, -O(CH₂)_n-R^a, -O(CH₂)_n-R^b, halo, -CF₃, -OCF₃,



cada R⁴ se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, arilalquilo, -OR^a, -NR^cR^c, -C(O)R^a, -C(O)OR^a y -C(O)NR^cR^c;

R⁵ es hidrógeno, halo, fluoro, -CN, -NO₂, -C(O)OR^a o -CF₃;

cada n es independientemente un número entero de 1 a 3;

cada R^a se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior y cicloalquilo inferior;

cada R^b se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por -OR^a, -CF₃, -OCF₃, -NR^cR^c, -C(O)R^a, -C(O)OR^a -C(O)NR^cR^c y -C(O)NR^aR^d;

cada R^c se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo inferior, o, alternativamente, dos sustituyentes R^c pueden considerarse junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo saturado de 4 a 9 elementos que comprende opcionalmente 1 a 2 grupos heteroatómicos adicionales seleccionados de entre O, NR^a, NR^a-C(O)R^a, NR^a-C(O)OR^a y NR^a-C(O)NR^a; y

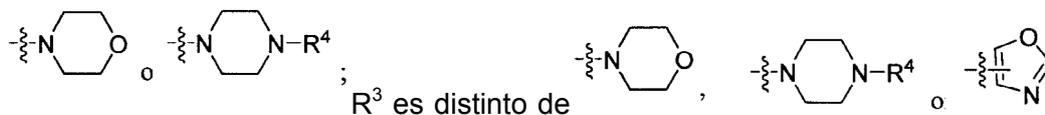
cada R^d es independientemente monohidroxialquilo inferior o dihidroxialquilo inferior.

En otra forma de realización, dichos compuestos enriquecidos en estereoisómeros comprenden racematos *cis* 2-*exo*-3-*exo* según la fórmula estructural (IIa), en la que R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (I), que están enriquecidos en el diastereoisómero de fórmula estructural (Ia), *supra*.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un compuesto está “enriquecido” en un diastereoisómero determinado cuando este diastereoisómero está presente en exceso sobre cualquier otro diastereoisómero presente en el compuesto. El porcentaje existente del diastereoisómero determinado que comprende el compuesto dependerá del número de los demás diastereoisómeros presentes. Como ejemplo específico, una mezcla racémica está “enriquecida” en un enantiómero especificado cuando este enantiómero constituye más del 50% de la muestra. Independientemente del número de diastereoisómeros presentes, un compuesto que está enriquecido en un diastereoisómero determinado comprenderá típicamente por lo menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, o aún más, de los diastereoisómeros especificados. La cantidad de enriquecimiento de un determinado diastereoisómero puede confirmarse utilizando métodos analíticos convencionales utilizados rutinariamente por los expertos en la materia, como se expondrá con más detalle a continuación.

En otra forma de realización, los compuestos enriquecidos en estereoisómeros comprenden compuestos según la fórmula estructural (Ia), *supra*, en la que R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (I), que están sustancialmente exentos del enantiómero correspondiente y/o de cualquier otro diastereoisómero correspondiente. Por “sustancialmente exento de” se entiende que el compuesto comprende menos de aproximadamente el 10% de los diastereoisómeros y/o enantiómeros no deseados establecido utilizando métodos analíticos convencionales utilizados rutinariamente por los expertos en la materia (expuestos con más detalle a continuación). En algunas formas de realización, la cantidad de estereoisómeros no deseados puede ser inferior al 10%, por ejemplo, el 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o aún menos. Los compuestos enriquecidos en estereoisómeros que contienen aproximadamente el 95% o más del estereoisómero deseado se denominan en la presente memoria estereoisómeros “sustancialmente puros”. Los compuestos enriquecidos en estereoisómeros que contienen aproximadamente el 99% o más del estereoisómero deseado se denominan en la presente memoria estereoisómeros “puros”. La pureza de cualquier compuesto enriquecido en estereoisómeros (% de pureza diastereoisomérica) puede confirmarse utilizando los métodos analíticos convencionales, como se describirá con más detalle a continuación.

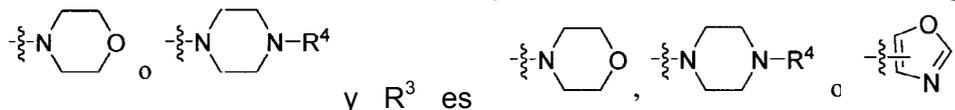
En algunas formas de realización de los diversos compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria, R¹ es hidrógeno; R² es



5

R³ es distinto de . En otras formas de realización de los diversos compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria, R³ es hidrógeno, metilo, metoxi, trifluorometilo o cloro. En otras formas de realización todavía, R⁴ es metilo, -C(O)CH₃, -C(O)OCH₃ o -C(O)OCH₂CH₃.

En otras formas de realización todavía de los diversos compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria, R¹ es hidrógeno, R² es distinto de

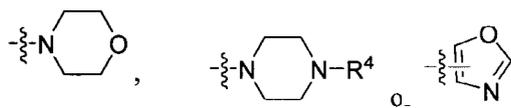


10

y R³ es . En otras formas de realización todavía, R² es hidrógeno, metilo, metoxi, trifluorometilo o cloro. Preferentemente, R⁴ es metilo, -C(O)CH₃, -C(O)OCH₃ o -C(O)CH₂CH₃.

En otras formas de realización todavía de los diversos compuestos enriquecidos en

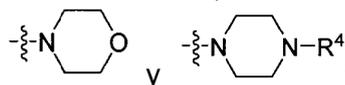
estereoisómeros descritos en la presente memoria, R² es distinto de y R³



15

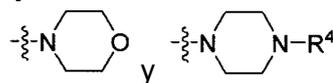
es distinto de . En otras formas de realización todavía, R¹ y R² son cada uno hidrógeno y R³ es -OCH₂NHR^a. En otras formas de realización, R¹, R² y R³ cada uno, independientemente uno del otro se seleccionan de entre el grupo constituido por hidrógeno, metilo, metoxi, trifluorometilo o cloro, con la condición de que por lo menos dos de entre R¹, R² y R³ sean distintos de hidrógeno.

En otras formas de realización todavía, R¹ es hidrógeno, R² se selecciona de entre el grupo



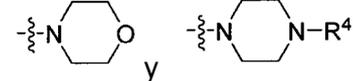
20

constituido por hidrógeno, y R³ se selecciona de entre el grupo



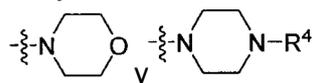
constituido por hidrógeno, alquilo inferior, halo, -CF₃, . En otras formas de realización todavía, R³ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, metilo, cloro,

-CF₃, y R⁴ es metilo, -COR^a o -CO(O)R^a, donde R^a es metilo o etilo. En otra forma de realización todavía, R² se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno,

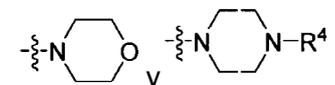


25

y R³ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo

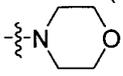


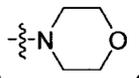
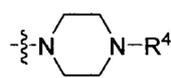
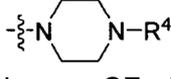
inferior, halo, -CF₃, . En otras formas de realización todavía, R³ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, metilo, cloro, -CF₃,



y R⁴ es metilo, -COR^a o -CO(O)R^a, donde R^a es metilo o etilo.

Preferentemente, R² es , R⁴ es -COR^a, donde R^a es metilo; y R³ es hidrógeno. En

otras formas de realización, R^2 es , R^4 es $-\text{CO}(\text{O})\text{R}^a$, donde R^a es etilo; y R^3 es hidrógeno. En otra forma de realización todavía, R^2 es  y R^3 es hidrógeno.

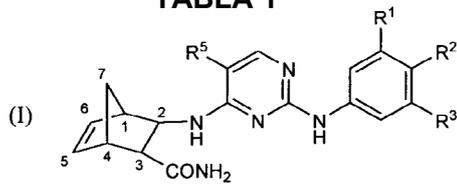
Todavía en otra forma de realización, R^2 es hidrógeno; R^3 es  o  y R^4 es metilo, $-\text{COR}^a$ o $-\text{CO}(\text{O})\text{R}^a$, donde R^a es metilo o etilo. Preferentemente, R^2 es , R^4 es metilo y R^3 se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, metilo, cloro y $-\text{CF}_3$. Más preferentemente, R^3 es metilo.

Todavía en otras formas de realización de los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria, R^5 es flúor.

Todavía en otras formas de realización, el compuesto enriquecido en estereoisómeros es sustancialmente puro en estereoisómeros o puro en estereoisómeros (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina.

Las formas de realización ejemplares adicionales de los compuestos según la fórmula estructural (I) que pueden estar enriquecidos en estereoisómeros en el diastereoisómero correspondiente de fórmula estructural (Ia), *supra*, sustancialmente exentos de cualquiera de sus enantiómeros y/o diastereoisómeros, y/o sustancialmente puros o puros en el diastereoisómero de la fórmula estructural (Ia), *supra*, se ilustran en la TABLA I, a continuación:

TABLA 1



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁵
60	H		Me	F
62	H		H	F
64	H	H		F
66	H		H	F
68	H	H		F
70	H		H	F
72	H		H	F
74	H	H		F
76	H	H		F
78	H		Cl	F
80	H		H	F

TABLA 1

(I)

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁵
82	H		Me	F
84	H		CF ₃	F
86	H		Cl	F
88	H		CF ₃	F
90	H	H		F

5 Cuando se proponen diastereoisómeros específicos y/o mezclas racémicas de los compuestos específicos descritos en la presente memoria, tales como los compuestos descritos en la TABLA 1, el número de compuesto va seguido de una letra que especifica el diastereoisómero específico o la mezcla racémica de la forma siguiente:

a = (1R,2R,3S,4S)

b = (1S,2S,3R,4R)

c = (1R,2S,3R,4S)

10 d = (1S,2R,3S,4R)

e = (1R,2R,3R,4S)

f = (1S,2S,3S,4R)

g = (1R,2S,3S,4S)

h = (1S,2R,3R,4R)

15 r1 = racemato *cis* 2-exo-3-exo

r2 = racemato *cis* 2-endo-3-endo

r3 = racemato *trans* 2-exo-3-endo

r4 = racemato *trans* 2-endo-3-exo

20 De este modo, como ejemplo específico, el diastereoisómero (1R,2R,3S,4S) del compuesto **60** se denomina 60a.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria pueden incluir grupos funcionales que pueden enmascararse con progrupos para crear profármacos. Dichos profármacos normalmente son, pero no necesariamente, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en su forma

farmacéutica activa. Por ejemplo, los grupos éster experimentan generalmente hidrólisis catalizada por ácido para producir el ácido carboxílico precursor cuando se exponen a las condiciones ácidas del estómago, o hidrólisis catalizada por base cuando se exponen a las condiciones básicas del intestino o de la sangre. Por este motivo, cuando se administran a un paciente por vía oral, los compuestos enriquecidos en estereoisómeros que incluyen restos ésteres pueden considerarse profármacos de su correspondiente ácido carboxílico, independientemente de si la forma éster es farmacológicamente activa.

En la presente invención se describen los profármacos de los diversos compuestos enriquecidos en estereoisómeros. En dichos profármacos, cualquier resto funcional disponible puede estar enmascarado con un progrupo para proporcionar un profármaco. Los grupos funcionales de los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria que pueden estar enmascarados con progrupos para la inclusión en un prorresto incluyen, pero no se limitan a, aminas (primarias y secundarias), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, etc. Una infinidad de progrupos adecuados para enmascarar dichos grupos funcionales para proporcionar prorrestos que pueden escindirse en las condiciones de utilización deseadas son conocidos en la técnica. Todos estos progrupos, solos o combinados, pueden estar incluidos en los profármacos enriquecidos con estereoisómeros.

En los profármacos enriquecidos con estereoisómeros se incluyen los compuestos según la fórmula estructural (I), *supra*, en la que R^a, R^b y R^c pueden ser, además de sus alternativas definidas anteriormente, progrupos, que están enriquecidos en el correspondiente diastereoisómero de fórmula estructural (Ia), *supra*.

Los expertos en la materia apreciarán que muchos de los compuestos y profármacos descritos en la presente memoria, así como las diversas especies de compuestos descritos de manera específica y/o ilustrados en la presente memoria, pueden presentar el fenómeno de la tautomería y de la isomería conformacional. Por ejemplo, los compuestos y los profármacos pueden existir en varias formas tautómeras, incluyendo la forma enol, la forma ceto y mezclas de estas. Ya que las diversas denominaciones de compuestos, fórmulas y dibujos de los compuestos en la memoria y las reivindicaciones pueden representar únicamente una de las posibles formas tautómeras o conformacionales, debería entenderse que la invención abarca algunos tautómeros o isómeros conformacionales, de los compuestos que presentan una o más de las utilidades descritas en la presente memoria, así como mezclas de estas diversas formas isoméricas diferentes. En los casos de rotación limitada alrededor de la estructura del núcleo de 2,4-pirimidindiamina, también son posibles atropisómeros y están también específicamente incluidos en los compuestos de la invención.

Dependiendo de la naturaleza de los diversos sustituyentes, los compuestos y profármacos enriquecidos en estereoisómeros pueden estar en forma de sales. Dichas sales comprenden las sales adecuadas para utilizaciones farmacéuticas ("sales farmacéuticamente aceptables"), sales adecuadas para utilizaciones veterinarias, etc. Dichas sales pueden proceder de ácidos o bases, como es bien conocido en la técnica.

En algunas formas de realización, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. Generalmente, las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas que conservan una o más de las actividades farmacológicas deseadas del compuesto precursor y que son adecuadas para su administración a seres humanos. Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las sales de adición de ácido formadas por ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables comprenden, a título de ejemplo no limitativo, ácidos de hidroháluro (p. ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, yodhídrico, etc.), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ácidos orgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables comprenden, a título de ejemplo no limitativo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidos alquilsulfónicos (p. ej., ácido metansulfónico, ácido

5 etansulfónico, ácido 1,2-etandisulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, etc.), ácidos arilsulfónicos (p. ej., ácido bencensulfónico, ácido 4-clorobencensulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido alcanforsulfónico, etc.), ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden también las sales formadas cuando un protón de un ácido presente en el compuesto precursor se sustituye por un ion metálico (p. ej., un ion de un metal alcalino, un ion de un metal alcalinotérreo o un ion de aluminio) o se coordina con una base orgánica (p. ej., etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfolina, piperidina, dimetilamina, dietilamina, etc.).

15 Los compuestos y profármacos enriquecidos en estereoisómeros, así como las sales de estos, pueden estar también en forma de hidratos, solvatos y/o N-óxidos, como es bien conocido en la técnica.

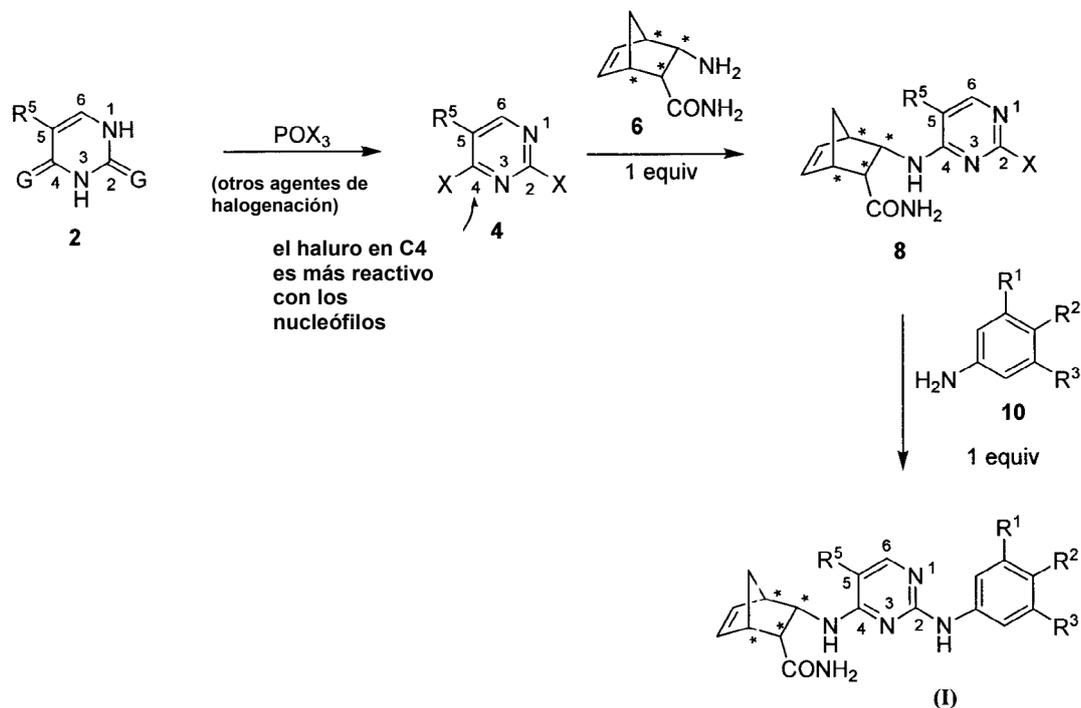
20 El enriquecimiento estereoisomérico y/o la pureza de los compuestos y profármacos descritos en la presente memoria pueden demostrarse por métodos analíticos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la utilización de reactivos de desplazamiento de RMN quiral, análisis cromatográfico de gases que utiliza columnas quirales, el análisis cromatográfico de líquidos a alta presión que utiliza columnas quirales, la formación de derivados diastereoméricos mediante reacción con reactivos quirales y el análisis convencional pueden utilizarse para demostrar el enriquecimiento estereoisomérico y/o la pureza de un estereoisómero específico. Como alternativa, puede utilizarse la síntesis que utiliza materiales de partida de enriquecimiento estereoisomérico y/o pureza conocidos para demostrar el enriquecimiento estereoisomérico y/o la pureza de los compuestos descritos en la presente memoria. Otros métodos analíticos para demostrar la homogeneidad estereoisomérica están dentro del ámbito de los expertos en la materia.

6.3 Métodos de síntesis

30 Los compuestos y profármacos enriquecidos en estereoisómeros pueden sintetizarse por una variedad de vías de síntesis diferentes utilizando materiales de partida disponibles en el mercado y/o materiales de partida preparados mediante métodos de síntesis convencionales. Una variedad de vías de síntesis a título de ejemplo que pueden utilizarse para sintetizar los compuestos y profármacos enriquecidos en estereoisómeros se describen en los documentos WO 03/063794 y US 2004/0029902.

35 A título de ilustración, un ejemplo de esquema sintético que puede utilizarse para sintetizar la gama completa de compuestos descritos en la presente memoria se ilustra en el Esquema (I) a continuación:

Esquema (I)



En el Esquema (I), R^1 , R^2 , R^3 y R^5 son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (I), *supra*, X es un halógeno (p. ej., F, Cl, Br o I), y cada G, independientemente del otro, se selecciona de entre O y S. Debe observarse que un "*" en la aminocarboxamida 6 indica que el estereocentro concreto no está especificado. Por consiguiente, los expertos en la materia apreciarán que el Esquema (I) puede utilizarse para preparar mezclas diastereoisómeras racémicas, mezclas de compuestos enriquecidos en diastereoisómeros según la fórmula estructural (I), así como los estereoisómeros de los compuestos de fórmula estructural (I) que están exentos sustancialmente de otros diastereoisómeros especificados.

Haciendo referencia al Esquema (I), el uracilo o tiouracilo 2 está dihalogenado en las posiciones 2 y 4 utilizando el agente halogenante habitual POX_3 (u otros agentes halogenantes) en condiciones normales para proporcionar 2,4-bis-halopirimidina 4. El haluro en la posición C4 es más reactivo con los nucleófilos que el haluro en la posición C2 en pirimidina 4. Esta reactividad diferencial puede explotarse para sintetizar los compuestos y profármacos descritos en la presente memoria haciendo reaccionar en primer lugar 2,4-bis-halopirimidina 4 con un equivalente de 2-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-carboxamida 6, para obtener 8, seguido de reacción con anilina 10 para obtener compuestos según la fórmula estructural (I). Los expertos en la materia apreciarán que la configuración estereoisomérica y la pureza óptica de la aminocarboxamida 6 determinen, en muchas circunstancias, la configuración estereoisomérica y la pureza óptica de los compuestos de la fórmula estructural (I).

En la mayoría de las situaciones, el haluro C4 es más reactivo con los nucleófilos, como se ilustra en el Esquema. Sin embargo, como reconocen los expertos en la materia, la identidad del sustituyente R^5 puede alterar esta reactividad. Por ejemplo, cuando R^5 es trifluorometilo, se obtiene una mezcla 50:50 de 4N-pirimidinamina-4-sustituida 8 y la correspondiente 2N-pirimidinamina-2-sustituida. Independientemente de la identidad del sustituyente R^5 , la regioselectividad de la reacción puede controlarse ajustando el disolvente y otras condiciones de la síntesis (tal como la temperatura), como es bien conocido en la técnica.

Las reacciones descritas en el Esquema (I) pueden proceder más rápidamente cuando las mezclas de reacción se calientan mediante microondas. Cuando se calientan de este modo, pueden utilizarse las siguientes condiciones: se calienta a 175 °C en etanol durante 5 a 20 min en

un reactor Smith (Personal Chemistry, Biotage AB, Suecia) en un tubo sellado (a 20 bar de presión).

Los materiales de partida uracilo o tiouracilo **2** pueden adquirirse de los proveedores comerciales o prepararse utilizando las técnicas habituales de la química orgánica. Los uracilos y tiouracilos disponibles en el mercado que pueden utilizarse como materiales de partida en el Esquema (I) comprenden, a título de ejemplo no limitativo, uracilo (Aldrich nº 13.078-8; Registro CAS 66-22-8); 2-tiouracilo (Aldrich nº 11.558-4; Registro CAS 141-90-2); 2,4-ditiouracilo (Aldrich nº 15.846-1; Registro CAS 2001-93-6); 5-bromouracilo (Aldrich nº 85.247-3; Registro CAS 51-20-7); 5-fluorouracilo (Aldrich nº 85.847-1; Registro CAS 51-21-8); 5-yodouracilo (Aldrich nº 85.785-8; Registro CAS 696-07-1); 5-nitrouracilo (Aldrich nº 85.276-7; Registro CAS 611-08-5); 5-(trifluorometil)-uracilo (Aldrich nº 22.327-1; Registro CAS 54-20-6). Los uracilos y/o tiouracilos 5-sustituidos adicionales están disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, CA (<http://www.generalintermediates.com>) y/o en Interchim, Cedex, Francia (<http://www.interchim.com>) o pueden prepararse utilizando las técnicas habituales. A continuación se proporcionan numerosas referencias en libros de texto que dan a conocer métodos de síntesis adecuados.

Las anilinas **10** pueden adquirirse de proveedores comerciales o, como alternativa, pueden sintetizarse utilizando las técnicas habituales. Por ejemplo, pueden sintetizarse anilinas adecuadas a partir de precursores nitro utilizando la química habitual. En el apartado Ejemplos se proporcionan ejemplos de reacciones específicas. Véase también Vogel, 1989, *Practical Organic Chemistry*, Addison Wesley Longman, Ltd. y John Wiley & Sons, Inc.

Los expertos en la materia reconocerán que en algunos casos las anilinas **10** pueden incluir grupos funcionales que requieren protección durante la síntesis. La identidad exacta de cualquier o cualesquiera grupos protectores utilizados dependerá de la identidad del grupo funcional que esté protegido y será evidente para los expertos en la materia. Las directrices para la selección de los grupos protectores adecuados, así como estrategias de síntesis para su acoplamiento y eliminación pueden encontrarse, por ejemplo, en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999) y en las referencias citadas en este documento (en lo sucesivo "Greene y Wuts").

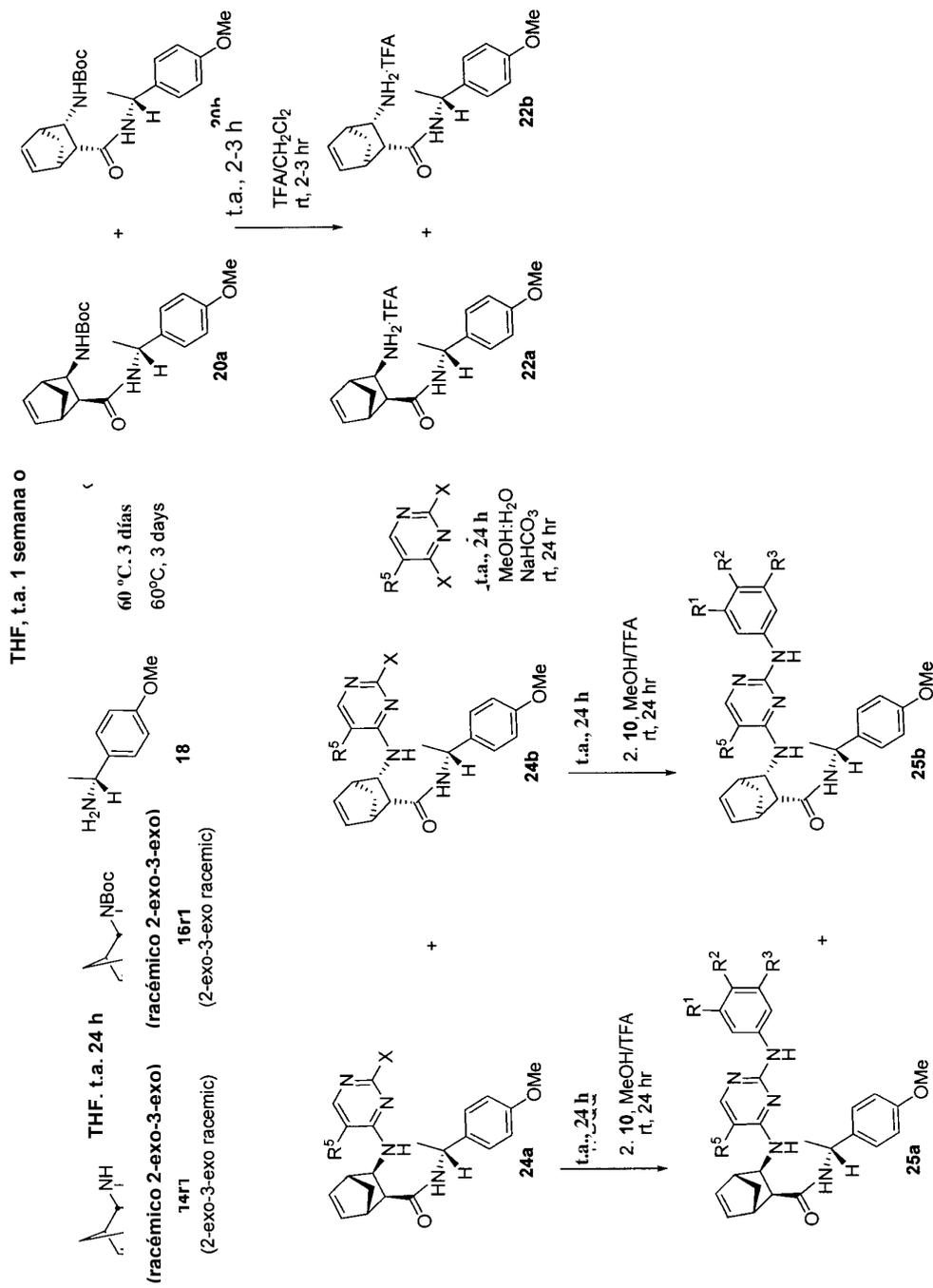
Profármacos como los descritos en la presente memoria pueden prepararse mediante la modificación rutinaria de los métodos descritos anteriormente.

Tal como apreciarán los expertos en la materia, el diastereoisómero deseado (1R,2R,3S,4S) correspondiente a la fórmula estructural (Ia), *supra*, puede aislarse por separación quiral u otras técnicas habituales. Los métodos para resolver quiralmente diastereoisómeros específicos se describen con más detalle en el apartado Ejemplos.

Los compuestos enriquecidos en estereoisómeros y/o sustancialmente puros y/o los diastereoisómeros puros pueden sintetizarse también a partir de los materiales de partida 2-amino-3-carboxamida **6** con la estereoquímica especificada o con la ayuda de auxiliares quirales.

En una forma de realización ejemplar, ilustrada en el Esquema (II) a continuación, el diastereoisómero deseado se resuelve químicamente utilizando (R)-metil-*p*-metoxibencilamina **18** como auxiliar quiral.

Esquema (II)



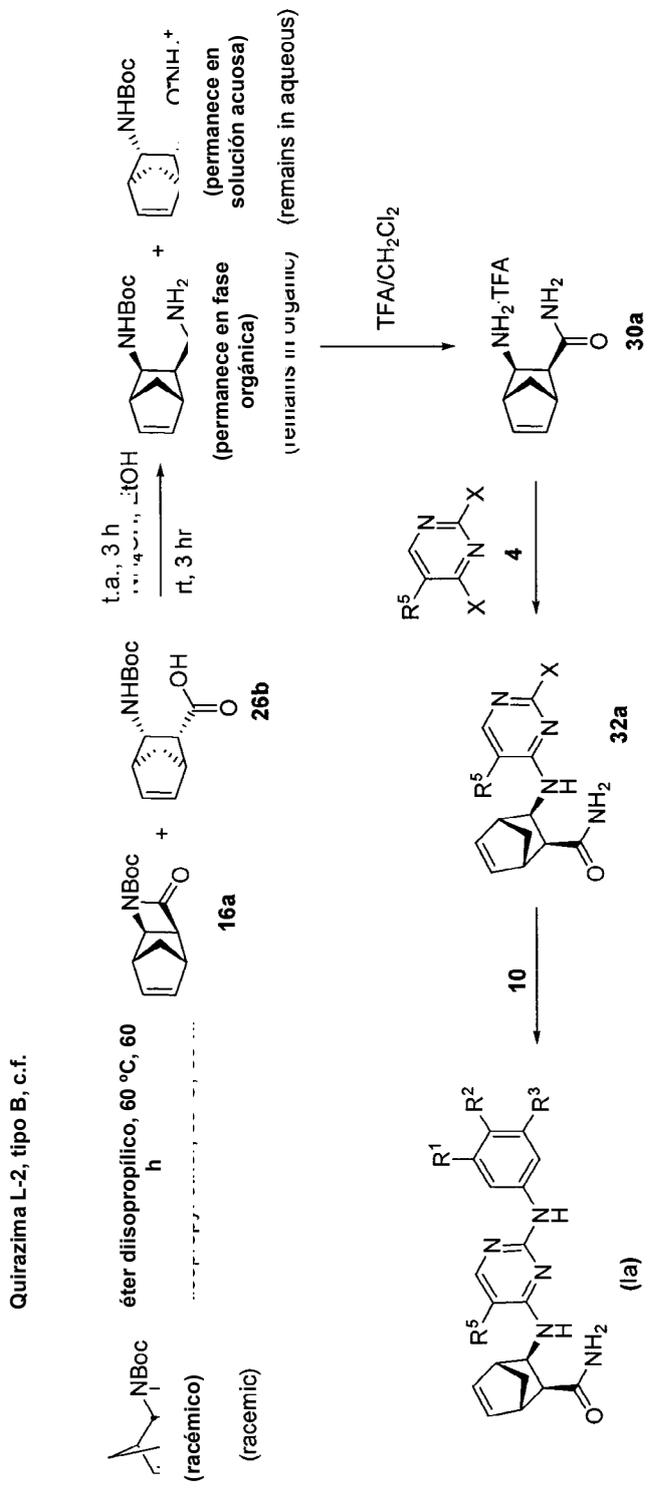
En el esquema (II), la β -lactama 2-exo-3-exo racémica **14r1** (preparada como se describe en Stajar *et al.*, 1984, *Tetrahedron* 40(12):2385) está protegida con un grupo Boc, para proporcionar la correspondiente β -lactama **16r1** racémica protegida con Boc. El racemato **16r1** protegido con Boc se hace reaccionar a continuación con (*R*)-metil-*para*-metoxibencilamina **18**, que proporciona una mezcla de diastereoisómeros **20a** y **20b**. Esta mezcla diastereomérica se trata con un ácido tal como el TFA para escindir el grupo Boc, que proporciona una mezcla de diastereoisómeros **22a** y **22b**, que pueden hacerse reaccionar con 2,4-dihalopirimidina **4** para proporcionar una mezcla racémica de compuestos **24a** y **24b**. En esta etapa, los compuestos **24a** y **24b** pueden separarse por cristalización y hacerlos reaccionar con anilina **10** para proporcionar los diastereoisómeros aislados **25a** y **25b**. Los auxiliares quirales procedentes de los diastereoisómeros aislados **25a** y **25b** pueden escindirse a continuación para dar diastereoisómeros aislados según las fórmulas estructurales (Ia) y (Ib), respectivamente.

En los compuestos **25a** y **25b** en los que R¹ es hidrógeno, R² es 4-metil-piperazin-1-ilo, R³ es metilo y R⁵ es flúor, la escisión del auxiliar quiral resulta difícil. Para estos y otros compuestos en los que dicha escisión resulta difícil, el auxiliar quiral puede escindirse de los compuestos **24a** y **24b** y los compuestos aislados resultantes pueden reaccionar con anilina **10** para proporcionar diastereoisómeros aislados según las fórmulas estructurales (Ia) y (Ib). Los ejemplos específicos de dichas reacciones se describen en el apartado Ejemplos.

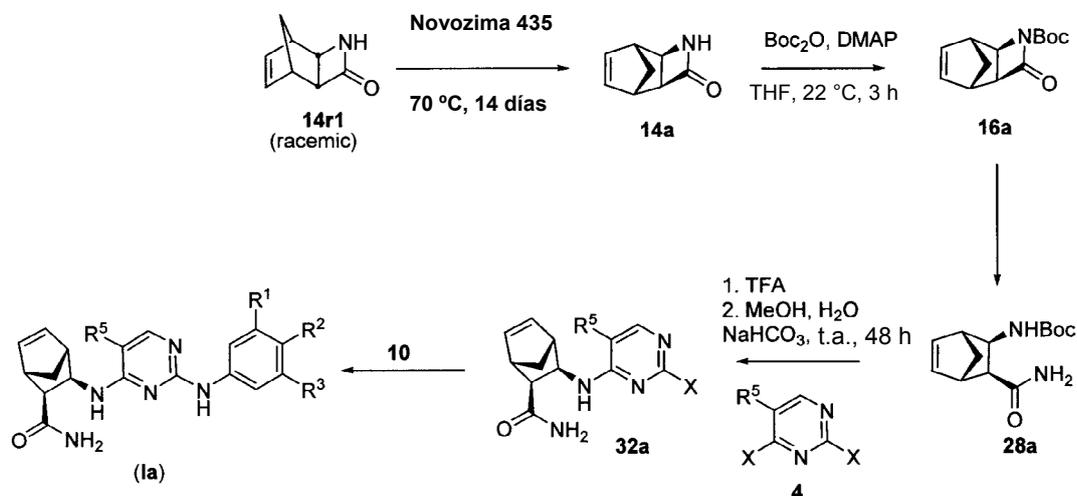
Los compuestos que están enriquecidos en estereoisómeros, sustancialmente estereoisoméricamente puros y/o estereoisoméricamente puros en diastereoisómeros especificados pueden sintetizarse también a partir de β -lactamas enriquecidas en estereoisómeros, sustancialmente estereoisoméricamente puras y/o estereoisoméricamente puras. Dichas β -lactamas enriquecidas en estereoisómeros y/o (sustancialmente) estereoisoméricamente puras pueden resolverse enzimáticamente y aislarse. En una forma de realización ejemplar, las β -lactamas (sustancialmente) estereoisoméricamente puras pueden resolverse y aislarse a partir de una mezcla racémica de β -lactama 2-exo-3-exo **14r1** utilizando una lipolasa inmovilizada (disponible de Sigma Chemical Co., nº de catálogo L4777) descrita en Eniko *et al.*, 2004, *Tetrahedron Asymmetry* 15:573-575. En otra forma de realización ejemplar, las β -lactamas (sustancialmente) estereoisoméricamente puras pueden resolverse y aislarse a partir de β -lactama racémica 2-exo-3-exo protegida con Boc **16r1** utilizando quirazima L-2-tipo B inmovilizada, unida con resina, c.f. enzima (*Candida antarctica* Tipo B, c-f, disponible de Biocatalytics, Inc., Pasadena, CA) tal como se describe en los documentos US 2006/0035891-A, WO 2005/118544 y US 2006/0166308-A. Un ejemplo específico de la utilización de esta enzima para resolver los diastereoisómeros especificados de β -lactamas se describe en el apartado Ejemplos, así como también un método de síntesis de β -lactama 2-exo-3-exo racémica **16r1**.

En los Esquemas (III) y (IV), a continuación, se ilustran ejemplos de síntesis de diastereoisómeros especificados según la fórmula estructural (Ia) que utilizan reacciones enzimáticas. En el apartado Ejemplos se describe un ejemplo específico de la utilización de la enzima Novozima 435 tal como se ilustra en el Esquema (IV), la cual, como la enzima Quirazima descrita anteriormente e ilustrada en el Esquema (III), puede utilizarse para resolver enantiómeros a partir de β -lactamas racémicas.

Esquema (III)



Esquema (IV)



6.4 Actividad de los compuestos antiproliferantes

Los compuestos activos enriquecidos en estereois\u00f9meros inhiben de manera t\u00edpica la proliferaci\u00f3n de las c\u00e9lulas deseadas, tales como las c\u00e9lulas tumorales con una CI_{50} comprendida en el intervalo de aproximadamente 20 μM o menos medida en un ensayo de proliferaci\u00f3n celular normalizado *in vitro*. Desde luego, los expertos en la materia apreciar\u00e1n que los compuestos que presentan unas CI_{50} inferiores, por ejemplo del orden de 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, o a\u00fan inferiores, pueden ser particularmente \u00fatiles en aplicaciones terap\u00e9uticas. La actividad antiproliferante puede ser citost\u00e1tica o citot\u00f3xica. En los casos en los que se desea actividad antiproliferante espec\u00edfica para un tipo celular determinado, puede analizarse la actividad del compuesto con el tipo celular deseado e identificar por contraste una carencia de actividad frente a otros tipos celulares. El grado deseado de "inactividad" en dichas identificaciones por contraste o la relaci\u00f3n de actividad frente a inactividad deseada puede variar en diferentes situaciones, y puede ser seleccionada por el usuario.

Los compuestos activos tambi\u00e9n inhiben de manera t\u00edpica una actividad de una Aurora cinasa, con una CI_{50} comprendida en el intervalo de aproximadamente 20 μM o menos, t\u00edpicamente en el intervalo de aproximadamente 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 mM, 1 mM, o a\u00fan inferiores. La CI_{50} frente a una Aurora cinasa puede determinarse en un ensayo normalizado *in vitro* con una Aurora cinasa aislada o en una matriz celular funcional. Un ensayo de una enzima acoplada adecuado que puede utilizarse para determinar el grado de actividad de Aurora cinasa se describe en Fox *et al.*, 1998, *Protein Sci.*, 7:2249-2255. La secuencia LRRASLG del p\u00e9ptido kemptida (Bochern Ltd., UK) puede utilizarse como sustrato para Aurora cinasa-A, Aurora cinasa-B y/o Aurora cinasa-C, y las reacciones pueden realizarse a 30 $^\circ\text{C}$ en una soluci\u00f3n que contiene HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl_2 10 mM, NaCl 25 mM y DTT 1 mM. Los valores de CI_{50} pueden determinarse utilizando regresi\u00f3n no lineal informatizada con un programa inform\u00e1tico disponible en el mercado (p. ej., Prism 3.0, GraphPed Software, San Diego, CA). Un ensayo funcional adecuado basado en c\u00e9lulas se describe en el apartado Ejemplos.

6.5 Utilizaciones de los compuestos antiproliferantes

Los compuestos activos enriquecidos en estereois\u00f9meros, incluyendo las diversas formas de sales, hidratos y/o N-\u00f3xidos de estos, pueden utilizarse para inhibir Aurora cinasas, procesos mediados por Aurora cinasas y/o la proliferaci\u00f3n celular en varios contextos. Seg\u00fan algunas formas de realizaci\u00f3n, una c\u00e9lula o poblaci\u00f3n de c\u00e9lulas se pone en contacto con una cantidad de dicho compuesto eficaz para inhibir una actividad de una Aurora cinasa, un proceso mediado por Aurora cinasa y/o la proliferaci\u00f3n de una c\u00e9lula o poblaci\u00f3n de c\u00e9lulas. Cuando se utiliza para inhibir la proliferaci\u00f3n celular, el compuesto puede actuar citot\u00f3xicamente para matar la c\u00e9lula o citost\u00e1ticamente para inhibir la proliferaci\u00f3n sin matar la c\u00e9lula.

Los métodos pueden ponerse en práctica *in vivo* como metodología terapéutica destinada al tratamiento o prevención de las enfermedades o trastornos mediados por Aurora cinasa y en particular de los trastornos proliferantes. Por lo tanto, en una forma de realización específica, los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria (así como las diversas formas descritas en la presente memoria) pueden utilizarse en un método para tratar o prevenir trastornos proliferantes en pacientes animales, incluyendo los seres humanos. El método comprende generalmente la administración a un individuo de una cantidad eficaz de un compuesto enriquecido en estereoisómeros, o de una sal, hidrato o N-óxido de este, para tratar o prevenir el trastorno. En una forma de realización, el individuo es un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, bovino, equino, felino, canino, roedor o primate. En otra forma de realización, el individuo es un ser humano.

Con los compuestos descritos en la presente memoria pueden tratarse o prevenirse una variedad de trastornos celulares proliferantes. En algunas formas de realización, los compuestos se utilizan para tratar varios cánceres en pacientes afectados. Los cánceres se clasifican tradicionalmente basándose en el tipo de tejido y de célula en los que se originan las células cancerosas. Se consideran carcinomas los cánceres que se originan en células epiteliales, mientras que se consideran sarcomas los cánceres que se originan en tejidos conectivos o en los músculos. Otros tipos de cáncer comprenden las leucemias, que se originan en las células hematopoyéticas y los cánceres de las células del sistema nervioso, que se originan en el tejido nervioso. Los adenomas, tumores no invasores, se consideran tumores epiteliales benignos con organización glandular, mientras que los condomas son tumores benignos que se originan en los cartílagos. En la presente invención, los compuestos descritos pueden utilizarse para tratar trastornos proliferantes comprendidos por carcinomas, sarcomas, leucemias, tumores de células nerviosas y tumores no invasores.

En una forma de realización específica, los compuestos se utilizan para tratar tumores sólidos que se originan en varios tipos de tejido, incluyendo, a título no limitativo, cánceres óseos, de mama, del sistema respiratorio, del cerebro, de los órganos reproductores, del aparato digestivo, del aparato urinario, de vejiga, de ojos, de hígado, de piel, de cabeza, de cuello, de tiroides, de paratiroides, de riñón, de páncreas, de sangre, de ovario, de colon, de células reproductoras/próstata y las formas metastásicas de estos.

Los trastornos proliferantes específicos comprenden los siguientes: a) los trastornos proliferantes de mama comprenden, pero no se limitan a, carcinoma canalicular invasor, carcinoma lobular invasor, carcinoma canalicular, carcinoma lobular *in situ* y cáncer metastásico de mama; b) los trastornos proliferantes de piel comprenden, pero no se limitan a, carcinoma basocelular, carcinoma espino-celular, melanoma maligno y sarcoma de Karposi; c) los trastornos proliferantes del sistema respiratorio comprenden, pero no se limitan a, carcinoma pulmonar microcítico y amicrocítico, edema bronquial, blastoma pleuropulmonar y mesotelioma maligno; d) los trastornos proliferantes del cerebro comprenden, pero no se limitan a, glioma de las células madre cerebrales e hipotalámico, astrocitoma cerebelar y cerebral, bulboblastoma, tumores endimarios, tumores de oligodendroglia, meningiomas y tumores neuroectodérmicos y pineales; e) los trastornos proliferantes de los órganos reproductores masculinos comprenden, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de testículos y cáncer de pene; f) los trastornos proliferantes de los órganos reproductores femeninos comprenden, pero no se limitan a, cáncer de útero (de endometrio), cervical, de ovario, vaginal, cánceres de vulva, sarcoma uterino, tumor de las células reproductoras del ovario; g) los trastornos proliferantes del aparato digestivo comprenden, pero no se limitan a, cánceres de ano, de colon, colorrectal, de esófago, de vesícula biliar, de estómago (gástrico), cáncer pancreático, cáncer pancreático de las células de los islotes, rectal, de intestino delgado y de glándulas salivales; h) los trastornos proliferantes de hígado comprenden, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, colangiocarcinoma hepatocelular mixto y cáncer de hígado primario; i) los trastornos proliferantes oculares comprenden, pero no se limitan a, melanoma intraocular, retinoblastoma y rbdomiosarcoma; j) los trastornos proliferantes y cánceres de cabeza comprenden, pero no se limitan a, cánceres de laringe, de hipofaringe, de nasofaringe, de bucofaringe y cáncer de labios y bucal, cáncer epidermoide de cuello, cáncer

metastásico de seno paranasal; k) los trastornos proliferantes de linfomas comprenden, pero no se limitan a, varios linfomas de linfocitos T y linfocitos B, linfoma no hodgkiniano, linfoma de linfocitos T cutáneos, enfermedad de Hodgkins y linfoma del sistema nervioso central; l) las leucemias comprenden, pero no se limitan a, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y tricoleucemia; m) los trastornos proliferantes del tiroides comprenden el cáncer de tiroides, timoma y timoma maligno; n) los sarcomas comprenden, pero no se limitan a, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rhabdomyosarcoma.

Debe entenderse que las descripciones de los trastornos proliferantes no se limitan a las afecciones descritas anteriormente, sino que abarcan otros trastornos caracterizados por el crecimiento incontrolado y el cáncer. Debe entenderse además que los trastornos proliferantes comprenden varias formas metastásicas de los tipos de tumor y de cáncer descritos en la presente memoria. Puede probarse la eficacia de los compuestos de la presente invención frente a los trastornos descritos en la presente memoria, y puede establecerse un régimen terapéuticamente eficaz. La eficacia, tal como se describe con más detalle a continuación, comprende la reducción o remisión del tumor, la disminución del ritmo de proliferación celular o un efecto citostático o citotóxico en el crecimiento celular.

6.6 Terapias de combinación

Los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria pueden utilizarse solos, combinados, adjuntos a, o junto con otras terapias antiproliferantes demostradas. Por lo tanto, los compuestos pueden utilizarse en las terapias tradicionales contra el cáncer, tales como la radiación de ionización en forma de rayos γ y rayos X, administrarse externa o internamente por implantación de compuestos radioactivos, así como usarse en el seguimiento de la eliminación quirúrgica de tumores.

Los compuestos pueden utilizarse con otros agentes quimioterapéuticos útiles contra el trastorno o afección en tratamiento. Estos compuestos pueden administrarse simultánea o sucesivamente, por la misma o diferentes vías de administración.

En algunas formas de realización, los presentes compuestos se utilizan con otros agentes anticancerosos o citotóxicos. Varias clases de compuestos anticancerosos y antineoplásicos comprenden, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, alquiloides de las vincas, taxanos, antibióticos, enzimas, citocinas, complejos de coordinación del platino, ureas sustituidas, inhibidores de tirosina cinasa, hormonas y antagonistas hormonales. Algunos ejemplos de agentes alquilantes comprenden, a título de ejemplo no limitativo, meclorotamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, etileniminas, metilmelaminas, sulfonatos de alquilo (p. ej., busulfán) y carmustina. Algunos ejemplos de antimetabolitos comprenden, a título de ejemplo no limitativo, metotrexato análogo del ácido fólico; fluorouracilo análogo de pirimidina, arabinósido de citosina; mercaptopurina, tioguanina y azatioprina análogas de purina. Algunos ejemplos de alquiloides de las vincas comprenden, a título de ejemplo no limitativo, vinblastina, vincristina, paclitaxel y colchicina. Algunos ejemplos de antibióticos comprenden, a título de ejemplo no limitativo, actinomicina D, daunorrubicina y bleomicina. Un ejemplo de enzima eficaz como agente antineoplásico comprende la L-asparaginasa. Algunos ejemplos de compuestos de coordinación comprenden, a título de ejemplo no limitativo, cisplatino y carboplatino. Algunos ejemplos de hormonas y de compuestos asociados a hormonas comprenden, a título de ejemplo no limitativo, los adrenocorticosteroides prednisona y dexametasona; amino glutetimida, formestano y anastrozol inhibidores de aromatasas; los compuestos de progestina caproato de hidroxiprogesterona y medroxiprogesterona; y el compuesto antiestrógeno tamoxifeno.

Estos y otros compuestos anticancerosos útiles están descritos en el *Merck Index*, 13ª ed. (O'Neil M.J. *et al.*, ed.) Merck Publishing Group (2001) y en *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Gilman, 10ª edición, Hardman J.G. y Limbird, L.E. eds., págs. 1381-1287, McGraw Hill (1996).

Los compuestos antiproliferantes adicionales útiles en combinación con los compuestos enriquecidos en estereoisómeros descritos en la presente memoria comprenden, a título de

ejemplo no limitativo, anticuerpos dirigidos contra receptores del factor de crecimiento (p. ej., anti-Her2); anticuerpos para activar linfocitos T (p. ej., anticuerpos anti-CTLA-4); y citocinas tales como el interferón- α y el interferón- γ , interleucina-2 y GM-CSF.

6.7 Formulaciones y administración

5 Cuando se utilizan para tratar o prevenir dichas enfermedades, los compuestos activos pueden administrarse solos, como mezclas de uno o más compuestos activos o mezclados o combinados con otros agentes útiles para tratar dichas enfermedades y/o los síntomas asociados con dichas enfermedades. Los compuestos activos también pueden administrarse mezclados o combinados con agentes útiles para tratar otros trastornos o enfermedades, tales como esteroides
10 y estabilizantes de membranas. Los compuestos activos pueden administrarse solos o como composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos pueden prepararse mediante los procesos de mezclado, disolución, granulado, molienda para la preparación de grageas, emulsificación, encapsulación, oclusión o liofilización. Las composiciones
15 pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesado de los compuestos activos en forma de preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente (véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª ed., Hoover, J.E. ed., Mack Publishing Co. (2003)).

El compuesto activo puede formularse en las composiciones farmacéuticas solo, o en forma de hidrato, solvato, N-óxido o sal farmacéuticamente aceptable como se describió
20 anteriormente. Dichas sales, típicamente, son más solubles en soluciones acuosas que los correspondientes ácidos y bases libres, pero también pueden formarse sales que tengan una solubilidad inferior a los correspondientes ácidos y bases libres.

Las composiciones farmacéuticas pueden tomar una forma adecuada prácticamente para cualquier modo de administración, incluyendo, por ejemplo, la administración tópica, ocular, oral,
25 bucal, sistémica, nasal, por inyecciones, transdérmica, rectal, vaginal, etc., o una forma adecuada para su administración por inhalación o insuflación.

Para la administración tópica, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) formularse como soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. tal como son conocidos en la técnica.

30 Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para la administración por inyección, p. ej., inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para la administración transdérmica, oral transmucósica o pulmonar.

Las preparaciones inyectables útiles incluyen suspensiones, soluciones o emulsiones esterilizadas del o de los compuestos activos en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones
35 pueden contener también agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, p. ej., en ampollas, o en recipientes multidosis y pueden contener conservantes añadidos.

Como alternativa, la formulación inyectable puede proporcionarse en forma de polvo para su reconstitución antes de su utilización con un vehículo adecuado que comprende pero no se limita a agua esterilizada exenta de pirógeno, tampón, solución de dextrosa, etc. Con esta finalidad, el o los compuesto(s) activo(s) puede(n) secarse por cualquier técnica conocida en la materia, tal como liofilización, y reconstituirse antes de su utilización.

40 Para la administración transmucósica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que debe penetrarse. Dichos penetrantes son conocidos en la técnica.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma, por ejemplo, de pastillas, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o fosfato monobásico de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de
50 magnesio, talco o sílice); disgregadores (p. ej., almidón de patata o almidón glicolato de sodio);

agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio y lecitina). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, con azúcares, películas o recubrimientos entéricos.

5 Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de elixires, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden prepararse como un producto seco para reconstitución en agua o en otros vehículos adecuados antes de su utilización. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina
10 o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, cremophoreTM o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener además sales de tampones, agentes conservantes, potenciadores de sabor, colorantes y edulcorantes cuando proceda.

15 Las preparaciones para la administración oral pueden formularse de manera adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo, tal como es bien conocido en la técnica.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

20 Para las vías de administración rectal y vaginal, el o los compuesto(s) activo(s) pueden formularse como soluciones (para enemas de retención) supositorios o pomadas que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

25 Para la administración nasal o administración por inhalación o insuflación el o los compuesto(s) activo(s) puede(n) administrarse de manera conveniente en forma de pulverizador de aerosol desde envases presurizados o desde un nebulizador con la utilización de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoreetano, fluorocarbonos, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos para su utilización en un inhalador o insuflador (por ejemplo, cápsulas y cartuchos compuestos de gelatina) pueden formularse conteniendo una mezcla en
30 polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

35 Para la administración ocular, el o los compuesto(s) activo(s) puede(n) formularse en forma de una solución, emulsión, suspensión, etc. adecuadas para su administración a los ojos. Se conoce en la técnica una variedad de vehículos adecuados para administrar los compuestos a los ojos. Algunos ejemplos específicos no limitativos se describen en la patente U.S. n° 6.261.547; patente U.S. n° 6.197.934; patente U.S. n° 6.056.950; patente U.S. n° 5.800.807; patente U.S. n° 5.776.445; patente U.S. n° 5.698.219; patente U.S. n° 5.521.222; patente U.S. n° 5.403.841; patente U.S. n° 5.077.033; patente U.S. n° 4.882.150 y patente U.S. n° 4.738.851.

40 Para la administración prolongada, el o los compuesto(s) activo(s) puede(n) formularse en forma de preparación de liberación lenta para su administración por implantación o inyección intramuscular. El principio activo puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej., en forma de emulsión en un aceite aceptable) o en resinas de intercambio, o como derivados muy poco solubles, p. ej., en forma de sal muy poco soluble. Como alternativa, pueden utilizarse sistemas de administración transdérmica preparados en forma de disco o parche
45 adhesivo que liberan lentamente el o los compuesto(s) activo(s) para su absorción percutánea. Con esta finalidad, pueden utilizarse potenciadores de la permeación para facilitar la penetración transdérmica del o de los compuesto(s) activo(s). Algunos parches transdérmicos adecuados se describen, por ejemplo, en la patente U.S. n° 5.407.713; patente U.S. n° 5.352.456; patente U.S. n° 5.332.213; patente U.S. n° 5.336.168; patente U.S. n° 5.290.561; patente U.S. n° 5.254.346; patente U.S. n° 5.164.189; patente U.S. n° 5.163.899; patente U.S. n° 5.088.977; patente U.S. n°
50 5.087.240; patente U.S. n° 5.008.110 y patente U.S. n° 4.921.475.

Como alternativa, pueden emplearse otros sistemas de administración farmacéutica. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos para administración que pueden utilizarse para administrar compuesto(s) o profármaco(s) activo(s). También pueden emplearse determinados disolventes orgánicos, tales como el sulfóxido de dimetilo (DMSO), aunque normalmente a costa de mayor toxicidad.

Si se desea, las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contiene(n) el o los compuesto(s) activo(s). El envase puede estar compuesto, por ejemplo, de metal u hoja de plástico, como por ejemplo un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para su administración.

6.8 Dosis eficaces

El o los compuesto(s) activo(s), o las composiciones de estos, se utilizarán generalmente en una cantidad eficaz para conseguir el resultado pretendido, por ejemplo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad concreta que se está tratando. El o los compuesto(s) puede(n) administrarse terapéuticamente para conseguir una utilidad terapéutica. Por utilidad terapéutica se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se esté tratando de modo que el paciente refiere una mejoría en la sensación o en la afección, a pesar de que el paciente todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente. La utilidad terapéutica comprende también la interrupción o ralentización de la evolución de la enfermedad, independientemente de si se realiza la mejoría.

La cantidad de compuesto administrado dependerá de una variedad de factores, que incluyen, por ejemplo, la indicación que se está tratando, el modo de administración, la gravedad de la indicación en tratamiento y la edad y el peso del paciente, la biodisponibilidad del compuesto activo concreto, etc. La determinación de una dosis eficaz entra dentro de las facultades de los expertos en la materia.

Las dosis eficaces pueden estimarse inicialmente en ensayos *in vitro*. Por ejemplo una dosis inicial para su utilización en animales puede formularse para conseguir una concentración de compuesto activo en la sangre o suero en circulación que es igual o superior a la CI_{50} del compuesto en concreto medida en un ensayo *in vitro*, tal como en los ensayos *in vitro* descritos en el apartado Ejemplos. El cálculo de las dosis para conseguir dichas concentraciones en sangre o suero en circulación teniendo en cuenta la biodisponibilidad del compuesto en concreto entra dentro de las facultades de los expertos en la materia. Para orientación, se refiere al lector a Fingl & Woodbury, "General Principles", en *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, capítulo 1, págs. 1-46, última edición, Pergamon Press y a las referencias citadas en ésta.

Las dosis iniciales pueden estimarse también a partir de datos *in vivo*, tal como en modelos animales. Los modelos animales útiles para probar la eficacia de los compuestos para tratar o prevenir las diversas enfermedades descritas anteriormente son bien conocidos en la técnica. Las cantidades de la dosis estarán comprendidas en el intervalo entre aproximadamente 0,0001, 0,001 ó 0,01 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día, pero pueden ser superiores o inferiores, dependiendo, entre otros factores, de la actividad del compuesto, de su biodisponibilidad, del modo de administración y de varios factores expuestos anteriormente. La cantidad de dosis y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar concentraciones de plasma del o de los compuesto(s) que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse una vez a la semana, varias veces a la semana (p. ej., cada dos días), una vez al día o varias veces al día, dependiendo, entre otras cosas, del modo de administración, de la indicación específica que se esté tratando y del dictamen del médico recetador. En los casos de administración local o de asimilación selectiva tal como en la administración tópica local, la concentración local eficaz del o de los compuesto(s) activo(s) puede no estar relacionada con la concentración en el plasma. Los expertos en la materia podrán optimizar las dosis locales eficaces sin exceso de experimentación.

Preferentemente, el o los compuesto(s) proporcionarán utilidad terapéutica o profiláctica sin producir toxicidad importante. La toxicidad del o de los compuesto(s) puede determinarse utilizando los procedimientos farmacéuticos habituales. La relación de la dosis entre el efecto tóxico y terapéutico (o profiláctico) LD_{50}/ED_{50} es el índice terapéutico (LD_{50} es la dosis letal para el 50% de la población y ED_{50} es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). Se prefiere(n) el o los compuesto(s) que presenta(n) altos índices terapéuticos.

6.9 Kits

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden disponerse en forma de kits. En algunas formas de realización, el kit proporciona el o los compuesto(s) y reactivos para preparar una composición destinada a su administración. La composición puede estar en forma anhidra o liofilizada, o en solución, particularmente en solución esterilizada. Cuando la composición está en forma anhidra, el reactivo puede comprender un diluyente farmacéuticamente aceptable para la preparación de una formulación líquida. El kit puede contener un dispositivo para la administración o para la dispersión de las composiciones, que incluye, pero no se limita a, jeringuilla, pipeta, parche transdérmico o inhalador.

Los kits pueden incluir otros compuestos terapéuticos para su utilización junto con los compuestos descritos en la presente memoria. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos son otros compuestos anticancerosos y antineoplásicos. Estos compuestos pueden proporcionarse por separado o mezclados con los compuestos de la presente invención.

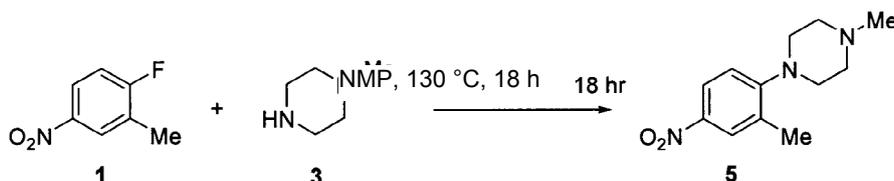
Los kits incluirán instrucciones apropiadas para la preparación y administración de la composición, efectos secundarios de las composiciones y cualquier otra información relevante. Las instrucciones pueden estar en cualquier formato apropiado, incluyendo, pero sin limitarse a, material impreso, cinta de vídeo, disco legible por ordenador o disco óptico.

7. EJEMPLOS

Las invenciones están definidas además haciendo referencia a los siguientes ejemplos que describen la preparación de varios compuestos descritos en la presente memoria, a los métodos de ensayo de su actividad biológica y a los métodos de utilización. Es evidente para los expertos en la materia que pueden ponerse en práctica muchas modificaciones tanto de los materiales como de los métodos sin apartarse del alcance de las invenciones.

7.1 Preparación de 4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-metilnitrobenzono

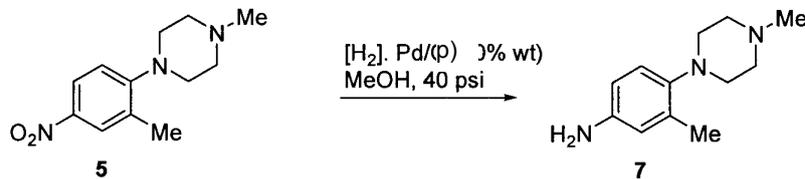
Reacción:



Procedimiento: Se calentó a reflujo (120 °C) con N_2 durante 24 horas una mezcla homogénea de 4-fluoro-3-metilnitrobenzono **1** (20 g, 129 mmoles) y N-metilpiperazina **3** (25,82 g, 258 mmoles) en *N*-metilpirrolidona (NMP) (10 ml). La mezcla de reacción, tras el enfriamiento hasta temperatura ambiente, se vertió sobre una solución saturada de NaCl (100 ml). El sólido resultante se sometió a ultrasonidos durante aprox. 30 segundos, se filtró, se lavó con agua enfriada en hielo (2 × 10 ml) y se secó a alto vacío para obtener 4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-metilnitrobenzono **5** (28 g, 92%). 1H RMN (CD_3OD): δ 8,02 (m, 2H), 7,13 (d, 1H, $J=9,3$ Hz), 3,08 (m, 4H), 2,66 (m, 4H), 2,38 (s, 6H); LCMS: pureza: 99%, MS (m/e): 236 (MH^+).

7.2 Preparación de 4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-metilanilina

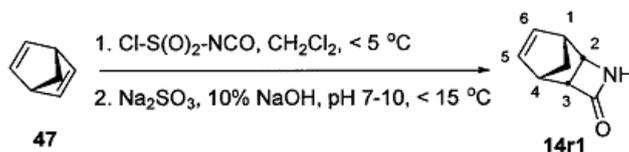
Reacción:



5 -1-il)-3-metilanilina **7** (15 g, 86%). ^1H RMN (CD_3OD): δ 6,83 (d, 1H, $J=8,7$ Hz), 6,59 (d, 1H, $J=2,7$ Hz), 6,54 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz y 2,7 Hz), 2,84 (t, 4 H, $J=4,8$ Hz), 2,60 (bm, 4H), 2,34 (s, 3H), 2,20 (s, 3H); LCMS: pureza: 99,9%, MS (m/e): 206 (MH^+).

7.3 Preparación de 3-aza-4-oxo-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno

10 Reacción: **Procedimiento:** Se hidrogenó $[\text{H}_2]$ a 40 PSI durante 3 horas una mezcla heterogénea de 4-(4-metilpiperazinil)-3-metilitrobenzo **5** (20 g, 85 mmoles), Pd al 10%/C (1,3 g) en metanol (1,2 litros). Se filtró el catalizador de paladio a través de un lecho de celite, se lavó con metanol (3×50 ml) y se concentró el filtrado combinado para dar 4-(4-metilpiperazin



(2-exo-3-exo racémico)

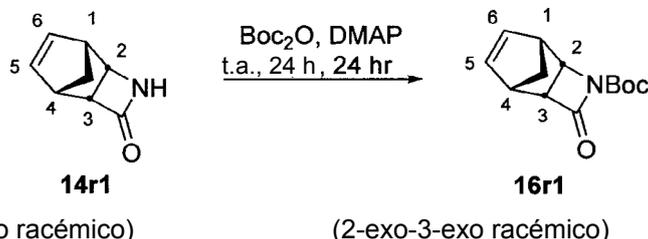
15 **Procedimiento: Parte 1:** Una solución de 2,5-norbornadieno **47** (25,0 ml, 0,246 moles) en CH_2Cl_2 (110 ml, botella fresca) se enfrió en un baño de NaCl con hielo ($-10 \text{ }^\circ\text{C}$). A esto se añadió gota a gota una solución de CSI (21,4 ml, 0,246 moles) en CH_2Cl_2 (45 ml, botella fresca) a un ritmo para mantener la temperatura por debajo de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ (la adición tardó aprox. 1,25 h). Una vez terminada la adición, se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora entre 0 y $5 \text{ }^\circ\text{C}$ y a continuación se sacó del baño de refrigeración y se dejó calentar hasta $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se detuvo la mezcla de reacción con agua (60 ml) y se agitó intensamente durante varios minutos. Se separó la capa orgánica, se lavó con salmuera y se secó con Na_2SO_4 . La concentración dio un aceite marrón claro.

20 **Parte 2:** Se enfrió en un baño de NaCl con hielo una mezcla de Na_2SO_3 (24,5 g), agua (70 ml) y CH_2Cl_2 (30 ml). Se diluyó el aceite de la **Parte 1** a 100 ml con CH_2Cl_2 y se añadió gota a gota a la mezcla anterior a un ritmo para mantener la temperatura por debajo de $15 \text{ }^\circ\text{C}$ (la adición tardó aprox. 1,75 h). Se controló el pH de la mezcla de reacción con un pH-metro y se mantuvo básico (pH 7 a 10) ajustando con NaOH al 10% (p/v) (a medida que se necesitaba). Una vez terminada la adición, se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora entre 5 y $10 \text{ }^\circ\text{C}$ (el pH final fue 8,5). Se vertió la mezcla de reacción en un embudo de separación y se separó la capa de CH_2Cl_2 . Esta fase orgánica era una suspensión sólida espesa y gelatinosa. Se diluyó con agua (aprox. 400 ml) para preparar una solución más fluida. Se extrajo de nuevo la capa acuosa con CH_2Cl_2 (4×100 ml).

30 (Como alternativa, pueden separarse los sólidos del CH_2Cl_2 por centrifugación. Los sólidos pueden diluirse a continuación con agua (hasta que se disuelvan casi completamente) y extraerse con CH_2Cl_2). Se extrajo de nuevo la capa acuosa con CH_2Cl_2 (10×100 ml). Se controló por TLC la presencia del producto en los extractos en CH_2Cl_2 . Se lavaron con salmuera los extractos orgánicos combinados, se secaron con MgSO_4 y se filtraron a través de celite. La eliminación del disolvente dio el producto deseado, 3-aza-4-oxo-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno 2-exo-3-endo racémico **14r1** en forma de sólido blanco (20,5 g, 62%). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 8,01 (s a, 1H), 6,22 (dd, $J=3,3$ y 5,4 Hz, 1H), 6,12 (dd, $J=3,3$ y 5,4 Hz, 1H), 2,88 (dd, $J=1,5$ Hz y 3,3 Hz, 1H), 2,79 (s a, 1H), 2,74 (s a, 1H), 1,58 (d, $J=9,3$ Hz, 1H) y 1,47 (d, $J=9,3$ Hz, 1H).

7.4 Preparación de 4-oxo-3-terc-butoxicarbonilaza-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno

Reacción:

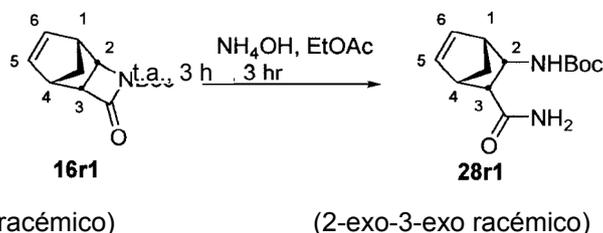


5 **Procedimiento:** Se agitó con N_2 a temperatura ambiente durante 24 horas una mezcla homogénea de 3-aza-4-oxo-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno (**14r1**; racémico-2-exo-3-exo; 10,0 g, 74 mmoles), $(\text{BOC})_2\text{O}$ (16,1 g, 74 mmoles) y DMAP (1,1 g) en CH_2Cl_2 . A esta mezcla de reacción se añadieron EtOAc (100 ml) seguido de H_2O (100 ml) y se agitó durante 1 hora más. Se separó la capa orgánica y se lavó con H_2O (2 × 100 ml). Se secó la capa orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida para dar 4-oxo-3-terc-butoxicarbonilaza-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno (**16r1**; racémico-2-exo-3-exo) (16,5 g, 70%); ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 6,29 (dd, $J=3,3$ y $5,4$ Hz, 1H), 6,19 (dd, $J=3,3$ y $5,4$ Hz, 1H), 3,77 (d, $J=4,5$ Hz, 1H), 3,13 (s a, 1H), 3,08-3,04 (m, 1H), 2,93 (s a, 1H) y 1,45 (s, 9H). LCMS: 95%.

7.5 Preparación y aislamiento de diastereoisómeros estereoisoméricamente puros a partir de (4:) (2-exo-3-exo)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina racémica

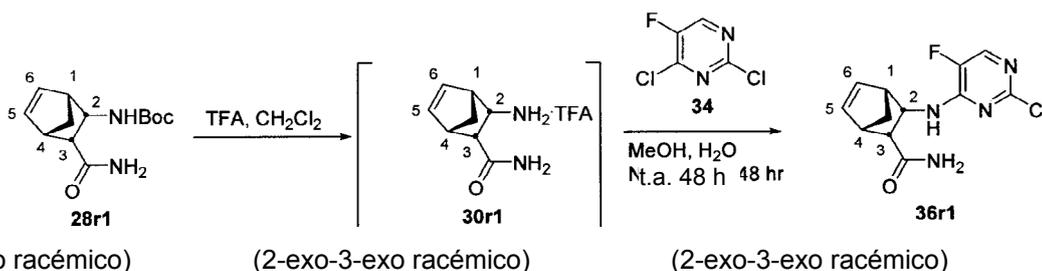
15 Se preparó una mezcla racémica del compuesto del título a partir del 2-exo-3-exo racemato de 2-aminobiciclo[2.2.1]hept-5-en-3-carboxamida de la forma siguiente.

Reacción:



20 **Procedimiento:** Un matraz de fondo redondo equipado con un diafragma de caucho y una varilla de agitación magnética se cargó con N-BOC- β -lactama racémica **16r1** (2,0 g) con una presión positiva de nitrógeno. Se añadió a esto acetato de etilo (25 ml) seguido de amoníaco al 30% en agua (25 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se separó la capa de acetato de etilo y se lavó con solución acuosa de NaHCO_3 al 5% (20 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente para dar 1,10 g de N-BOC carboxamida racémica **28r1**.

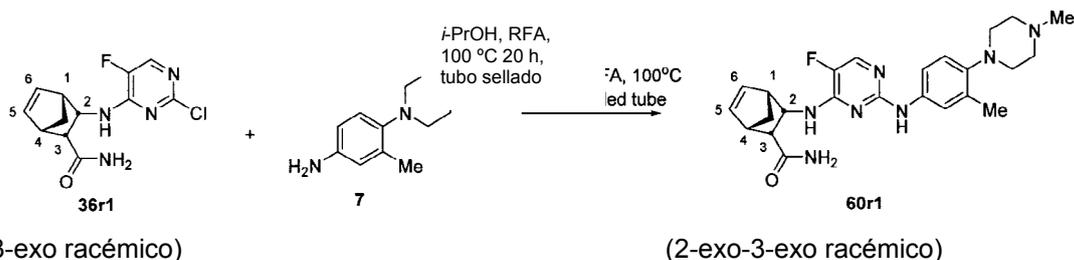
Reacción:



30 **Procedimiento:** Un matraz de fondo redondo equipado con entrada de N_2 y una varilla de agitación magnética se cargó con N-BOC lactama racémica **28r1** (2,00 g, 7,9 mmoles) y a continuación se trató con TFA al 20% en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente durante 2 horas. La

solución resultante se concentró a presión reducida. Se eliminaron las trazas de TFA a alto vacío durante varias horas para dar el producto intermedio, sal de TFA (**30r1**, racémica). La sal de TFA **30r1** racémica resultante se trató con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina **10** (1,58 g, 9,51 mmoles) en MeOH:H₂O (20:10 ml) en presencia de NaHCO₃ (1,33 g, 15,84 mmoles) a temperatura ambiente durante 48 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (25 ml), se saturó con NaCl y se extrajo con EtOAc (3 × 50 ml). Tras el secado con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó el disolvente y se cromatografió el residuo (gel de sílice, CH₂Cl₂ y a continuación 2 a 4% de NH₃ 2 N/MeOH en CH₂Cl₂) para dar 1,3 g de producto mono-SNAr racémico **36r1**.

Reacción:



10

(2-exo-3-exo racémico)

(2-exo-3-exo racémico)

15

Procedimiento: Se agitó a 100 °C durante 24 horas un tubo sellado cargado con producto mono-SNAr racémico **36r1** (1,1 g, 8 mmoles), anilina **7** (0,90 g, 4,4 mmoles), TFA (0,6 ml) y metanol (9 ml). Se concentró la solución homogénea viscosa resultante y se cromatografió el residuo (gel de sílice, CH₂Cl₂ y a continuación 2 a 5% de NH₃ 2N/MeOH en CH₂Cl₂) para dar el derivado 2-exo-3-exo racémico 2,4-pirimidindiamina **60r1** esperado (1,12 g; pureza: 95%).

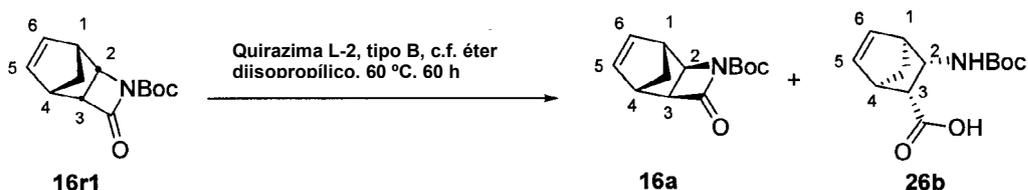
20

Aislamiento de enantiómeros: Se resolvieron los diastereoisómeros y se aislaron del racemato **60r1** por cromatografía quiral HPLC preparativa (columna Phenomenex Chirex 3020 250 × 10 mm), eluyendo con una mezcla de hexano:diclorometano:metanol 35:63:2 (vol:vol:vol) a un caudal de 6 ml/min. El enantiómero que eluyó a los 9,44 min se denominó enantiómero **E1** y el enantiómero que eluyó a los 12,74 min se denominó enantiómero **E2**.

7.6 Preparación enzimática de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindia-mina estereoisoméricamente pura utilizando quirazima

7.6.1 Preparación de N-Boc-β-lactama estereoisoméricamente pura

Reacción:



(2-exo-3-exo racémico)

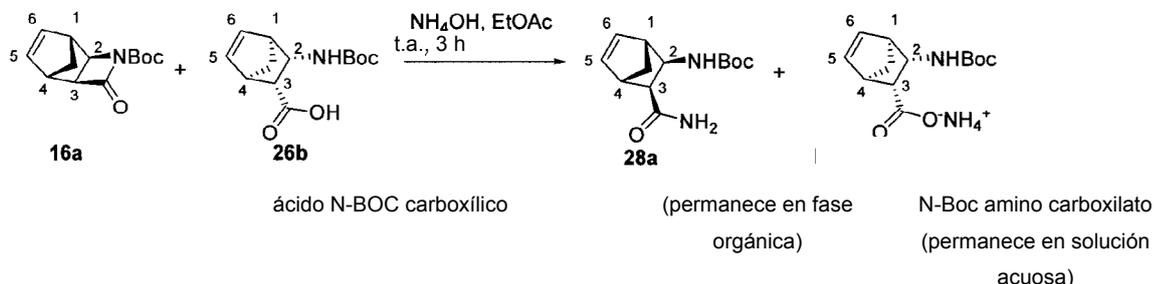
Ácido N-Boc carboxílico

30

Procedimiento: Un tubo sellado seco cargado con 4-oxo-3-terc-butoxicarbonilazatriciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno (**16r1**; 2-exo-3-exo racémico) (4,0 g, 17,02 mmoles), quirazima L-2 inmovilizada unida a la resina, tipo B, c.f. (8,0 g, adquirida de BioCatalytics Inc., Pasadena, CA) y éter diisopropílico (80 ml) se agitó suavemente en una incubadora a 60 °C durante 60 horas. (La resolución enzimática de la N-BOC β-lactama racémica **16r1** fue seguida por RMN de protones. La integración del grupo terc-butilo de la N-BOC lactama **16a** enantioméricamente pura y del ácido N-BOC carboxílico **26b** se observó en proporción 1:1). Se filtró la mezcla de reacción resultante y se lavó la resina sólida con éter diisopropílico (2 × 40 ml). Se concentró el filtrado para dar una mezcla de N-BOC β-lactama **16a** enantioméricamente pura y del ácido N-BOC carboxílico **26b** (masa total: 4,0 g).

35

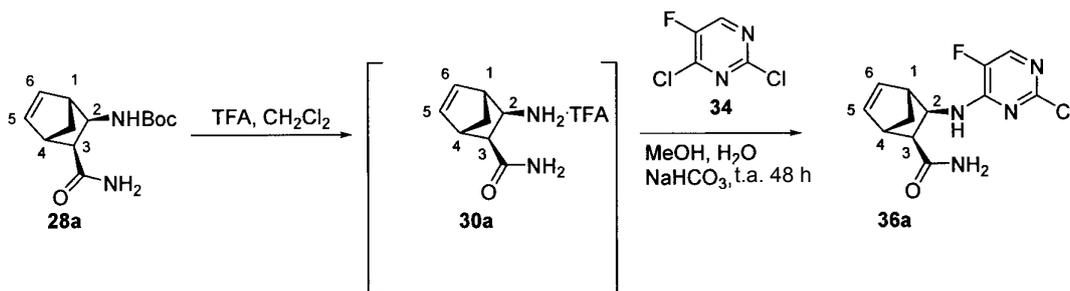
Reacción:



Procedimiento: Un matraz de fondo redondo equipado con un diafragma de caucho y una varilla de agitación magnética se cargó con una mezcla de N-BOC-lactama **16a** enantioméricamente pura y ácido N-BOC carboxílico **26b** (4,0 g) con una presión positiva de nitrógeno. Se añadió a esto acetato de etilo (50 ml) seguido de hidróxido de amonio acuoso al 25% (50 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se controló la evolución de la reacción por TLC. Se separó la capa de acetato de etilo y se lavó con solución acuosa de NaHCO₃ al 5% (40 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente para dar 2,00 g (7,93 mmoles por 8,51 mmoles teóricos; 93% de rendimiento) de la N-BOC carboxamida **28a** enantioméricamente pura deseada con más del 99% de exceso enantiomérico, determinada por HPLC quiral. La solución acuosa que contenía el N-BOC carboxilato de amonio tras la acidificación con HCl 1 N frío seguida de la extracción con CH₂Cl₂ regeneró el ácido N-BOC carboxílico **26b** (1,8 g, 7,11 mmoles por 8,151 mmoles teóricos; 84% de rendimiento). ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,26 (s a, 1H), 6,66 (s a, 1H), 6,13 (m, 2H), 3,59 (t, 1H, J=6,9 Hz), 2,80 (s, 1H), 2,54 (s, 1H), 2,31 (d, 1H, J=8,1 Hz), 2,00 (d, 1H, J=8,7 Hz), 1,36 (s, 9H), 1,30 (d, 1H, J=8,1 Hz); LCMS: MS (m/z): 254 (MH⁺); [α]_D -76,78° (c 1,0, MeOH).

7.6.2 Preparación del producto mono SNAr estereoisoméricamente puro

Reacción:



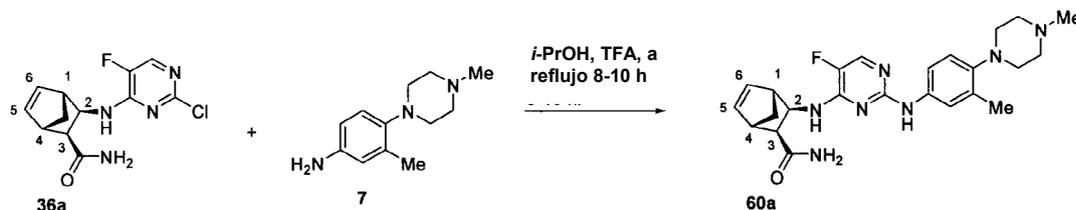
Procedimiento: Un matraz de fondo redondo equipado con entrada de N₂ y una varilla de agitación magnética se cargó con N-BOC carboxamida **28a** enantioméricamente pura (2,00 g, 7,93 mmoles) y a continuación se trató con TFA al 20% en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente durante 2 horas. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. La solución resultante se concentró a presión reducida. Se eliminaron las trazas de TFA a alto vacío durante varias horas para dar el producto intermedio enantioméricamente puro, sal de TFA **30a**, con rendimiento cuantitativo. ¹H RMN (DMSO-d₆): 8,10 (s a, 2H), 7,92 (s, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,29 (m, 1H), 6,18 (m, 1H), 4,38 (s a, 1H), 3,06 (d, 1H, J=7,2 Hz), 2,97 (s, 1H), 2,87 (s, 1H), 2,43 (d, 1H, J=7,5 Hz), 2,10 (d, 1H, J=6,0 Hz), 1,36 (d, 1H, J=8,7 Hz); LCMS: MS (m/z): 152 (MH⁺).

La sal de TFA **30a** resultante se trató con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina **34** (1,58 g, 9,51 mmoles) en MeOH:H₂O (20:10 ml) en presencia de NaHCO₃ (1,33 g, 15,84 mmoles) a temperatura ambiente durante 48 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (25 ml), se saturó con NaCl y se extrajo con EtOAc (3 × 50 ml). Tras el secado con Na₂SO₄ anhidro, se

evaporó el disolvente y se cromatógrafió el residuo (gel de sílice, CH₂Cl₂ y a continuación 2 a 4% de NH₃ 2 N/MeOH en CH₂Cl₂) para dar 2,02 g (91%) del producto mono-SNAr **36a** deseado. ¹H RMN (DMSO-d₆): 8,25 (d, 1H, J=7,2 Hz), 8,07 (d, 1H, J=3,3 Hz), 7,71 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 6,29 (m, 2H), 3,99 (t, 1H, J=7,8 Hz), 2,85 (s, 1H), 2,75 (s, 1H), 2,49 (d, 1H, J=0,9 Hz), 2,11 (d, 1H, J=8,7 Hz), 1,39 (d, 1H, J=8,7 Hz); LCMS: pureza: 95%, MS (m/z): 283 (MH⁺). La pureza enantiomérica fue superior al 99% según se determinó por HPLC quiral; [α]_D +61,10° (c 1,0, MeOH).

7.6.3 Preparación de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura

Reacción:

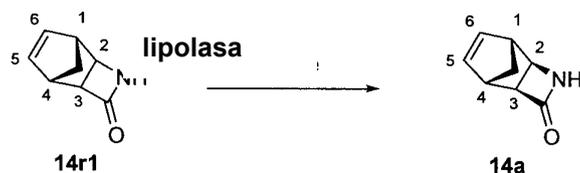


Procedimiento: Un matraz de reacción seco equipado con una varilla de agitación, condensador de reflujo y entrada de N₂ se cargó con producto mono-SNAr **36a** enantioméricamente puro (2,25 g, 8 mmoles), anilina **7** (1,80 g, 8,8 mmoles), TFA (1,12 ml) e isopropanol (18 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó a la temperatura de reflujo durante 8 a 10 horas. Tras enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se añadió acetato de etilo (20 ml). Se filtró el sólido obtenido y se lavó con acetato de etilo (2 × 5 ml) para dar el compuesto **60a** en forma de sal ácida. El sólido resultante se colocó a continuación en agua y la mezcla acuosa se ajustó a pH 9 con NaHCO₃ acuoso, que produjo la precipitación de un sólido. Se filtró el sólido de la mezcla, se lavó con agua y se secó para dar 3,3 g (93%) del derivado de 2,4-pirimidindiamina **60a**. ¹H RMN (DMSO-d₆): 8,85 (s, 1H), 7,83 (d, 1H, J=2,7 Hz), 7,68 (s, 1H), 7,47 (s, 2H), 7,36 (d, 1H, J=7,8 Hz), 7,18 (s, 1H), 6,89 (d, 1H, J=8,7 Hz), 6,32 (m, 1H), 6,25 (m, 1H), 4,11 (t, 1H, J=7,8 Hz), 3,32 (s, 3H), 2,86 (s, 1H), 2,76 (m, 4H), 2,49 (m, 4H), 2,46 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,11 (d, 1H, J=8,4 Hz), 1,39 (d, 1H, J=9 Hz); LCMS: pureza: 100%, MS (m/z): 452 (M⁺); >99% ee según se determinó por HPLC quiral; [α]_D^{TA} +101,2° (c 1,0, MeOH). Se descubrió que los datos analíticos quirales, ¹H RMN y LCMS eran idénticos a los del enantiómero denominado **E1**.

7.7 Preparación enzimática de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonil-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura utilizando la enzima Novazima 435

7.7.1 Preparación de β-lactama estereoisoméricamente pura

Reacción:

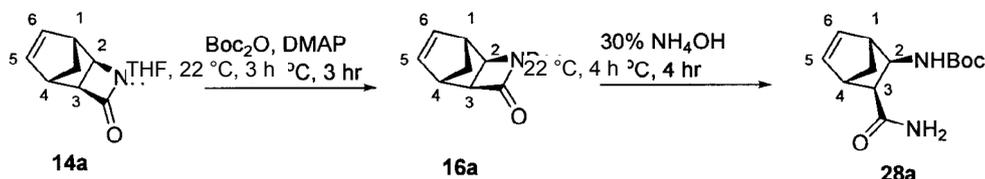


Procedimiento: Lipolasa inmovilizada (8,0 g, de Sigma, número de orden L4777), β-lactama **14r1** (racémico: 2-exo-3-exo) (4,0 g, 7,4 mmoles) y agua (0,13 ml, 7,4 mmoles) se añadieron a 250 ml de éter isopropílico en un matraz a presión. Se desgasificó la mezcla con nitrógeno durante 20 minutos y se selló el matraz y se incubó durante 14 días a 70 °C. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente, se filtró a través de celite y se lavó con 300 ml de éter diisopropílico. El filtrado combinado se concentró a sequedad y se cristalizó el residuo en éter

diisopropílico para dar la β -lactama **14a** enantioméricamente pura en forma de agujas incoloras (1,22 g, 61%). La pureza enantiomérica fue superior al 99% según se determinó por HPLC quiral.

7.7.2 Preparación de 2-N-Boc-amino-3-aminocarbonilbiciclo-[2.2.1]hept-5-eno estereoisoméricamente puro

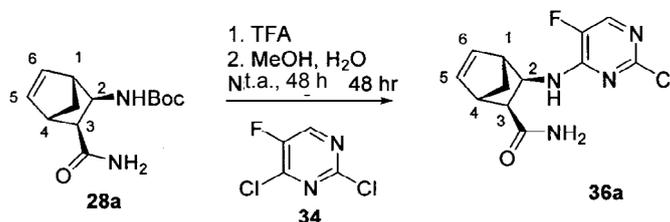
5 Reacción:



10 **Procedimiento:** Una mezcla homogénea de 3-aza-4-oxo-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno **14a** enantioméricamente puro (1,1 g, 8,2 mmoles), (BOC)₂O (2,76 g, 12,3 mmoles) y DMAP (100 mg) en CH₂Cl₂ se agitó con N₂ a temperatura ambiente durante 3 horas para dar N-BOC lactama **16a** enantioméricamente pura, que se utilizó más adelante sin aislamiento. A esta mezcla de reacción se le añadieron 20 ml de hidróxido de amonio acuoso al 25% y se continuó agitando durante otras 4 horas. Se añadió agua y la mezcla de reacción se extrajo con diclorometano (2 × 50 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con HCl acuoso (5%), se secó con sulfato de sodio y se redujo a sequedad a presión reducida para dar N-BOC carboxamida **28a** enantioméricamente pura (2,51 g) como un sólido blanco, la cual se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

7.7.3 Preparación del producto mono SNAr estereoisoméricamente puro (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-2-cloro-5-fluoro-4-aminopiridina

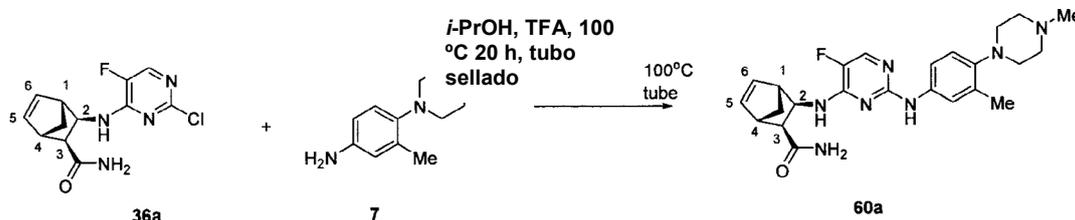
Reacción:



20 **Procedimiento:** La N-BOC carboxamida **28a** enantioméricamente pura (2,51 g) se disolvió en 10 ml de diclorometano y se trató con 10 ml de TFA. Se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se suspendió en tolueno y se volvió a concentrar a sequedad. Se disolvió el sólido resultante en metanol:agua (30 ml:3 ml) y se trató con 1,5 g de bicarbonato de sodio. Se añadió 5-fluoro-2,4-dicloropirimidina **34** (3 g, 17,9 mmoles) y se agitó la mezcla durante 2 días a temperatura ambiente. Se eliminaron los volátiles al vacío y se suspendió el residuo en salmuera. Se filtró el precipitado, se secó y se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice, diclorometanometanol, 20:1) para dar el producto mono SNAr **36a** enantioméricamente puro deseado como un sólido blanco (1,7 g, 74%).

7.7.4 Preparación de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura

Reacción:

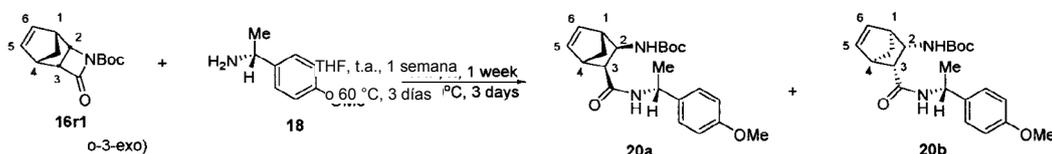


Procedimiento: Una mezcla homogénea de anilina **7** (400 mg, 1,95 mmoles), producto mono SNAr **36a** enantioméricamente puro (400 mg, 1,41 mmoles) y 0,2 ml de TFA en 4 ml de isopropanol en un tubo sellado se agitó a 100 °C durante 20 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente, se diluyó con 2 ml de éter dietílico y el precipitado resultante se filtró y se lavó con éter dietílico. Los sólidos restantes se disolvieron en agua y se trataron con solución acuosa de hidróxido de amonio al 25%. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó para dar 527 mg (83%) del producto deseado, derivado de 2,4-pirimidindiamina **60a** como un sólido blanco desvaído. Se determinó la pureza por LCMS, que resultó ser superior al 97% y se determinó la pureza enantiomérica por HPLC quiral, que resultó ser superior al 99%. Los datos analíticos quirales y los análisis de ¹H RMN y LCMS eran idénticos a los del enantiómero que se denominó **E1**.

7.8 Preparación de compuestos estereoisoméricamente puros que utilizan (*R*)-metil-*p*-metoxibencilamina como auxiliar quiral

7.8.1 Preparación de aminas racémicas 2-exo-3-exo

Reacción:

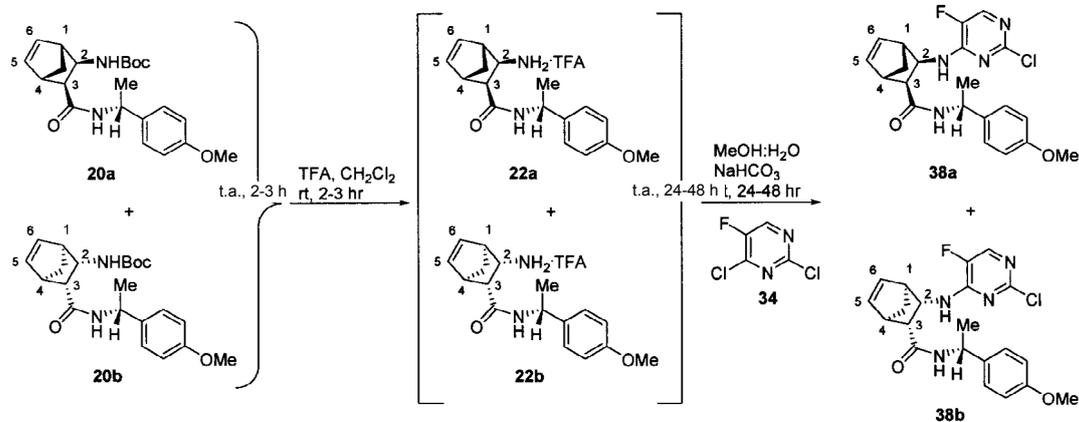


(2-exo-3-exo racémico)

Procedimiento: Se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas una mezcla homogénea de 4-oxo-3-terc-butoxicarbonilaza-triciclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-eno (**16r1**; racémico-2-exo-3-exo) (9,2 g, 40 mmol) y (*R*)-metil-4-metoxibencilamina **13** (18, 24 g, 48 mmoles) en THF anhidro (75 ml). La mezcla de reacción se concentró, se suspendió en hexanos (5 ml), se sometió a ultrasonidos y se separó el sólido por filtración para dar una mezcla de diastereoisómeros **20a** y **20b** (12 mg). Como alternativa, la purificación puede realizarse utilizando cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos, y a continuación 5%, 10%, 20% y 50% de EtOAc en hexanos).

7.8.2 Preparación de productos mono-SNAr 2-exo-3-exo racémicos seguida de separación de compuestos isoméricamente puros por cristalización

Reacción:

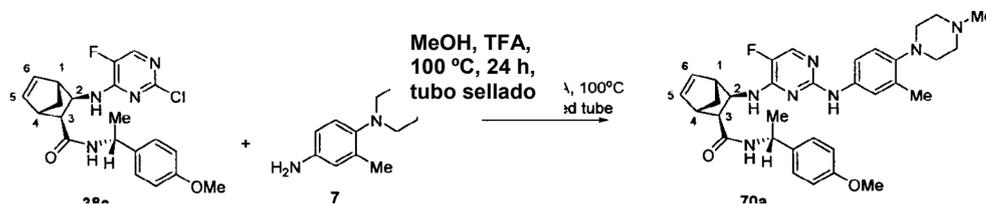


separado por cristalización

Procedimiento: Se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas una mezcla heterogénea de diastereoisómeros **20a** y **20b** (6,0 g, 17 mmoles), TFA (20 ml) en CH_2Cl_2 . Se utilizó TLC para controlar la evolución de la reacción. La reacción resultante se concentró a sequedad y se secó a alto vacío durante varias horas para dar una mezcla diastereoisomérica de productos intermedios **22a** y **22b**. La mezcla de reacción se hizo reaccionar a continuación con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina **34** (3,4 g, 20 mmoles) en presencia de NaHCO_3 (5,7 g, 68 mmoles) en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (50 ml de cada uno) a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se disolvió entonces con agua saturada con NaCl (50 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 . El extracto, tras ser secado con Na_2SO_4 , seguido de eliminación del disolvente a presión reducida, dio un residuo que se cromatografió (gel de sílice, CH_2Cl_2 y a continuación 2% de NH_3 2N/ MeOH en CH_2Cl_2). La purificación cromatográfica dio una mezcla de diastereoisómeros **38a** y **38b** (4,0 g) (la relación 1:1 puede observarse con una separación clara en LCMS en fase inversa). Los 4,0 gramos resultantes de la cristalización utilizando $\text{EtOAc}:\text{hexanos}$ (30:150 ml; v/v) dieron el material cristalino del producto intermedio **38a**, que se confirmó por estructura cristalina por rayos X; pureza química: 96% y % de: 96%. $[\alpha]_D -36,7^\circ$ (c, 0,18 MeOH). Las aguas madres que contenían el otro isómero tenían poco % de (70 a 80%), que se supuso que era diastereoisómero **38b**.

7.8.3 Preparación de producto estereoisoméricamente puro que incluye el auxiliar quiral

Reacción:



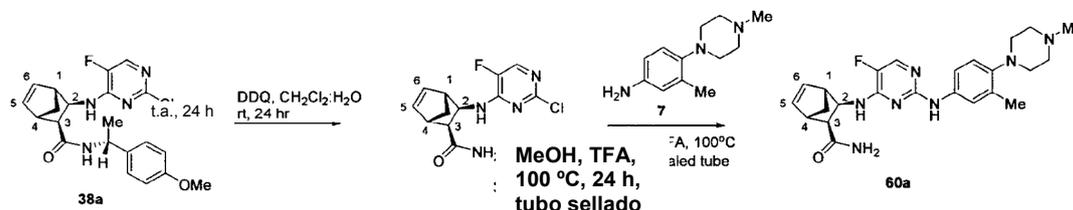
Procedimiento: Se calentó en un tubo sellado a 100°C durante 24 horas una mezcla del diastereoisómero **38a** (1,42 g, 3,4 mmoles), anilina **7** (0,834 g, 4,0 mmoles) y TFA (700 mg) en MeOH (10 ml). Se cromatografió el residuo resultante (gel de sílice, CH_2Cl_2 y a continuación 2% de NH_3 2N/ MeOH en CH_2Cl_2) para dar el producto **40a** como un sólido incoloro, pureza química: 96%.

7.8.4 Escisión del auxiliar quiral

Se observó que la escisión del auxiliar quiral procedente de **40a** era difícil, por consiguiente la escisión del auxiliar quiral procedente de los compuestos intermedios **38a** y **38b** seguida de la segunda reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ con anilina **7** se realizó de la forma siguiente:

7.8.5 Escisión del auxiliar quiral procedente del compuesto intermedio **38a** estereoisoméricamente puro y preparación de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura

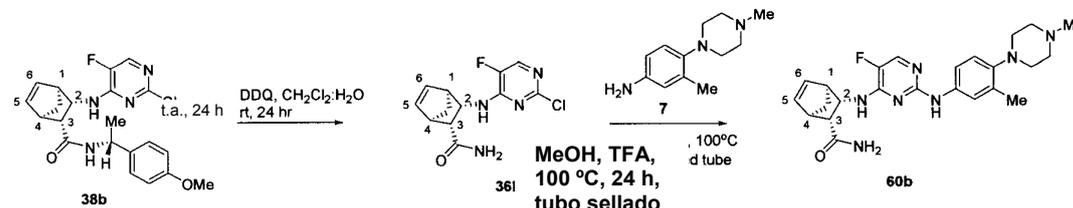
5 Reacción:



Procedimiento: El producto mono-SNAr con el auxiliar quiral **38a** se dejó reaccionar con DDQ (3 equivalentes) en CH₂Cl₂:H₂O a temperatura ambiente para obtener el producto mono-SNAr **36a** deseado. Se purificó el producto mono-SNAr por cromatografía en columna y se descubrió que era el mismo compuesto **36a** obtenido por vía enzimática, lo cual se confirmó por HPLC analítica quiral, LCMS y ¹H RMN. Además, la reacción del producto mono-SNAr **36a** con anilina **7** en MeOH:TFA a 100 °C en un tubo sellado durante 24 h dio el producto **60a** deseado. Se purificó por cromatografía en columna y se analizó por ¹H RMN, LCMS y HPLC analítica quiral. Los análisis por HPLC analítica quiral, LCMS y ¹H RMN indicaron que los datos del producto **60a** eran iguales a los del enantiómero denominado **E1**.

7.8.6 Escisión del auxiliar quiral procedente del compuesto intermedio **38b** y preparación de (1S,2S,3R,4R)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura

Reacción:



Procedimiento: El producto mono-SNAr **38b** se dejó reaccionar con DDQ (3 equivalentes) en CH₂Cl₂:H₂O a temperatura ambiente para obtener el producto mono-SNAr **36b** deseado (tras la escisión del auxiliar quiral). Se purificó el producto mono-SNAr por cromatografía en columna y se descubrió que era un diastereoisómero diferente al que se obtuvo por vía enzimática, y esto se confirmó por HPLC analítica quiral. Además, la reacción del producto mono-SNAr **36b** con anilina **7** en MeOH:TFA a 100 °C en un tubo sellado durante 24 h dio el producto **60b** deseado. Se purificó por cromatografía en columna y se analizó por ¹H RMN, LCMS y HPLC analítica quiral. Los análisis por HPLC analítica quiral, LCMS y ¹H RMN indicaron que los datos del producto **60b** eran idénticos a los del enantiómero denominado **E2**. [α]_D^{TA} -102,00° (c, 1,0 MeOH).

7.9 Preparación de sales de HCl

Las sales de HCl del racemato **60r1** y de **60a** estereoisoméricamente puro se prepararon como se describe a continuación.

7.9.1 Preparación de la sal del cloruro de hidrógeno de N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina racémica

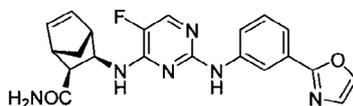
A una solución de N4-(3-aminocarbonilbiciclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina 2-exo-3-exo racémica (**60r1**) (0,140 g, 0,3 mmoles) en MeOH (3 ml) a 0 °C se añadió HCl (4 M, en dioxano, 0,170 ml, 0,681 mmoles) gota a gota y a continuación se agitó a 0 °C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución transparente y homogénea se filtró, se concentró y se redisolvió en EtOH. Se añadió

acetato de etilo a la solución etanólica para precipitar el producto deseado, que se aisló para dar la sal bis de cloruro de hidrógeno de N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-eno-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina 2-exo-3-exo racémica (compuesto **60r1-2HCl**). LCMS: pureza: 98%; MS (m/e): 453 (MH⁺).

5 7.9.2 Preparación de la sal de cloruro de hidrógeno de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura

De manera similar, *supra*, la interacción de 2 equivalentes de HCl (4 M, en dioxano) con (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina (**60a**) estereoisoméricamente pura dio la sal bis de cloruro de hidrógeno de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-eno-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]2,4-pirimidindiamina estereoisoméricamente pura (compuesto **60a-2HCl**). LCMS: pureza: 97%; MS (m/e): 453 (MH⁺); [α]_D +46,3° (c, 0,04 MeOH).

15 7.10 Preparación de (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-eno-2-il)-5-fluoro-N2-[3-(1,3-oxazol-2-il)fenil]2,4-pirimidindiamina



Se preparó (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbicyclo[2.2.1]-hept-5-eno-2-il)-5-fluoro-N2-[3-(1,3-oxazol-2-il)fenil]2,4-pirimidindiamina (Compuesto **90a**) tal como se describió anteriormente. ¹H RMN (DMSO-d₆): 9,36 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 9,92 (d, 1H, J=3 Hz), 7,79 (d, 1H, J=7,8 Hz), 7,68 (s, 1H), 7,42 (m, 4H), 7,18 (s, 1H), 6,29 (m, 1H), 6,13 (m, 1H), 4,21 (t, 1H, J=4,8 Hz), 2,86 (s, 1H), 2,77 (s, 1H), 2,55 (d, 1H, J=8,1 Hz), 2,14 (d, 1H, J=8,4 Hz), 1,39 (d, 1H, J=8,7 Hz); LCMS: pureza: 98%, MS (m/e): 407 (MH⁺).

7.11 Inhibición de la proliferación celular *in vitro*

Se determinó la capacidad de inhibir la proliferación de los compuestos **60r1**, **60r2**, **60r1-2HCl**, **60a**, **60b** y **60a-HCl** frente a una variedad de células tumorales diferentes utilizando ensayos de antiproliferación *in vitro* normalizados. Las diversas líneas celulares analizadas incluían: **A549** (carcinoma pulmonar); **ASPC-1** (adenocarcinoma pancreático); **BXPC-3** (adenocarcinoma pancreático); **CaOV-3** (adenocarcinoma de ovario); **COLO 205** (adenocarcinoma colorrectal); **DU145** (carcinoma de próstata); **ES-2** (carcinoma de células claras de ovario); **H1299** (carcinoma pulmonar amicrocítico); **H1155** (carcinoma pulmonar amicrocítico); **H460** (carcinoma pulmonar macrocítico); **HELA** (adenocarcinoma cervical); **HL160** (leucemia de promieloblastos promielocítica); **K562** (leucemia mielógena crónica de médula ósea); **L1210** (leucemia linfocítica de ratón); **MiaPaCa-2** (carcinoma pancreático); **MOLT4** (leucemia linfoblástica aguda de linfoblastos T); **OVCAR-3** (adenocarcinoma de ovario); **MOLT3** (leucemia linfoblástica aguda de linfoblastos T); **OVCAR-8** (carcinoma de ovario); **PC3** (adenocarcinoma de próstata); **SK-OV-3** (adenocarcinoma de ovario); **SU86.86** (carcinoma pancreático); **SW620** (adenocarcinoma colorrectal); **THP-1** (leucemia de monocitos monocítica aguda); **TOV-21G** (carcinoma de células claras de ovario); **U2OS** (osteosarcoma óseo) y **U937** (linfoma histiocítico).

En la TABLA 2, a continuación, se proporcionan los valores de CI₅₀ obtenidos con los compuestos. En la TABLA 2, un “+” indica un valor de CI₅₀ ≤ 1 μM, un “++” indica un valor de CI₅₀ ≤ 20 nM, “+++” indica un valor de CI₅₀ ≤ 10 nM y un “—” indica un valor de CI₅₀ > 1 μM. Un espacio en blanco indica que no se evaluó el compuesto frente a la línea celular específica.

TABLA 2						
Valores de CI_{50} <i>in vitro</i> de compuestos seleccionados						
	60r1	60r1·2HCl	60r2	60a	60a·2HCl	60b
A549	++	+	+	+++	+++	—
ASPC1	++			+++		
BxPC-3				+++		
CaOV-3				+++		
Colo205	+++			+++	+++	—
DU145	++			++	+	+
ES-2						
H1299		+		+++	+	—
H1155	+++			+++		
H460					+++	
H7299	++	+	+	++	+	—
HELA	+++			+++	+++	—
HL160	+++			++++++		—
K562	+			+ +		—
L1210	+			++ ++		—
Miapaca2	+++			+++	+++	—
MOLT3	+++			++++++		—
MOLT4	+++			++++++		—
OVCAR-3						

TABLA 2						
Valores de IC_{50} <i>in vitro</i> de compuestos seleccionados						
	60r1	60r1·2HCl	60r2	60a	60a·2HCl	60b
OVCAR-8						
PC3	++			+++		—
SKOV3				++		
Su86.86				++		
SW620	+			++		—
THP-1	+			+		+
TOV-G21				+++		
U20S	++			+++		+
U937				+++		—

7.12 Inhibición de Aurora cinasas en ensayos celulares funcionales

Se determinó la capacidad de los compuestos **60a** y **60b** para inhibir la Aurora cinasa-B en un ensayo celular funcional que comporta la fosforilación de su sustrato, histona H3. Para el ensayo, se sembraron células A549 en los pocillos de una placa de microvaloración (5000 células por pocillo en 100 μ l de medio F12K) a última hora de la tarde del día 1. Se cultivaron las células durante la noche (37 °C, CO₂ al 5%). El día 2 se les añadieron a cada pocillo 50 μ l de nocodazol (en medio 1 μ M) dando una concentración final de 333 nM. Se cultivaron las células durante 18 h más en las mismas condiciones.

El día 3, se añadieron a los pocillos alícuotas de 50 ml de varias concentraciones del compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se prepararon mediante diluciones 2 veces en serie de un patrón 2 mM (en DMSO). Los compuestos diluidos en DMSO se diluyeron 1:50 con medio una vez más a continuación para dar una solución final que contenía el compuesto de ensayo 4X, 98% de medio y 2% de DMSO. Tras la incubación, se lavó el medio/compuesto de ensayo y las células se fijaron con 2% de paraformaldehído (en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco "DPBS"; 25 μ l por pocillo; > 20 mm de incubación). Las células fijadas se lavaron una vez con DPBS (200 μ l/pocillo), se tiñeron con fosfohistona H3 (Cell Signaling Technology; 1:500 en DPS A, suero de cabra normal "NGS" al 10%, Triton-X-100 al 0,05%; 1 a 2 horas a temperatura ambiente) y se lavó dos veces con DPBS (200 μ l/pocillo). Las células se tiñeron a continuación con un anticuerpo secundario marcado con un colorante fluorescente (anticuerpo secundario de burro anti-ratón AlexFluor 488 (Invitrogen Molecular Probes; 1:2000)) y DAPI (1:15.000 de 1mg/ml de patrón), durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con DPBS (200 μ l/pocillo) y se almacenaron bajo DPBS (100 μ l/pocillo) a 4 °C hasta estar preparadas para el análisis.

Para la recogida de todos los datos se utilizó un microscopio fluorescente invertido Zeiss Axiovert S100 con un objetivo Plan-NEOFLUAR 10 \times , un foco de luz de mercurio-xenón Hamamatsu Lightningcure 200 y un filtro cuadrangular Omega Optical XF57. El sistema estaba equipado con una plataforma motorizada con control X/Y/Z Ludl Mac2000, un filtro circular Ludl, un brazo de robot Zymark Twister y una cámara digital Quantix de Roper Scientific. Todo el equipo informático fue controlado con ImagePro 4.5 con el módulo ScopePro/StagePro 4.1 (Media Cybernetics) en un PC que utilizaba Win2000. Las instrucciones informáticas básicas fueron escritas para ImagePro para el control automático del equipo informático y para la recogida de imágenes. El enfocado se realizó con un programa informático de enfoque automático de rutina contenido en StagePro que utilizaba el contraste máximo local para determinar el mejor plano del foco de una serie Z capturada una vez en cada pocillo. Una vez conseguido el enfoque apropiado, se capturaron imágenes en un formato de cuadrícula 3 \times 3, de imágenes adyacentes a la posición de enfoque, pero sin incluirla. Se capturaron las imágenes y se analizaron en un formato de 12 bits utilizando segmentación y rutinas morfológicas contenidas en el paquete informático Image Pro. Se hizo el recuento de los núcleos identificados y los datos de los píxeles de cada celda junto con las condiciones experimentales se almacenaron en una base de datos utilizando MySQL 4.0.14. El análisis ulterior de los resultados experimentales y la creación del gráfico se realizaron utilizando Matlab 6.5.

Para los análisis de fosfohistona H3, los datos se transforman en archivos Facs y se analizan utilizando FlowJo. El porcentaje de células con Fosfo-H3 se representa para cada concentración del compuesto para determinar una IC₅₀ para la inhibición de Aurora B.

Resultados. El compuesto **60a** inhibió la Aurora cinasa-B con una CI₅₀ de aproximadamente 7 nM en este ensayo. En cambio, la CI₅₀ de su enantiómero, compuesto **60b**, fue de 2,49 μ M, aprox. 350 veces mayor.

7.13 Farmacocinética del compuesto E1 en monos

Se administró el compuesto **60a** a monos por vía intravenosa (1 mg/kg en solución salina) y por vía oral (5 mg/kg en solución salina) y se controlaron las concentraciones en el plasma a lo largo del tiempo. Cuando se administró por vía i.v., la concentración en el plasma del compuesto permaneció por encima de la CI₅₀ de 7 nM 11 h después de la administración; cuando se

administró por vía oral, la concentración en el plasma del compuesto se mantuvo por encima de la CI_{50} durante más de 20 h.

7.14 El compuesto 60a reduce de tamaño los tumores *in vivo*

5 Se determinó la capacidad del compuesto **60a·2HCl** para reducir el tamaño de los tumores A549 y Colo205 en un modelo terapéutico de xenotrasplante normal en ratones SCID, y de los tumores Colo205 y MiaPaCa en un modelo de regresión de xenotrasplante normal en ratones SCID. Cuando aparecían tumores palpables de un volumen preseleccionado (aprox. de 100 mm^3 para el modelo de tratamiento; $>300 \text{ mm}^3$ para el modelo de regresión), se administraron compuestos de ensayo a los ratones en las cantidades y según los regímenes de dosificación especificados en la TABLA 3 (protocolo de tratamiento) y la TABLA 4 (protocolo de regresión), a
10 continuación.

TABLA 3			
Sumario de experimentos del modelo de tratamiento			
(Tamaño medio del tumor: 100 mm³)			
Línea celular	Dosis (mg/kg/día)	Programa (día sí/día no)	Vía
Colo205	2	4/3	oral
Colo205	10	4/3	oral
Colo205	10	2/1	oral
Colo205	10	5/2	oral
Colo205	10	7/7	oral
Colo205	10	3/11	oral
Colo205	10	1/6	oral
Colo205	10	diario	oral
A549	10	5/2	oral
A549	10	2/1	oral
A549	10	7/7	oral
A549	10	diario (13 días)	i.p.
A549	20	diario (5 días)	i.p.

TABLA 4			
Sumario de experimentos del modelo de evolución			
(Tamaño medio del tumor > 300 mm³)			
Línea celular	Dosis (mg/kg/día)	Programa	Vía
Colo205	10	diario (13 días)	oral
MiaPaCa	10	diario (3 ciclos)	oral
MiaPaCa	10	diario (3 ciclos)	i.p.

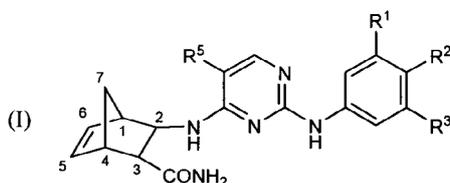
5 **Resultados.** En las FIGs. 1 y 2 se ilustran los efectos inhibidores del Compuesto **60a-2HCl** en el crecimiento del tumor Colo205 en el modelo de tratamiento. En la FIG. 1 se ilustran los resultados del régimen de dosificación diario; en la FIG. 2 los resultados de los regímenes de dosificación pulsada. Ambos regímenes de dosificación proporcionaron reducciones significativas ($p < 0,050$) en el ritmo de crecimiento tumoral en comparación con un vehículo de referencia para todos los niveles de dosificación ensayados. Los tumores A549 fueron menos sensibles al tratamiento, con una reducción aproximada del 40% en el volumen medio del tumor tras un régimen de dosificación de 5 días sí/2 días no y una concentración de la dosis de 10 mg/kg cada día ($p > 0,05$).

10 En la FIG. 3 se ilustran los efectos inhibidores del Compuesto **60a-2HCl** en el crecimiento del tumor Colo205 en el modelo de regresión. En la FIG. 4 se ilustran los efectos del Compuesto

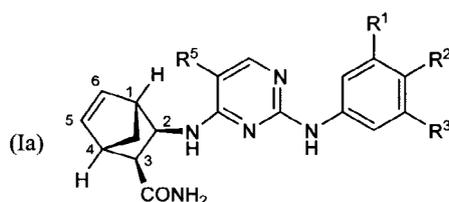
60a-2HCI en los tumores MiaPaCa en el modelo de regresión. Se observaron reducciones significativas del ritmo de crecimiento del tumor en ambas líneas tumorales. Estas reducciones fueron independientes del modo de administración. Además, las reducciones observadas en los tumores MiaPaCa fueron similares a las observadas con taxol (véase la FIG. 4).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula estructural (I):



o una sal, hidrato, solvato o N-óxido de esta, que está enriquecido en el correspondiente diastereómero de fórmula estructural (Ia):



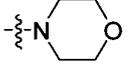
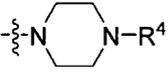
(1R, 2R, 3S, 4S)

5

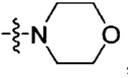
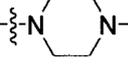
en la que:

R^1 se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , $-(CH_2)_n-OH$, $-OR^a$, $-O(CH_2)_n-R^a$, $-O(CH_2)_n-R^b$, $-C(O)OR^a$, halo, $-CF_3$, y $-OCF_3$;

cada R^2 se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno,

10 alquilo C_{1-6} , $-OR^a$, $-O(CH_2)_n-R^a$, $-O(CH_2)_n-R^b$, $-NHC(O)OR^a$, halo, $-CF_3$, $-OCF_3$,  y  ;

R^3 se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , $-(CH_2)_n-OH$,

15 OR^a , $-O(CH_2)_n-R^a$, $-O(CH_2)_n-R^b$, halo, $-CF_3$, $-OCF_3$, , ,  y  ;

20 R^4 se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilalquilo, $-OR^a$, $-NR^cR^c$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^4$ y $-C(O)NR^cR^c$;

R^5 es hidrógeno, halo, $-CN$, $-NO_2$, CO_2R_a o $-CF_3$;

cada n es independientemente un número entero de 1 a 3;

cada R^1 se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} y cicloalquilo C_{3-6} ;

25 cada R^b se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por $-OR^a$, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-NR^cR^c$, $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)NR^cR^c$ y $-C(O)NR^aR^d$;

cada R^c se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo inferior, o, alternativamente, dos sustituyentes R^c pueden considerarse junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo saturado de 5 a 7 elementos que comprende opcionalmente de 1 a 2 grupos heteroatómicos adicionales seleccionados de entre O, NR^a , $NR^a-C(O)R^a$, $NR^a-C(O)OR^a$ y $NR^a-C(O)NR^a$; y

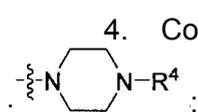
cada R^d es independientemente monohidroxialquilo C_{1-6} o dihidroxialquilo C_{1-6} .

2. Compuesto según la reivindicación 1, que contiene aproximadamente el 60% o más del diastereoisómero de fórmula estructural (Ia),

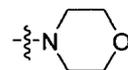
o que contiene aproximadamente el 90% o más del diastereoisómero de fórmula estructural (Ia),

o que contiene aproximadamente el 99% o más del diastereoisómero de fórmula estructural (Ia).

5 3. Compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R⁵ es flúor.



4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es hidrógeno; R² es



o

y R³ es hidrógeno, metilo, metoxi, trifluorometilo o cloro; y

R⁴ es metilo, -C(O)CH₃, -C(O)OCH₃ o -C(O)OCH₂CH₃.

10 5. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es hidrógeno; R² es hidrógeno, metilo, metoxi, trifluorometilo o cloro; y

R⁴ es metilo, -C(O)CH₃, -C(O)OCH₃ o -C(O)OCH₂CH₃.

6. Compuesto según la reivindicación 1,

en el que R¹ es hidrógeno; R² es



15 R⁴ es metilo; y R³ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, metilo, cloro y -CF₃, y R⁵ es flúor.

7. Compuesto según la reivindicación 1, el cual es N4-(3-aminocarbonilbiciclo-[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina.

20 8. Compuesto según la reivindicación 7, que contiene el 95% o más del diastereoisómero (1R, 2R, 3S, 4S).

9. Compuesto según la reivindicación 1, el cual es (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonilbiciclo-[2.2.1]hept-5-en-2-il)-5-fluoro-N2-[3-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-2,4-pirimidindiamina pura.

25 10. Compuesto según la reivindicación 8, que está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

30 11. Compuesto según la reivindicación 10, en el que la sal es de un ácido orgánico que se selecciona de entre ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanpropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 1,2-etandisulfónico, ácido 2-hidroxi-etansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-clorobencensulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido camforsulfónico, ácido 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido tert-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico y ácido mucónico.

35 12. Composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y un vehículo, excipiente y/o diluyente, donde opcionalmente el vehículo, excipiente y/o diluyente es aceptable para utilizaciones farmacéuticas.

40 13. Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, eficaz para inhibir su proliferación, donde opcionalmente la célula es una célula tumoral, donde opcionalmente la célula tumoral es una célula de tumor pulmonar, de colon, de mama, gástrico, de ovario, cervical, melanoma, renal, de próstata, leucemia, linfoma, neuroblastoma, pancreático, de vejiga o hepático.

45

14. Método de inhibición *in vitro* de una actividad de una Aurora cinasa que comprende poner en contacto la Aurora cinasa con una cantidad de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, eficaz para inhibir su actividad, siendo realizado opcionalmente *in vitro* donde la Aurora cinasa está aislada o parcialmente aislada, o siendo realizado dicho método *in vitro* con una célula que expresa una Aurora cinasa.
15. Método de inhibición de un proceso mediado por Aurora cinasa, que comprende poner en contacto *in vitro* una célula que expresa una Aurora cinasa con una cantidad de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, eficaz para inhibir el proceso mediado por Aurora cinasa, opcionalmente en el que el proceso inhibido mediado por Aurora cinasa es la mitosis, o en el que la célula es una célula tumoral, en el que la célula se pone en contacto con una concentración del compuesto que es igual o superior a su CI_{50} medida en un ensayo *in vitro*.
16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un método para tratar el cáncer en un ser humano que lo necesite, donde el método comprende administrar al ser humano una cantidad de dicho compuesto eficaz para tratar el cáncer.
17. Compuesto según la reivindicación 16, en la que el cáncer es un tumor metastásico.
18. Compuesto según la reivindicación 16, en la que el cáncer se selecciona de entre cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer cervical, melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, linfoma, neuroblastoma, cáncer pancreático, cáncer de vejiga y cáncer de hígado.
19. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 para su uso en un método en el que el compuesto se administra en forma de composición farmacéutica, adaptada para la administración por vía oral o intravenosa a un humano, en el que el compuesto se administra en una cantidad eficaz para conseguir una concentración en el suero que es igual o superior a la CI_{50} del compuesto, medida en un ensayo *in vitro*.

FIG. 1

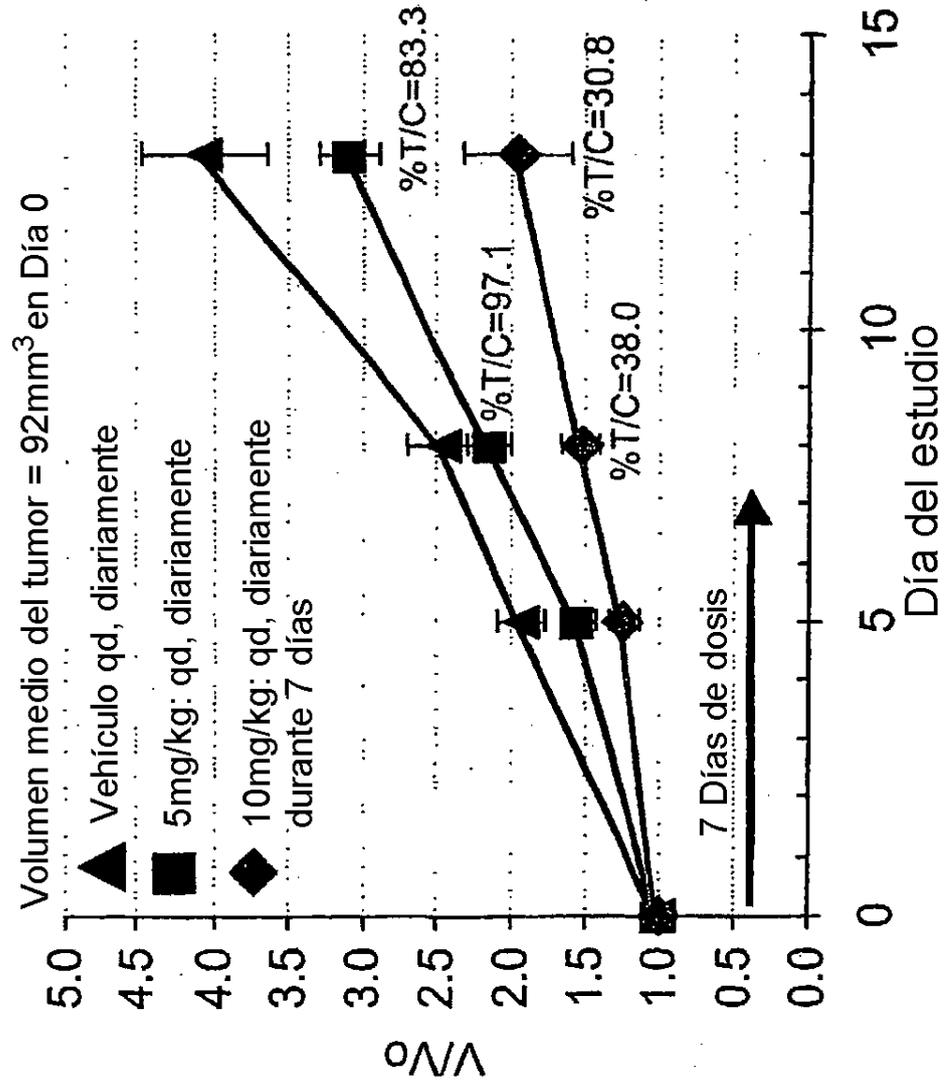


FIG. 2

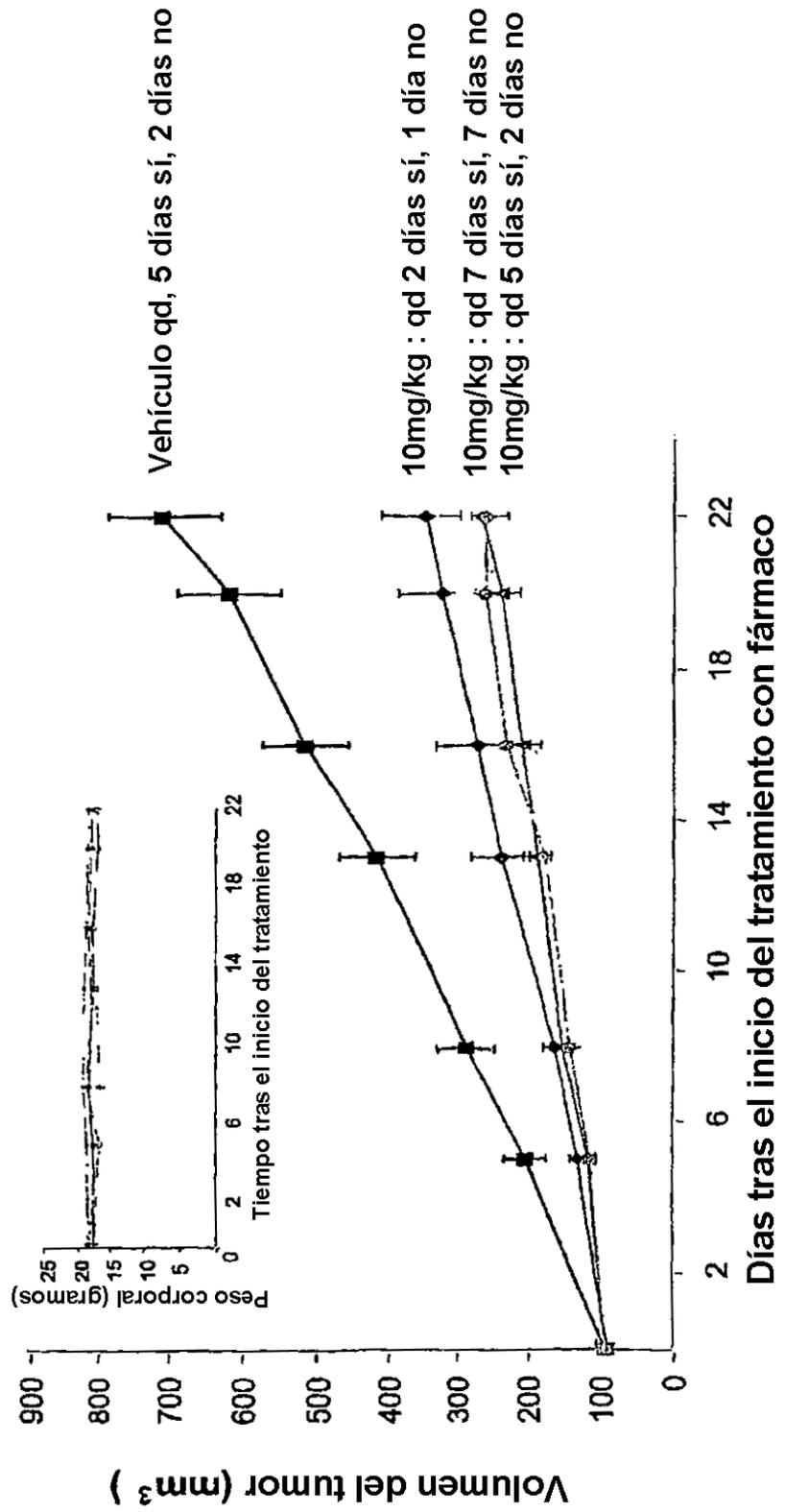


FIG. 3

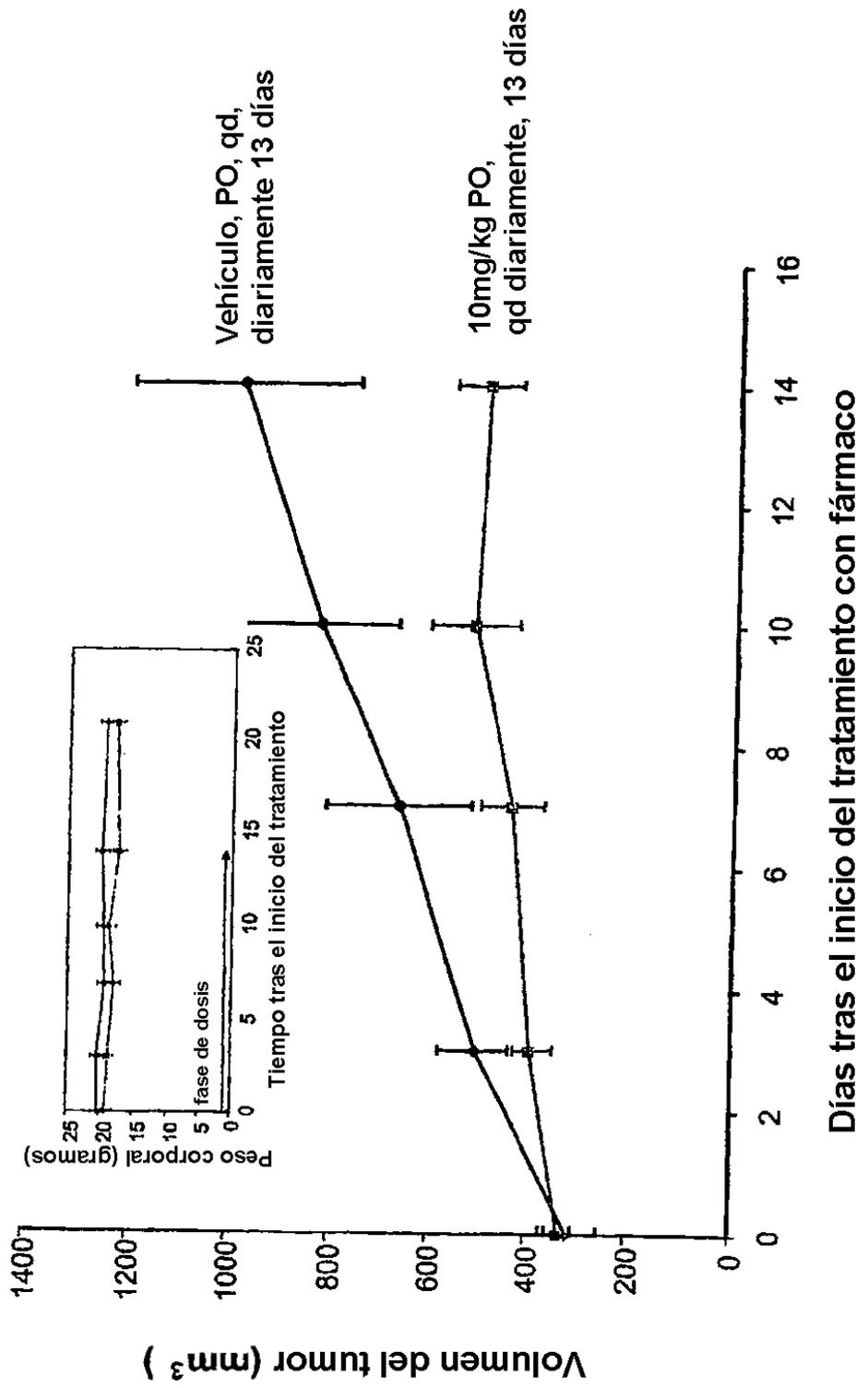


FIG. 4

