

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 451**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2007** **E 12153134 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2497773**

54 Título: **Procedimiento para preparar una 5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepina**

30 Prioridad:

16.11.2006 US 859340 P

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

08.06.2015

73 Titular/es:

MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

CLAIBORNE, CHRISTOPHER F.;
SELLS, TODD B. y
STROUD, STEPHEN G

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 537 451 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

Procedimiento para preparar una 5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepina

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a un procedimiento para preparar ácido 4-([9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino)-2-metoxibenzoico y una sal sódica del mismo. Este es un compuesto que inhibe enzimas Aurora cinasas, y es útil para el tratamiento de cáncer.

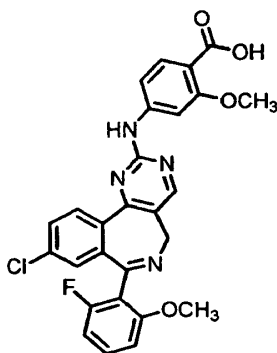
Antecedentes de la invención

- 10 Según la American Cancer Society, se estima que en 2004 se diagnosticó por primera vez cáncer a 1,4 millones de norteamericanos, y aproximadamente 560,000 víctimas murieron de esta enfermedad. Aunque los avances médicos han mejorado las tasas de supervivencia de cáncer, sigue existiendo una necesidad de tratamiento nuevo y más eficaz.

- 15 El cáncer se caracteriza por reproducción celular descontrolada. La mitosis es una etapa en el ciclo celular durante la cual una serie de acontecimientos complejos aseguran la fidelidad de la separación de los cromosomas en dos células hija. Varias terapias de cáncer actuales, incluyendo los taxanos y alcaloides de la vinca, actúan para inhibir la maquinaria mitótica. La progresión mitótica se regula en gran medida por proteólisis y por acontecimientos de fosforilación que están mediados por cinasas mitóticas. Los miembros de la familia de Aurora cinasas (por ejemplo, Aurora A, Aurora B, Aurora C) regulan la progresión mitótica a través de modulación de la separación del centrosoma, dinámica del huso, punto de control de ensamblaje del huso, alineamiento cromosómico y citocinesis (Dutertre et al., Oncogene, 21: 6175 (2002); Berdnik et al., Curr. Biol., 12: 640 (2002)). La sobreexpresión y/o
- 20 amplificación de Aurora cinasas se ha ligado a oncogénesis en varios tipos tumorales, incluyendo los de colon y mama (Warner et al., Mol. Cancer Ther., 2: 589 (2003); Bischoff et al., EMBO, 17: 3062 (1998); Sen et al., Cancer Res., 94: 1320 (2002)). Además, la inhibición de Aurora cinasas en células tumorales da como resultado detención mitótica y apoptosis, lo que sugiere que estas cinasas son dianas importantes para la terapia de cáncer (Ditchfield, J. Cell Biol., 161: 267 (2003); Harrington et al., Nature Med., 1 (2004)). Dado el papel central de la mitosis en la progresión de prácticamente todos los tumores malignos, se espera que los inhibidores de las Aurora cinasas tengan aplicación a lo largo de una amplia serie de tumores humanos. Existe de este modo una necesidad de nuevos inhibidores de Aurora cinasas.

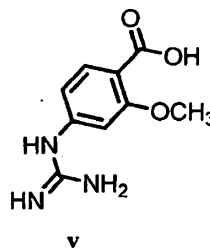
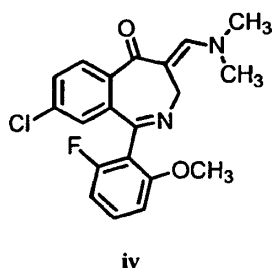
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 30 Claiborne et al., Publicación de Patente Internacional WO 05/111039, describen compuestos de pirimidobenzazepina con actividad inhibidora de Aurora cinasas. Se han descubierto ahora compuestos de pirimidobenzazepina con potencia inesperadamente superior frente a Aurora A cinasa. Los compuestos son útiles para inhibir la actividad de Aurora A cinasa *in vitro* e *in vivo*, y son especialmente útiles para el tratamiento de diversas enfermedades proliferativas celulares.
- 35 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (1):



1

comprendiendo dicho procedimiento hacer reaccionar un compuesto de fórmula (iv) con un compuesto de fórmula (v):



para dar un compuesto de fórmula (1).

En algunas realizaciones, la reacción del compuesto de fórmula (iv) con el compuesto de fórmula (v) se lleva a cabo en presencia de metanol y carbonato potásico.

- 5 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de preparar la sal sódica del compuesto de fórmula (1). En ciertas realizaciones, la sal sódica se prepara haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (1) con hidróxido sódico.

10 En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoato de sodio que comprende hacer reaccionar ácido 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoico con hidróxido sódico.

El compuesto de fórmula (1) también se puede identificar mediante el siguiente nombre químico:

Nombre Químico	
1	ácido 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoico

15 Los compuestos de fórmula (1) son inhibidores de Aurora cinasa. Los compuestos pueden evaluarse *in vitro* o *in vivo* en busca de su capacidad para unirse a y/o inhibir una Aurora cinasa. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos para determinar la inhibición de la capacidad de una Aurora cinasa para fosforilar una proteína o péptido sustrato. Los ensayos *in vitro* alternativos cuantifican la capacidad del compuesto para unirse a una Aurora cinasa. La unión del inhibidor puede medirse radiomarcando el inhibidor antes de unión, aislando el complejo inhibidor/Aurora cinasa y determinado la cantidad de radiomarcador unido. Como alternativa, la unión del inhibidor puede determinarse realizando un experimento de competición en el que se incuban nuevos inhibidores con Aurora cinasa unida a un radioligando conocido. Los compuestos de la invención también pueden ensayarse en busca de su capacidad para afectar a las funciones celulares o fisiológicas mediadas por la actividad de Aurora cinasa. Se describen en los Ejemplos y/o se conocen en la técnica ensayos para cada una de estas actividades.

25 El compuesto de fórmula (1) se puede usar en un método para inhibir la actividad de Aurora cinasas en una célula, que comprende poner en contacto una célula en la que se desea inhibición de Aurora cinasa con el inhibidor de Aurora cinasa de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Preferiblemente, el método provoca una inhibición de la proliferación celular de las células con las que se pone en contacto. La frase "inhibición de la proliferación celular" se usa para indicar una capacidad de un inhibidor de Aurora cinasa para inhibir el número de células o el crecimiento celular en células que entran en contacto en comparación con células que no entran en contacto con el inhibidor. Puede realizarse una evaluación de la proliferación celular contando células usando un contador celular o mediante un ensayo de viabilidad celular, por ejemplo un ensayo BrdU, MTT, XTT o WST. Cuando las células están en un crecimiento sólido (por ejemplo, un tumor sólido u órgano), puede realizarse tal evaluación de la proliferación celular midiendo el crecimiento, por ejemplo con calibres, y comparando el tamaño del crecimiento de células puestas en contacto con células no puestas en contacto.

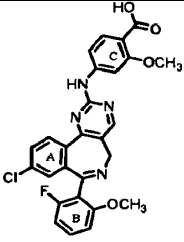
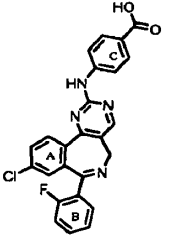
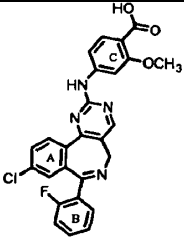
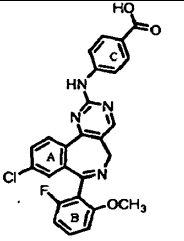
35 Preferiblemente, el crecimiento de células puestas en contacto con el inhibidor se retrasa al menos alrededor de 50% en comparación con el crecimiento de células no puestas en contacto. En diversas realizaciones, la proliferación celular de células puestas en contacto se inhibe en al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 90% o al menos alrededor de 95% en comparación con células no puestas en contacto. En algunas realizaciones, la frase "inhibición de la proliferación celular" incluye una reducción del número de células puestas en contacto, en comparación con células no puestas en contacto. De este modo, un inhibidor de Aurora cinasa que inhibe la proliferación celular en una célula puesta en contacto puede inducir que la célula puesta en contacto experimente retraso del crecimiento, experimente detención del crecimiento, experimente muerte celular programada (es decir, apoptosis), o experimente muerte celular necrótica

45 Se ha descubierto que los compuestos de fórmula (1), que se caracterizan por un sustituyente metoxi en la posición *orto* con respecto al sustituyente de ácido carboxílico en el Anillo C y un sustituyente no de hidrógeno R^b en el Anillo

B, muestran potencia sorprendente en ensayos basados en células cuando se comparan con compuestos estructuralmente similares.

Por ejemplo, la Tabla 1 muestra una comparación del compuesto 1 con los compuestos i, ii y iii descritos en Claiborne et al., Publicación de Patente Internacional WO 05/111039. Los compuestos 1 y i-iii se ensayaron en tres ensayos celulares: (1) ensayo de autofosforilación de Aurora A pT288; (2) ensayo de proliferación celular de BrdU en células HCT116; y (3) ensayo de proliferación celular de BrdU en células SW480. Los protocolos para estos ensayos se conocen en la técnica y se describen en el Ejemplo 6. Los compuestos i y ii mostraron potencia muy similar en los tres ensayos, lo que sugiere que la adición de un sustituyente metoxi en la posición *orto* con respecto al sustituyente de ácido carboxílico en el Anillo C tiene de poco a ningún efecto en la potencia celular. Por el contrario, el compuesto iii mostró potencia significativamente mejorada en los tres ensayos en comparación con el compuesto ii, lo que sugiere que un sustituyente adicional en el Anillo B mejora la potencia. A la vista de estos datos, el hecho de que el compuesto 1 sea más potente que los compuestos i y ii no fue inesperado. Sorprendentemente, sin embargo, el compuesto 1 también muestra un notable aumento de 2 a 4 veces en potencia en comparación con el compuesto iii. Como indican estos datos, la combinación de un sustituyente metoxi en la posición *orto* con respecto al sustituyente de ácido carboxílico y un sustituyente no de hidrógeno R^b en el Anillo B proporciona una mejora inesperada de la potencia.

Tabla 1: Potencia celular de inhibidores de Aurora cinasa

Compuesto	Estructura	pT288 IC ₅₀ (μM)	BrdU HCT116 LD ₅₀ (μM)	BrdU SW480 LD ₅₀ (μM)
1		0,005	0,03	0,41
i		0,18	0,707	6,502
ii		0,15	0,758	7,579
iii		0,018	0,13	0,94

El compuesto 1 también es más potente que el compuesto iii *in vivo*, como se demuestra en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de colon humano HCT116 de ratón (véase Ejemplo 7). Se espera que la potencia *in vivo* mejorada de los compuestos de fórmula (I) dé como resultado un índice terapéutico mejorado con respecto a efectos secundarios fuera de diana.

Un compuesto de fórmula (1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede proporcionar en una composición farmacéutica que también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el compuesto de fórmula (1) se puede formular como la sal de sodio correspondiente.

5 Las composiciones farmacéuticas de compuestos de fórmula (1), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, son particularmente útiles en aplicaciones terapéuticas relacionadas con un trastorno mediado por Aurora cinasa. Como se usa aquí, la expresión “trastorno mediado por Aurora cinasa” incluye cualquier trastorno, enfermedad o afección que está provocado o caracterizado por un aumento de la expresión o actividad de Aurora cinasa, o que requiere actividad de Aurora cinasa. La expresión “trastorno mediado por Aurora cinasa” también incluye cualquier trastorno, enfermedad o afección en el que la inhibición de la actividad de Aurora cinasa sea beneficiosa. Los trastornos mediados por Aurora cinasa incluyen trastornos proliferativos. Los ejemplos no limitantes de trastornos proliferativos incluyen trastornos proliferativos inflamatorios crónicos, por ejemplo psoriasis y artritis reumatoide; trastornos oculares proliferativos, por ejemplo retinopatía diabética; trastornos proliferativos benignos, por ejemplo hemangiomas; y cáncer.

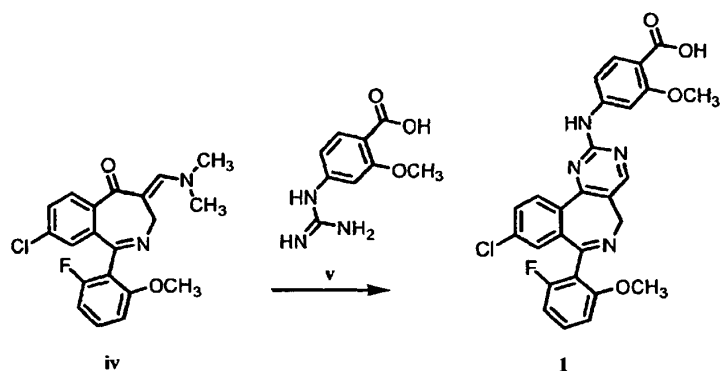
15 Para que esta invención se entienda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos preparatorios y de ensayo. Estos ejemplos ilustran cómo obtener o ensayar compuestos específicos, y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Definiciones

	AcOH	ácido acético
20	ATP	trifosfato de adenosina
	BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
	BSA	seroalbúmina bovina
	DCM	diclorometano
	DMSO	dimetilsulfóxido
25	DTT	ditiotreitól
	EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
	EtOH	etanol
	HPbCD	hidroxipropil beta-ciclodextrina
	MeOH	metanol
30	MTT	metiltiazoltetrazolio
	WST	(sal sódica de 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolol-1,3-benceno disulfonato])
	PKA	proteína cinasa dependiente de cAMP
	THF	tetrahidrofurano
	h	horas
35	min	minutos
	m/z	masa a carga
	MS	espectro de masas
	HRMS	espectro de masas de alta resolución

40 Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de punto de fusión capilar MEL-TEMP II y están sin corregir. Los espectros de RMN ¹H se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 400. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro Waters ZQ 2000 (capilaridad de 3,5 kV, cono de 30 V). El análisis elemental se llevó a cabo por Atlantic Microlab.



Ejemplo 1: Preparación de ácido 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoico (1)

La 8-cloro-4-[(dimetilamino)metileno]-1-(2-fluoro-6-metoxifenil)-3,4-dihidro-5H-2-benzazepin-5-ona (iv) puede prepararse como se describe en Claiborne et al., Publicación de Patente U.S. 2005-256102. El ácido 4-[[amino(imino)metil]amino]-2-metoxibenzoico-HCl (v) puede prepararse de una manera similar a la que se describe en Sugiki et al., Publicación de Patente Internacional WO 01/042199.

Se añadió metanol (50,0 ml) a iv (2,39 g, 6,42 mmoles), v (1,77 g, 7,21 mmoles) y carbonato potásico-1,5[H₂O] (2,65 g, 16,0 mmoles) en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación y un condensador de reflujo. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua (450 ml) y se acidificó hasta pH 1 con HCl 1 N. Se añadió éter dietílico (200 ml), y la mezcla se agitó durante 15 minutos. El precipitado resultante se recogió por filtración y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (NH₄OH:MeOH:DCM, 0,5:5:94,5 a 2:20:78), produciendo la sal de amonio como un sólido bronceado. El sólido se suspendió en agua (100 ml) y, con agitación rápida, se añadió HCl 1N a pH 1. La mezcla se agitó durante aproximadamente 30 minutos, y después se añadieron éter dietílico (50 ml) y acetato de etilo (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. El producto se recogió en un embudo sinterizado (fino), se lavó con agua (50 ml) y éter dietílico (50 ml), y se secó a vacío a 40°C durante una noche, proporcionando 1,65 g (rendimiento del 50%) de ácido 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoico (1). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 12,08 (s, 1H), 10,23 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,95 (s a, 1H), 7,80 (dd, 1H), 7,70 (d, 1H), 7,4-7,35 (m, 2H), 7,21 (s a, 1H), 6,9 (s a, 2H), 4,9 (s a, 1H), 3,9 (s a, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,3 (s a, 3H); MS m/z 519 (M⁺+H, 100%).

Ejemplo 2: Preparación de la forma polimorfa 1 de 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoato sódico

A una suspensión agitada de ácido 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoico (98,0 g, 190 mmoles) en etanol (2,0 l) se le añadió hidróxido sódico 1,044 M en agua (199 ml). La disolución homogénea resultante se agitó durante 1 hora, tiempo durante el cual se formó un precipitado espeso. El producto se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,5 l) y éter dietílico (1,0 l). El sólido resultante se secó a vacío a 60-70°C durante 4 días, proporcionando 88,6 g (86,8%) de 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoato sódico como un sólido bronceado claro, p.f. 225°C (descomp.). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 9,86 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,79 (dd, 1H), 7,60 (s a, 1H), 7,40 (dd, 1H), 7,29 (d, 1H), 7,25-7,15 (m, 2H), 6,9 (s a, 2H), 4,9 (s a, 1H), 3,8 (s a, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,35 (s a, 3H); MS m/z 519 (M⁺-Na+H, 100%); CHN Anál. calc. para C₂₇H₁₉ClFN₄NaO₄·0,33 EtOH·1,3 H₂O: C, 57,33; H, 4,10; N, 9,67. Encontrado: C, 57,14; H, 3,99; N, 9,65.

Ejemplo 3: Preparación de la forma polimorfa 2 de 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoato sódico

Se suspendió la forma polimorfa 1 de 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoato sódico (100 mg) en agua (0,2 ml) y etanol (2 ml) y la mezcla se agitó con calentamiento a 70°C durante 6 horas. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, y el sólido amarillo claro se recogió en un embudo sinterizado y se secó a vacío a 70°C durante 3 días, produciendo 70 mg de la forma polimorfa cristalina 2, p.f. 265°C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 9,86 (s, 1H), 8,60(s, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,79 (dd, 1H), 7,60 (s a, 1H), 7,40 (dd, 1H), 7,29 (d, 1H), 7,25-7,15 (m, 2H), 6,9 (s a, 2H), 4,9 (s a, 1H), 3,8 (s a, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,35 (s a, 3H). MS m/z 519 (M⁺-Na+H, 100%).

Ejemplo 4: Expresión y purificación enzimáticas de proteína cinasas

Expresión y purificación de enzima Aurora A

Aurora A de ratón recombinante con una etiqueta de hexahistidina amino-terminal (His-Aurora A) se expresó usando un vector de baculovirus estándar y sistema de expresión de células de insectos (Bac-to-Bac®, Invitrogen).

5 Aurora A de ratón recombinante soluble se purificó a partir de células de insecto usando Ni-NTA agarosa (Qiagen) como se describe por el fabricante, y se purificó adicionalmente sobre una columna de exclusión por tamaños S75 (Amersham Pharmacia Biotech).

Expresión y purificación de enzima Aurora B

Aurora B de ratón recombinante con una etiqueta de hexahistidina amino-terminal (His-Aurora B) se expresó usando un vector de baculovirus estándar y sistema de expresión de células de insectos (Bac-to-Bac®, Invitrogen).

10 Aurora B de ratón recombinante soluble se purificó a partir de células de insecto usando Ni-NTA agarosa (Qiagen) como se describe por el fabricante.

Ejemplo 5: Ensayos enzimáticos de proteína cinasa

Ensayo de Aurora A DELFIA® Cinasa

15 La reacción enzimática de Aurora A de ratón tuvo un total de 25 µl y contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), MgCl₂ 2,5 mM, Surfact-AMPS-20,5 mM 0,05%, fluoruro sódico 5 mM, DTT, ATP 1 mM, sustrato peptídico 3 µM (Biotin-β-Ala-QTRRKSTGGKAPR-NH₂), y enzima Aurora A murina recombinante 0,5 nM. La mezcla de reacción enzimática, con y sin compuesto de ensayo, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente antes de la terminación con 100 µl de tampón de parada (BSA al 1%, Surfact-AMPS-20 al 0,05% y EDTA 100 mM). Se transfirió un total de 100 µl de la mezcla de reacción enzimática a pocillos de una placa de 96 pocillos revestida con Neutravidina (Pierce), y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado (Tris 25 mM, cloruro sódico 150 mM, y Tween 20 al 0,1%) y se incubó durante 1 hora con 100 µl de mezcla de reacción de anticuerpos que contenía BSA al 1%, Surfact-AMPS-20 al 0,05%, anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-PKA (1:2000, New England Biolabs), e IgG anticonejo marcado con europio (1:2000, Perkin Elmer). Los pocillos se lavaron y después el europio unido se liberó usando 100 µl de Disolución de Potenciación (Perkin Elmer). La cuantificación de europio se realizó usando un Wallac™ EnVision (Perkin Elmer).

25 Ensayo de Aurora B DELFIA® Cinasa

30 La reacción enzimática de Aurora B de ratón con un total de 25 µl contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), MgCl₂ 2,5 mM, Surfact-AMPS-20 al 0,025% (Pierce), Glicerol al 1%, DTT 1 mM, ATP 1 mM, sustrato peptídico 3 µM (Biotin-β-Ala-QTRRKSTGGKAPR-NH₂) y enzima Aurora B murina recombinante 20 nM. La mezcla de reacción enzimática, con o sin compuesto de ensayo, se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente antes de la terminación con 100 µl de tampón de parada (BSA al 1%, Surfact-AMPS-20 al 0,05% y EDTA 100 mM). Se transfirió un total de 100 µl de la mezcla de reacción enzimática a pocillos de una placa de 96 pocillos revestida con Neutravidina (Pierce), y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado (Tris 25 mM, cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0,1%) y se incubó durante 1 hora con 100 µl de mezcla de reacción de anticuerpos que contenía BSA al 1%, Surfact-AMPS-20 al 0,05%, anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-PKA (1:2000, New England Biolabs), e IgG anticonejo marcado con europio (1:2000, Perkin Elmer). Los pocillos se lavaron, y después el europio unido se liberó usando 100 µl de Disolución de Potenciación (Perkin Elmer). La cuantificación de europio se realizó usando un Wallac™ EnVision (Perkin Elmer).

Ejemplo 6: Ensayo celular

Ensayo de autofosforilación de Aurora A de pT288.

40 Se cultivaron células tumorales humanas (HCT-116, obtenidas de ATCC) en placas de 96 pocillos en medio 5A de McCoy complementado con suero de ternero bovino al 10% y L-glutamina 200 nM. Tras la incubación, el medio de crecimiento se reemplazó por 75 µl de medio reciente y se añadieron 25 µl de compuesto de ensayo a las células en diluciones seriadas dos veces en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr concentraciones finales que oscilan de 5 a 0,010 µM. Se añadió compuesto de ensayo a cada dilución como réplicas en 4 filas en la placa, y se añadió DMSO (20 nM) a cada pocillo de dos columnas para los controles no tratados. Las células se trataron con compuesto de ensayo o DMSO durante 60 minutos a 37°C en una cámara de cultivo celular humidificada. Las células se fijaron entonces con paraformaldehído al 4% en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 10 minutos, se permearon con Triton X-100 0,5% en PBS durante 10 minutos, y se lavaron dos veces en PBS.

50 Las células se tiñeron con anticuerpo de conejo Fosfo-Aurora 2/AIK (T288) (1:60) y anticuerpo de ratón MPM2 Anti-fosfo-Ser/Thr-Pro (1:750) seguido de IgG anti-conejo de cabra conjugado con Alexa 488 (1:180) e IgG anti-ratón de pollo conjugado con Alexa 594 (1:180; Molecular Probes). Las células se tiñeron después con IgG anti-cabra de pollo conjugado con Alexa 488 (1:180, Molecular Probes) y Hoechst (1:50.000). Las células se visualizaron usando un Sistema de Captura de Imágenes de Alto Contenido Discovery-1. Se capturaron imágenes de nueve o dieciséis sitios por pocillo a un aumento 200X. La inhibición de Aurora A se determinó midiendo la intensidad fluorescente de

pT288 (autofosforilación de Aurora A) en células inmunopositivas para MPM2 (mitóticas) usando software Metamorph. Se generaron curvas de respuesta frente a la concentración calculando la disminución de la intensidad fluorescente de pT288 en muestras tratadas con compuesto de ensayo en relación con controles tratados con DMSO, y se determinaron los valores de inhibición del crecimiento (IC_{50}) a partir de esas curvas.

- 5 El compuesto 1 mostró un valor de IC_{50} menor o igual a $0,01 \mu M$ en este ensayo.

Ensayo de proliferación celular de BrdU

La proliferación celular de cada estirpe celular se midió usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de proliferación celular, kit colorimétrico de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ensayo mide la proliferación celular cuantificando la incorporación de BrdU en ácido desoxirribonucleico (ADN) replicante. Brevemente, cada pocillo se incubó con $10 \mu l$ de reactivo de marcaje de BrdU durante 2 horas a $37^{\circ}C$ en una cámara de cultivo celular humidificada. Después de la aspiración del medio de marcaje, las células se fijaron y se desnaturalizaron añadiendo $200 \mu l$ de etanol a cada pocillo, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El etanol se aspiró, y se añadieron $100 \mu l$ de anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa (anti-BrdU-POD; 1:100 en tampón de dilución de anticuerpo) a las células. Las células se incubaron con el anticuerpo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron entonces 3x con $250 \mu l$ de tampón de lavado/pocillo y se añadieron $100 \mu l$ de tetrametil-bencidina a cada pocillo. Las células se incubaron durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente antes de análisis espectrofotométrico.

Se usó un lector de placas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunny Vale CA) para medir la absorbancia de cada pocillo a 370 nm. Se generaron curvas de respuesta frente a la concentración calculando la disminución de la densidad óptica en muestras tratadas con compuestos de ensayo en relación con los controles tratados con DMSO.

El compuesto 1 mostró un valor de LD_{50} menor o igual a $0,1 \mu M$ en este ensayo en células HCT 116. El compuesto 1 mostró un valor de LD_{50} menor o igual a $1,0 \mu M$ en este ensayo en células SW480.

Ejemplo 7: Ensayos in vivo

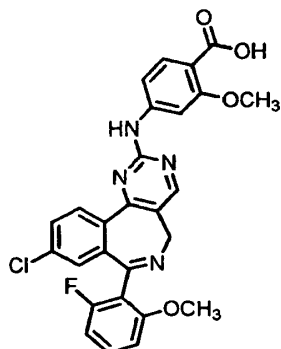
Modelo de eficacia tumoral in vivo

Se inyectaron de forma aséptica células HCT-116 (1×10^6) en medio de McCoy 5A en el espacio subcutáneo en el flanco dorsal derecho de ratones atímicos CD-1 hembra (8 semanas de edad, Charles River) usando una aguja de calibre 23. Se calcularon los volúmenes tumorales usando procedimientos estándar ($0,5 \times (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)$). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 200 mm^3 , se dosificó por vía oral a los ratones compuesto 1 o compuesto iii a diversas dosis en un vehículo de HPbCD 10% + NaHCO_3 1%. Las dosis ($0,1 \text{ ml}$) se administraron mediante aguja de sonda oral de calibre 22. Los animales de control recibieron vehículo solo. Se dosificó a los animales una vez al día durante 21 días, y hubo 10 animales en cada grupo. El tamaño tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana. Los compuestos 1 y iii fueron bien tolerados a todas las dosis en este estudio. A cada dosis, el compuesto 1 produjo retardo de crecimiento tumoral más prolongado [TGD = (tiempo para que los animales tratados alcancen el volumen tumoral medio de 1000 mm^3) - (tiempo para que los animales de control alcancen el volumen tumoral medio de 1000 mm^3)] y mayor inhibición del crecimiento tumoral [TGI = (volumen tumoral medio de los animales de control - volumen tumoral medio de los animales tratados) * $100 /$ (volumen tumoral medio de animales de control)] que el compuesto iii.

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle para los fines de claridad y comprensión, estas realizaciones particulares deben considerarse como ilustrativas y no restrictivas. Se apreciará por un experto en la materia a partir de una lectura de esta descripción que pueden realizarse diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por las realizaciones específicas.

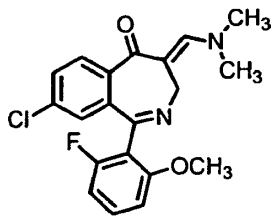
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (1):

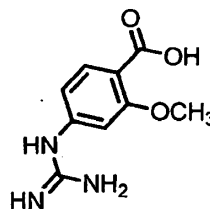


1

5 comprendiendo dicho procedimiento hacer reaccionar un compuesto de fórmula (iv) con un compuesto de fórmula (v):



iv



v

para dar un compuesto de fórmula (1).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la reacción del compuesto de fórmula (iv) con el compuesto de fórmula (v) se lleva a cabo en presencia de metanol y carbonato potásico.

10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de preparar una sal sódica del compuesto de fórmula (1).

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de preparar una sal sódica comprende hacer reaccionar el compuesto de fórmula (1) con hidróxido sódico.

15 5. Un procedimiento para preparar 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoato de sodio, que comprende hacer reaccionar ácido 4-[[9-cloro-7-(2-fluoro-6-metoxifenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-2-metoxibenzoico con hidróxido sódico.