

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 732**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2015 PCT/US2015/059390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16077161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015 E 15798602 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3218366**

54 Título: **Inhibidor de quinasa Aurora A**

30 Prioridad:

14.11.2014 US 201462079742 P

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

14.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HENRY, JAMES ROBERT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 716 732 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).

DESCRIPCION

Inhibidor de quinasa Aurora A

La presente invención se refiere a un compuesto de aminopiridina, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, que inhibe la Aurora A y puede ser útil para el tratamiento del cáncer.

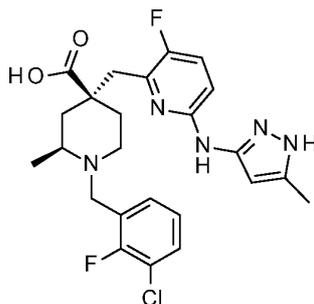
- 5 Las quinazas Aurora son una familia de quinazas serina/treonina y son reguladoras clave de la mitosis. Existen tres homólogos humanos de las quinazas Aurora, A, B, y C, de las cuales a la Aurora A se la ha implicado en cánceres de origen histológico diverso y puede poseer propiedades oncogénicas cuando está sobreexpresada.

10 La inestabilidad aneuploide o genómica es una de las señales más prevalentes del cáncer. Más particularmente, la endo-replicación inducida por la inhibición de la Aurora B y subsiguiente poliploidia es una de las vías principales para la inestabilidad genómica. Además, el fenotipo endo-reduplicación/poliploidia del ADN puede persistir durante múltiples divisiones celulares sin matar completamente las células cancerosas. Como alternativa, la inhibición selectiva de la Aurora A conduce al paro mitótico en muchas células cancerosas. El paro mitótico además frecuentemente progresa hacia la apoptosis o muerte de las células cancerosas, lo cual es un atributo mucho más deseable para un medicamento canceroso que la endo-reduplicación/poliploidia del ADN por inhibidores de la Aurora B o de la Aurora A/B dual. Adicionalmente, en el desarrollo clínico se han reportado ciertos inhibidores de la Aurora B e inhibidores de la Aurora A/B dual como que presentan neutropenia y citotoxicidad de la medula ósea en pacientes, en tanto que ciertos inhibidores relativamente selectivos de la Aurora A no muestran estos trastornos en el desarrollo clínico. Por ello, es deseable inhibir de manera selectiva la Aurora A y reducir o evitar la inhibición de la Aurora A o la Aurora A/B dual. Como tal, la inhibición selectiva de la Aurora A puede ser útil para la terapia del cáncer.

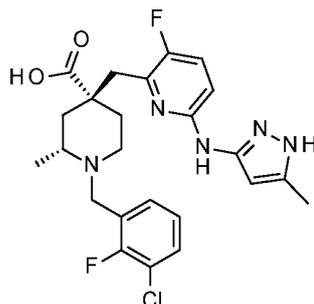
20 Los inhibidores de la Aurora A son conocidos en la técnica. Las Patentes WO 2008/026768, EP 2062887 y la WO 2009/104802 divulgan ciertos compuestos de aminopiridina que tienen acción inhibitoria selectiva de la Aurora A. La Patente WO 2013/129443 divulga ciertos compuestos de piperidina que tienen actividad inhibitoria selectiva de la Aurora A.

25 Persiste una necesidad de proporcionar inhibidores de la Aurora A alternativos para el tratamiento del cáncer. Igualmente, persiste una necesidad de proporcionar inhibidores de la Aurora A selectivos que reduzcan o eviten la inhibición de la Aurora B o la Aurora A/B dual. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona ciertos inhibidores de la Aurora A que pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, la presente invención proporciona ciertos inhibidores de la Aurora A selectivos que pueden reducir la inhibición de la Aurora B o la Aurora A/B dual.

30 La presente invención proporciona un compuesto que está seleccionado entre el grupo que consiste en ácido (2S,4S)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:

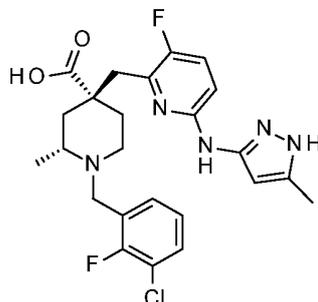


35 y ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

Más preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto que es ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

- 5 Como una realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico.

Como una realización particular, la presente invención proporciona también un compuesto que es ácido (2S,4S)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico.

- 10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, y un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, y un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 15

- La presente invención proporciona ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para su uso en terapia. La presente invención proporciona ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, comprendiendo la composición farmacéutica ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
- 20

- La presente invención proporciona también ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico para su uso en terapia. La presente invención proporciona ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico para su uso en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, comprendiendo la composición farmacéutica ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico.
- 25
- 30

- La presente invención proporciona el uso de ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona igualmente el uso de ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 35

- La presente invención proporciona la sal *terc*-butilamina del ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico en una forma cristalina. La presente invención proporciona también la sal *terc*-butilamina del ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, en una forma cristalina caracterizada por un diagrama de difracción de polvo por rayos X que tiene picos característicos, en $2\theta \pm 0,2^\circ$, que se presentan a los $17,0^\circ$ en combinación con uno o más picos seleccionados entre el grupo que consiste en $11,5^\circ$, $23,2^\circ$, y $15,0^\circ$.
- 40

- La presente invención proporciona la sal de amonio del ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico en una forma cristalina. La presente invención proporciona también la sal de amonio del ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, en una forma cristalina caracterizada por un diagrama de difracción de polvo por rayos X que tiene picos característicos, en $2\theta \pm 0,2^\circ$, que se presentan a los $4,6^\circ$ en combinación con uno o más picos seleccionados entre el grupo que consiste en $13,8^\circ$, $17,2^\circ$, y $15,9^\circ$.
- 45

Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de los procedimientos y usos tal como se describen en la misma, en las cuales el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón de célula no pequeña, y linfoma no Hodgking. Los cánceres preferidos son cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de próstata, cáncer de mama triple negativo, cáncer cervical, y cáncer de cabeza y cuello.

La presente invención proporciona también el ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para su uso en administración simultánea, separada o secuencial en combinación con uno o más agentes de quimioterapia en el tratamiento del cáncer.

Tal como se usa anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, los términos siguientes, salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que tienen los significados siguientes:

Un “vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente” es un medio generalmente aceptado en la técnica para el suministro de agentes activos biológicamente a mamíferos, por ejemplo, humanos.

“Sales aceptables farmacéuticamente” o “una sal aceptable farmacéuticamente” se refiere a la sal o sales inorgánica y orgánica relativamente no tóxica, del compuesto de la presente invención.

“Cantidad eficaz” significa la cantidad del compuesto, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de la presente invención o composición farmacéutica que contiene un compuesto, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de la presente invención que provoca la respuesta biológica o médica o el efecto terapéutico deseado sobre un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico clínico.

Los términos “tratamiento”, “tratar” o “para el tratamiento” y similares, se entiende que incluyen el retraso o reversión de la progresión de un trastorno. Estos términos incluyen el alivio, mejora, atenuación, eliminación, o reducción de de uno o más síntomas de un trastorno o estado, incluso si el trastorno o estado no está realmente eliminado o incluso si la progresión del trastorno o estado no está por sí mismo retrasado o revertido.

El compuesto de la presente invención es capaz de reacción, por ejemplo, con un cierto número de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas para formar sales aceptables farmacéuticamente. Dichas sales aceptables farmacéuticamente y la metodología común para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P.Sthal, y otros, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, y otros, “Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, No. 1, January 1977.

El compuesto de la presente invención está preferiblemente formulado como una composición farmacéutica que usa un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente y administrado por una diversidad de vías. Preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).

La cantidad del compuesto de la presente invención realmente administrada estará determinada por un médico bajo las circunstancias relevantes, incluyendo el estado a tratar, la vía elegida de administración, el compuesto real de la presente invención administrado, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones por día normalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 mg. En algunos casos, niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado pueden ser más adecuados, en tanto que en otros casos pueden usarse dosis aún mayores. Los niveles de dosificación pueden ser determinados por un experto en la técnica.

El compuesto de la presente invención, o sales aceptables farmacéuticamente del mismo, pueden prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, así como los descritos en las Preparaciones y Ejemplos más adelante. Las etapas de síntesis específicas para cada uno de los caminos descritos pueden combinarse en vías diferentes para preparar los compuestos de la invención, o sales aceptables farmacéuticamente de los mismos.

Los reactivos y materiales de partida se encuentran generalmente fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica. Otros pueden hacerse mediante técnicas convencionales de química orgánica y heterocíclica, cuyas técnicas son conocidas para un experto normal en la técnica, y los procedimientos descritos en los Ejemplos que siguen, incluyendo cualquier nuevo procedimiento. Las preparaciones y Ejemplos que siguen ilustran adicionalmente la invención. Salvo que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente invención están nombrados y numerados usando el Accelrys Draw 4.1.

Los isómeros, enantiómeros o diastereómeros individuales pueden ser separados o resueltos por un experto normal en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis de los compuestos mediante procedimientos tales como

técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, Enantiomers, Racemates, and Resolutions (J. Jacques, y otros, John Wiley and Sons, Inc., 1981)).

5 El técnico experto comprenderá que el compuesto de la presente invención contiene al menos un centro quiral. Más particularmente, el compuesto de la presente invención contiene dos centros quirales. La presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos incluyendo racematos. Se prefiere que el compuesto de la presente invención exista como un enantiómero o diastereómero individual. El enantiómero o diastereómero individual pueden prepararse empezando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Como alternativa, el enantiómero o diastereómero individual puede aislarse a partir de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatográficas quirales convencionales.

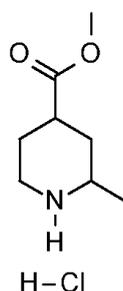
Es también conocido para el técnico experto, que un compuesto con un anillo pirazolilo puede existir en forma de un par de tautómeros en los cuales el hidrógeno puede migrar entre dos nitrógenos sobre el anillo pirazolilo.

15 El compuesto de la presente invención puede prepararse de acuerdo con procedimientos de síntesis bien conocidos y apreciados en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estas reacciones son bien conocidas en la técnica y las substituciones apropiadas de disolventes y co-reactivos entran dentro del conocimiento de la técnica. Igualmente, los expertos en la técnica comprenderán que los compuestos intermedios de síntesis pueden aislarse y/o purificarse mediante diversas técnicas bien conocidas según sea necesario o deseado, y que frecuentemente será posible usar varios compuestos intermedios directamente en etapas de síntesis posteriores con poca o ninguna purificación. Además, el técnico experto comprenderá que, en algunas circunstancias, el orden en el cual se introducen los restos no es crítico. El orden particular de las etapas requeridas para producir el compuesto de la presente invención depende del compuesto particular a sintetizar, del compuesto de partida, y del riesgo relativo de los restos substituidos, tal como es bien conocido por el químico experto. Todos los substituyentes, salvo que se indique lo contrario, son tal como previamente se han definido, y todos los reactivos son bien conocidos y apreciados en la técnica.

25 Tal+ como se usa en la presente invención, los términos siguientes tienen los significados indicados: "ADP" se refiere a adenosina 5'-difosfato; "ATP" se refiere a adenosina 5-trifosfato; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "ADN" se refiere a ácido desoxiribonucleico; "DMSO" se refiere a dimetil sulfóxido; "DTT" se refiere a ditioneitol; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "EGTA" se refiere a ácido etileno glicol tetraacético; "FBS" se refiere a albúmina de suero fetal; "IVTI" se refiere a inhibición del sitio diana *in vivo*; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperacino-1-etanosulfónico; "MEM" se refiere a medio esencial mínimo; "MS" se refiere a espectroscopia de masa; "RMN" se refiere a resonancia magnética nuclear; "PBS" se refiere a solución salina tamponada; "MSR" se refiere a relación significativa mínima; "PMSF" se refiere a fluoruro de fenilmetilsulfonilo, "PNPP" se refiere a sal disódica de fosfato de 4-nitrofenilo hexahidrato; "kPa" kilo Pascal; "SCLC" se refiere a cáncer de pulmón de célula pequeña; "TAME" se refiere a hidrocloreto de N-alfa-4-tosil-L-arginina metil éster; "TED" se refiere a dosis eficaz umbral; "TPCK" se refiere a tosil fenilalanil clorometil cetona.

Preparación 1

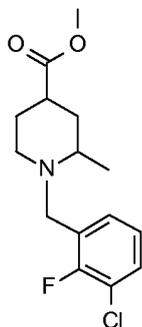
Hidrocloreto de 2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo



40 Cargar PtO₂ (11,5 g) a un recipiente de reacción. A continuación, purgar el recipiente con N₂ y mojarlo con ácido acético (225 ml). Agregar 2-cloro-6-metil-piridino-4-carboxilato de metilo (125 g) y ácido acético (100 ml) a la suspensión. Sellar el recipiente de reacción, purgarlo con N₂, y a continuación purgarlo con H₂ y presurizarlo con H₂. Calentar la mezcla de reacción a 60°C bajo 414 kPa de hidrógeno durante 7 horas. Realizar dos reacciones separadas bajo la misma escala e iguales condiciones. Filtrar la mezcla de reacción de cada reacción y combinar los filtrados. Concentrar los filtrados bajo vacío para proporcionar un aceite espeso conteniendo algo de ácido acético. Agregar metil terc-butil éter (2 litros) al aceite espeso y agitar a temperatura ambiente. Recoger los sólidos resultantes, lavar con metil terc-butil éter (2 x 1000 ml) y secar bajo vacío a 35°C, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco (400 g). ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,55 (d, J=6,3 Hz, 3H); 1,85 (q, J=12,3 Hz, 1H); 2,23-1,98 (m, 3H); 2,59-2,46 (m, 1H); 2,85 (dt, J=13,0, 3,5 Hz, 1H); 3,2'-3,06 (m, 1H); 3,53 (d ancho, J=12,6 Hz, 1H); 3,69 (s, 3H); 9,7 (s ancho, 1H).

Preparación 2

1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo

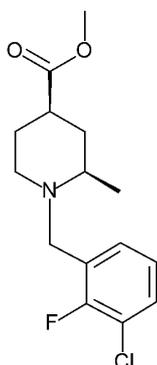


5 Agregar hidrocloreto de 2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo (205,4 g, 1,06 mol), 1-(bromometil)-3-cloro-2-fluorobenceno (261 g, 1,17 mol), acetonitrilo (2050 ml) y carbonato potásico (293 g, 2,12 mol) en un matraz de fondo redondo de tres bocas (1 litro). Agitar la mezcla de reacción a reflujo durante 18 horas. A continuación, interrumpir el calentamiento, filtrar los sólidos, y a continuación lavar los sólidos con acetonitrilo (2 x 250 ml). Concentrar el filtrado bajo vacío para obtener un producto bruto de color verde. Disolver en metil terc-butil éter (2500 ml), agregar CELI-TE®, agitar, y a continuación filtrar. Lavar el filtrado con agua. Extraer los componentes orgánicos con ácido clorhídrico acuoso 1,25 N (2000 ml), a continuación con ácido clorhídrico acuoso 1 M (1000 ml). Combinar los extractos acuosos y basificar a pH ~ 12 con hidróxido sódico acuoso al 48% (250 g). Extraer con metil terc-butil éter (3 litros). Secar los compuestos orgánicos sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar, para obtener el compuesto del epígrafe en forma de un aceite de color pardo (272,8 g). MS (m/z): 300 (M+1).

10

Preparación 3

15 (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo

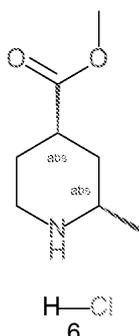


Separar los enantiómeros de 1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo (272,8 g) usando cromatografía quiral fluida supercrítica. Fase estacionaria: Chiralpak IC, fase móvil: 3% de alcohol isopropílico y 0,2% de dimetiletilamina. Recoger el primer enantiómero eluido ($R_T = 1,73$ min). Recoger el segundo enantiómero eluido como el compuesto del epígrafe (158 g, 49,7% de rendimiento; $R_T = 2,19$ min; MS m/z: 300 (M+1)). Condiciones analíticas: Fase estacionaria: Chiralpak IC, fase móvil: 5% de alcohol isopropílico/0,2% de isopropil amina, flujo 3 ml/min, temperatura 35°C.

20

Preparación 4

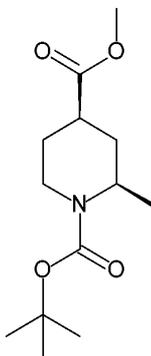
Hidrocloreto de (2R,4R)-2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo



5 Agregar (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo (250 g, 0,834 mol), 1,2-dicloroetano (1200 ml) y cloroformiato de 1-cloroetilo (112 ml, 1,04 mol) a un matraz de tres bocas de 4000 ml. Agitar a 70°C con un agitador magnético durante 72 horas. Agregar cloroformiato de 1-cloroetilo (30 ml, 0,227 ml) y agitar a reflujo durante 6 horas. Dejar enfriar la mezcla a 60°C y, mediante un embudo de adición, agregar metanol (250 ml) durante 30-45 minutos. Agitar a 60-65°C durante 18 horas. Agregar metanol (400 ml) y agitar a 65-68°C durante 5 horas. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Concentrar bajo vacío hasta una suspensión. Diluir la suspensión con acetato de etilo (1500 ml) y agitar a 0°C durante 30 minutos. Recoger los sólidos y lavar con acetato de etilo (1000 ml), para obtener el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color gris (136,5 g, 84, % de rendimiento). ¹H-RMN (398,81 MHz, d₆-DMSO): δ 1,22 (d, J= 6,5 Hz, 3H), 1,53-1,43 (m, 1H), 1,73-1,62 (m, 1H), 1,99-1,91 (m, 2H), 2,71-2,63 (m, 1H), 2,89-2,83 (m, 1H), 3,15-3,12 (m, 1H), 3,23-3,20 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 9,03 (s ancho, 1H), 9,44 (s ancho, 1H).

Preparación 5

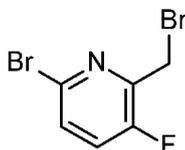
(2R,4R)-2-metilpiperidino-1,4-dicarboxilato de O1-terc-butil O4-metilo



15 Agregar hidrocloreuro de (2R,4R)-2-metilpiperidino-4-carboxilato de metilo (136 g, 0,702 mol) y diclorometano (1500 ml) a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 4 litros equipado con un agitador en la parte superior. Agregar diisopropiletamina (250 ml) y agitar a temperatura ambiente durante unos pocos minutos. Agregar 4-piridinamina-N,N-dimetilo (9,0 g, 0,74 mol). Enfriar en un baño de hielo/agua. Agregar una solución de dicarbonato de di-terc-butilo (192 g, 0,88 mol) en diclorometano (300 ml) lentamente durante ~30 minutos manteniendo la temperatura entre 5-10°C. Dejar calentar la mezcla a temperatura ambiente y agitar durante una noche. Agregar una solución de ácido oxálico al 10% (2 litros) y agitar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Separar las capas. Lavar los compuestos orgánicos con ácido oxálico al 5% (1 litro). Lavar los compuestos orgánicos con agua, a continuación con NaCl saturado, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar bajo vacío. Disolver en diclorometano (250 ml). Aplicar un tapón de sílice (250 g) humedecido con diclorometano. Eluir con diclorometano (3 litros). Concentrar el filtrado bajo vacío y mantener bajo vacío durante unas pocas horas para obtener el compuesto del epígrafe (146 g, 80,8 de rendimiento) en forma de un aceite de color amarillo pálido. ¹H-RMN (398,80 MHz, CDCl₃): δ 1,05 (d, J= 6,8 Hz, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,76-1,66 (m, 1H), 1,99-1,94 (m, 3H), 2,55 (quinteto, J= 5,8 Hz, 1H), 3,10-3,02 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,85-3,78 (m, 1H), 4,18-4,10 (m, 1H).

Preparación 6

30 6-bromo-2-(bromometil)-3-fluoro-piridina

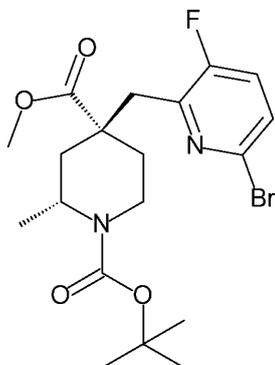


35 Agregar 6-bromo-3-fluoro-2-metil-piridina (50 g, 0,283 mol), N-bromosuccinimida (100 g, 0,562 mol) y tetracloruro de carbono (500 ml) a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 1000 ml equipado con un condensador de reflujo y entrada de nitrógeno. Mientras se agita a temperatura ambiente, agregar 2,2'-azpbis(isobutironitrilo) en porciones. Agitar la reacción durante 72 horas a 78°C. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente y separar por filtración los sólidos. Lavar los sólidos con tolueno (2 x 100 ml). Concentrar el filtrado a ~ 250 ml, diluir con tetrahidrofurano (300 ml) y enfriar a 0-5°C. Bajo una atmósfera de nitrógeno, agregar una solución de fosfito de dietilo (37 ml, 0,288 mol) y trietilamina (40 ml, 0,287 mol) en tetrahidrofurano (100 ml) lentamente durante 30 minutos. Dejar calentar lentamente la mezcla hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Concentrar bajo vacío. Agregar agua fría de hielo 40 y agitar hasta que la mezcla esté a temperatura ambiente. Recoger los sólidos y lavar con agua (2 x 200 ml). Secar los sólidos bajo vacío. Disolver en diclorometano (500 ml) y filtrar a través de un tapón de sílice. Lavar el tapón con diclorometano (250 ml). Concentrar el filtrado bajo vacío, diluir con hexanos (500 ml) y concentrar bajo vacío hasta ~ 100 ml. Recoger los sólidos y lavar con hexanos (100 ml) para obtener el compuesto del epígrafe (48,0 g, 67,8% de

rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. Recoger los sólidos procedentes del licor madre y secar bajo vacío para obtener el compuesto del epígrafe (5,2 g, 7,35% de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. $^1\text{H-RMN}$ (398,80 MHz, CDCl_3): δ 4,51 (d, $J=2,1$ Hz, 2H), 7,31-7,25 (m, 1H), 7,42 (dd, $J=3,5, 8,6$ Hz, 1H).

Preparación 7

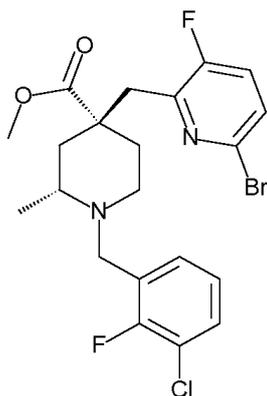
5 (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-fluoro-2-piridil)metil]-2-metilpiperidino-1,4-dicarboxilato de O1-terc-butil O4-metilo



10 Agregar (2R,4R)-2-metilpiperidino-1,4-dicarboxilato de O1-terc-butil-O4-metilo (48,1 g, 0,187 mol) en tetrahidrofurano (470 ml) a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 litros y enfriar la mezcla a -78°C . Agregar diisopropilamida de litio (10% en masa) en hexanos (112,2 ml, 0,224 mol) gota a gota durante 30 minutos manteniendo la temperatura interna por debajo de -71°C . Agitar a -71°C durante 1,5 horas. Agregar una solución de 6-bromo-2-(bromometil)-3-fluoro-piridina (60,4 g, 0,225 mol) en tetrahidrofurano (470 ml) gota a gota durante 1 hora manteniendo la temperatura interna por debajo de -71°C . Agitar a -78°C durante 1 hora. Interrumpir la reacción mediante la adición de una solución de cloruro amónico acuoso saturado (150 ml). Recoger los sólidos resultantes, disolver en agua (500 ml) y extraer con acetato de etilo (1000 ml). Combinar los extractos, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar bajo vacío. Repetir esta reacción con 57,22 g de (2R,4R)-2-metilpiperidino-1,4-dicarboxilato de O1-terc-butil-O4-metilo bajo la misma condición de reacción y combinar los materiales obtenidos para purificación. Purificar el material combinado mediante cromatografía de gel de sílice (gradiente de 5-15% de hexanos/acetato de etilo) para obtener el compuesto del epígrafe (168,2 g) en forma de un aceite de color amarillo claro. $^1\text{H-RMN}$ (398,80 MHz, CDCl_3): δ 0,98 (d, $J=7,1$ Hz, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,76 (dd, $J=6,0, 13,8$ Hz, 1H), 2,02 (s, 2H), 2,23 (dt, $J=13,9, 2,1$ Hz, 1H), 3,09-2,98 (m, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,90-3,87 (m, 1H), 4,40-4,37 (m, 1H), 7,19 (t, $J=8,5, 1\text{H}$), 7,29 (dd, $J=3,4, 8,6, 1\text{H}$).

Preparación 8

(2R,4R)-4-[(6-bromo-3-fluoro-2-piridil)metil]-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxilato de metilo

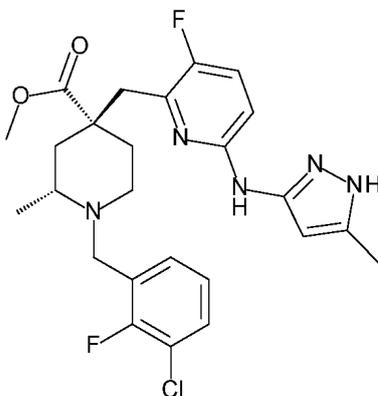


25 Agregar (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-fluoro-2-piridil)metil]-2-metilpiperidino-1,4-dicarboxilato de O1-terc-butil-O4-metilo (168,2 g, 0,378 mol) en 1,4-dioxano (945 ml) a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 4 litros. Agregar lentamente durante 20 minutos ácido clorhídrico (4 M en 475 ml de 1,4-dioxano, 1,9 mol). Agitar a temperatura ambiente durante 21 horas, a continuación a 50°C durante 4 horas. Recoger los sólidos y secar bajo vacío a 45°C durante 1 hora. Concentrar el filtrado hasta un sólido y secar completamente. Agregar los sólidos combinados, carbonato potásico (105 g, 0,76 mol) y acetonitrilo (1200 ml) a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 litros. Agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a continuación agregar bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (101,3 g, 0,453 mol). Agitar a temperatura ambiente durante 3 días. Filtrar la mezcla a través de CELITE®. Concentrar el filtrado hasta un aceite de color amarillo. Purificar mediante cromatografía de gel de sílice (gradiente de 100% de diclorome-

tano a 7% de metil terc-butil éter en diclorometano durante 70 minutos) para obtener el compuesto del epígrafe (153 g, 0,314 mol) en forma de un aceite de color amarillo. MS (m/z): 489 (M+1).

Preparación 9

5 (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxilato de metilo



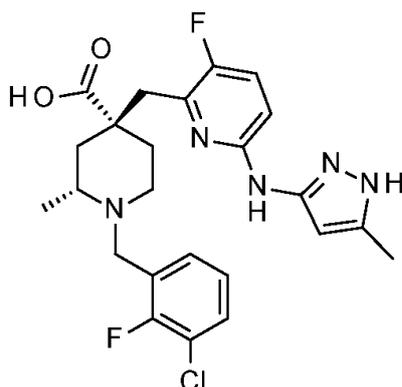
10 Agregar alcohol terc-butílico (9,4 ml) a un recipiente de reacción de microondas y desoxigenar mediante rociado de nitrógeno durante 5 minutos. Agregar acetato de paladio(II) (0,044 g, 0,196 mmol) y 2-di-terc-butil fosfino-2',4',6'-trisisopropilbifenilo (0,251 g, 0,58 mol). Agregar agua (0,014 ml) por debajo de la superficie de la solución. Calentar la mezcla usando un microondas iniciador a 100°C durante 2 minutos. Agregar esta solución de catalizador mediante jeringuilla a la mezcla siguiente.

15 Agregar (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-fluoro-2-piridil)metil]-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxilato de metilo (9,4 g, 0,019 mol), 5-metil-1H-pirazol-3-amina (2,07 g, 0,021 mol) y alcohol terc-butílico (65 ml) a un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 litros. Calentar la mezcla a 40-45°C y rociar con nitrógeno durante 10 minutos. Agregar carbonato de cesio (14,5 g, 0,045 mol) y la solución de catalizador, dispuesta anteriormente, a la mezcla. Agitar a 40-45°C durante 3,5 horas. La reacción no es completa. Preparar una mezcla adicional de acetato de paladio(II) (0,0088 g, 0,039 mmol), 2-di-terc-butilfosfino-2',4',6'-trisisopropilbifenilo (0,050 g, 0,103 mmol), agua (2,8 µl) y alcohol terc-butílico (2 ml). Calentar esta mezcla usando un microondas iniciador a 100°C durante 2 minutos y, a continuación, agregarla a la mezcla de reacción incompleta anterior. Agitar la mezcla de reacción a 40-45°C durante 20 2 horas. Diluir la mezcla con acetato de etilo (100 ml), filtrar a través de un tapón de CELITE® y lavar el tapón con acetato de etilo (100 ml). Concentrar bajo vacío. Repetir la reacción con 129,35 g de (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-fluoro-2-piridil)metil]-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxilato de metilo bajo la misma condición de reacción tal como se ha descrito anteriormente y combinar los materiales brutos para purificación.

25 Combinar los dos productos de reacción brutos. Purificar el material mediante cromatografía de gel de sílice con acetato de etilo al 30% en diclorometano/hexanos 1:1 hasta acetato de etilo al 100%, para obtener 95 g de un sólido de color rosa. Agregar el sólido a un matraz de 4 litros con SILIAMET® THIOL (120 g) y diclorometano (2 litros). Agitar a temperatura ambiente durante una noche. Filtrar la mezcla a través de CELITE®. Concentrar el filtrado hasta sequedad, para obtener el compuesto del epígrafe (93,3 g) en forma de una espuma de color blanco. MS (m/z): 504 (M+1).

30 Ejemplo 1

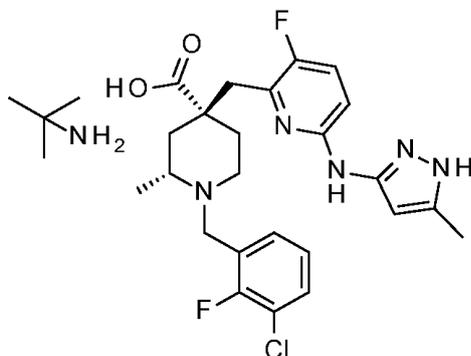
Acido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico



5 Agregar (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxilato de metilo (19,95 g, 0,040 mol), ácido clorhídrico (36,5% en masa) y agua (140 ml, 1,63 mol) a un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 1 litro. Agitar a 93-96°C durante 17 horas. Enfriar a temperatura ambiente y concentrar bajo vacío. Disolver el residuo en agua (1000 ml) y enfriar en un baño de hielo. Ajustar el pH a 6,5 con hidróxido sódico 5 N. Recoger los sólidos resultantes y lavar con agua. Extraer el filtrado acuoso con isopropanol al 10%/diclorometano (3 x 500 ml), Secar y concentrar hasta un sólido. Combinar ambos sólidos y disolver en etanol (200 ml). Diluir con acetato de etilo (1500 ml) y agitar a temperatura ambiente durante una noche. Filtrar y concentrar bajo vacío hasta un sólido. Disolver los sólidos en metanol al 5%/diclorometano, diluir con acetato de etilo (500 ml) y concentrar a 300 ml. Separar por filtración los sólidos. Repetir la reacción con 61,9 g de (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxilato de metilo bajo la misma condición de reacción tal como se ha descrito anteriormente. Combinar los filtrados de ambas reacciones. Concentrar los licores combinados hasta ~ 600 ml y diluir con hexano (600 ml). Recoger los sólidos y secar bajo vacío a 50°C durante una noche. Concentrar los licores madre bajo vacío hasta sequedad y secar los sólidos bajo vacío a 50°C durante una noche. Combinar los sólidos para obtener el compuesto del epígrafe (63,44 g). MS (m/z): 490 (M+1). $[\alpha]_D^{20} +17.3^\circ$ (c 1,00, EtOH).

Ejemplo 2

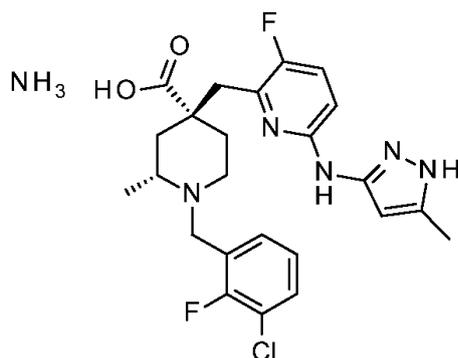
Sal *terc*-butilamina del ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico



20 Agregar ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico (580 mg) en 4 ml de acetona. Disolver el sólido para formar una solución de color amarilla clara mientras se agita a 60°C (temperatura de la placa/1000 rpm). Agregar *terc*-butilamina (150 μ l, 1,20 equivalentes, 99,5%) a la solución y observar la precipitación. Mantener la suspensión de la mezcla durante otros 10 minutos a 60°C y, a continuación, dejarla enfriar a temperatura ambiente. Filtrar el sólido mediante filtración por vacío y secar el sólido en una estufa de vacío a 60°C, para proporcionar el compuesto del epígrafe (635 mg, 95,26% de rendimiento).

Ejemplo 3

30 Sal amónica del ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico



5 Agregar ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluorofenil)metil]-4-[(3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil)metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico (154 mg) en 2 ml de acetona. Disolver el sólido para formar una solución de color amarilla clara mientras se agita a 60°C (temperatura de la placa/1000 rpm). Agregar hidróxido amónico (29,8%, 50 µl, 1,22 equivalentes) a la solución y observar la precipitación. Mantener la suspensión de la mezcla durante otras dos horas a 60°C y, a continuación, dejarla enfriar a temperatura ambiente. Se observa una suspensión espesa de sólido de color blanco brillante. Filtrar el sólido mediante filtración por vacío y secar el sólido en una estufa de vacío a 60°C, para proporcionar el compuesto del epígrafe (145 mg, 90,81% de rendimiento).

Difracción de polvo por rayos X de los Ejemplos 2 y 3

- 10 Los diagramas XRD de los sólidos cristalinos se obtuvieron sobre un difractor de polvo por rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKα de $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ y un detector Vantec, operando a 35 kV y 50 mA. La muestra se escaneó entre 4 y 20° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,009° en 2θ y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/etapa, y con 0,6 mm de divergencia, anti-difusión fijada a 5,28, y rendijas detectoras de 9,5 mm. El polvo seco se empaquetó sobre un soporte de muestras de cuarzo y se obtuvo una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los diagramas de difracción de la forma cristal se recogieron a temperatura y humedad relativa ambiente. Es bien sabido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y hábito del cristal. En los casos en que están presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades de los picos están alteradas, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo permanecen sin cambiar. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, páginas 1843-1844, (1995). Además, es igualmente bien sabido que en la técnica cristalográfica para cualquier forma de cristal dada las posiciones de los picos angulares puede variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a la variación en la temperatura o la humedad a la cual se analiza una muestra, al desplazamiento de la muestra, o la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad en la posición de un pico de $\pm 0,2^\circ$ en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin impedir la identificación inequívoca de la forma del cristal indicada. La confirmación de una forma del cristal puede hacerse en base a cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de $^\circ 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Los diagramas de difracción de la forma del cristal, recogidos a temperatura y humedad relativa ambiente, se ajustaron en base a los picos patrón NIST 675 a 8,853 y 26,774 grados 2-teta.
- 15
- 20
- 25
- 30 Se caracterizó una muestra preparada del Ejemplo 2 mediante un diagrama XRD que usa radiación CuKα que tiene picos de difracción (valores 2-teta) tal como se describen en la Tabla 1 más adelante, y en particular que tiene picos a 17,0° en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 11,5°, 23,2°, y 15,0°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 1: Picos de difracción de polvo por rayos X del Ejemplo 2

Pico	Angulo ($^\circ 2\text{-teta}$) $\pm 0,2^\circ$	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	8,0	24,6
2	11,5	57,1
3	14,0	26,4

Tabla 1 (Cont.)

Pico	Angulo ($^\circ 2\text{-teta}$) $\pm 0,2^\circ$	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
4	15,0	42,3
5	17,0	100,0

35

6	19,3	24,9
7	21,0	37,1
8	23,2	45,1
9	24,0	30,9
10	26,1	23,7

Se caracterizó una muestra preparada del Ejemplo 3 mediante un diagrama XRD que usa radiación CuK α que tiene picos de difracción (valores 2-teta) tal como se describen en la Tabla 2 más adelante, y en particular que tiene picos a 4,6° en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 13,8°, 17,2°, y 15,9°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 2: Picos de difracción de polvo por rayos X del Ejemplo 3

Pico	Angulo (° 2-teta) \pm 0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	4,6	100,0
2	9,3	38,1
3	9,9	26,1
4	10,5	39,4
5	13,8	72,2
6	15,9	62,7
7	17,2	66,6
8	18,5	40,3
9	21,3	52,3
10	28,1	49,8

Estructura del cristal por rayos X de la quinasa Aurora A usando el Ejemplo 3

El dominio catalítico de la quinasa Aurora A (restos 125-391 de la secuencia NP_003591) se expresó en células de insecto *Sf9* con una etiqueta de poli-histidina N-terminal escindible con TEV proteasa. La proteína expresada se aisló mediante unión a una columna de quelación de níquel. Después de la escisión de la etiqueta de histidina, la proteína se purificó adicionalmente pasándola sobre una columna de cromatografía de exclusión por tamaños (16/600 S200; GE Lifesciences) equilibrada en un tampón conteniendo fosfato sódico 50 mM pH 7,0, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, DTT 5mM, y con β , γ -imidoadenosina 5-trifosfato (AMP-PNP) 0,1 mM. La proteína de quinasa Aurora A purificada a una concentración de 8,3 mg/ml se suplementó con AMP-PNP adicional hasta una concentración final de 2 mM, y se cristalizó a 21°C mediante difusión en vapor. La cristalización se llevó a cabo mezclando 0,8 μ l de proteína con 0,8 μ l de solución depósito conteniendo MES 100 mM pH 4,6, PEG 3350 al 23% y sulfato amónico 150 mM, y equilibrándola frente al mismo depósito ubicado en las bandeja de goteo. Durante una noche, se remojó un cristal individual de quinasa Aurora A en el complejo con AMP-PNP en una solución conteniendo 2 mM del Ejemplo 3, y se transfirió a una solución conteniendo Polietileno glicol 400 al 20%, y se ultra-congeló en nitrógeno líquido. Los datos de difracción por rayos X a 1,96 Å se recogieron a partir del cristal congelado en los Lilly Research Laboratories Collaborative Access Team Beam-Line (LRL-CAT APS 311D) en el Advanced Photon Source, Argonne, IL. Se usaron longitudes de ondas de rayos X de 0,9793 Å para recoger 180 imágenes en oscilaciones de 1°, con una distancia del detector de 185 mm. La estructura de la quinasa Aurora A usando el Ejemplo 3 se determinó mediante Reemplazo Molecular y refinó a un factor de R de 20,6% y un libre de R de 25,6%. El resultado es con el Ejemplo 3 y proporciona la estereoquímica. Igualmente, proporciona la estereoquímica para los Ejemplos 1 y 2 puesto que el Ejemplo 1 se usó como material de partida para la preparación de los Ejemplos 2 y 3.

Tabla 3: Coordinadas atómicas del ligando en el complejo resultante del tratamiento de cristales de Aurora A con el Ejemplo 3

ES 2 716 732 T3

ATOMO	X	Y	Z	Factor B
C1	112,063	-22,352	4,479	42,62
C2	112,093	-21,548	5,620	40,92
C3	106,478	-13,876	6,709	30,97
C4	112,494	-21,851	3,250	39,63
C5	106,509	-14,173	5,352	32,26
C6	109,743	-16,303	3,016	23,86
C7	112,557	-20,234	5,530	49,20
C8	107,454	-14,403	7,543	30,71
C9	112,992	-19,735	4,307	46,02
C10	112,961	-20,539	3,170	49,13
C11	108,433	-15,216	6,985	29,52
C12	110,350	-16,658	1,793	21,45
C13	107,527	-15,000	4,893	27,64
C14	108,526	-15,780	2,647	22,41
C15	107,800	-17,220	8,960	40,44
C16	109,027	-18,128	6,966	34,87
C17	110,137	-17,883	9,201	32,43
C18	110,391	-18,481	6,358	28,24
C19	111,482	-18,224	8,537	32,71
C20	109,128	-17,256	8,229	32,98
C21	111,684	-17,267	1,564	24,45
C22	112,398	-18,885	9,578	37,45
C23	112,608	-19,345	6,737	32,82
C24	109,500	-15,812	7,858	33,06
N25	108,492	-15,529	5,670	28,42
N26	108,483	-15,845	1,290	23,85
N27	109,585	-16,379	0,739	22,58
N28	111,302	-19,083	7,346	32,56
N29	107,540	-15,286	3,509	30,18
O30	106,690	-17,266	8,449	39,38
O31	108,001	-17,113	10,295	42,47

Tabla 3 (Cont.)

ATOMO	X	Y	Z	Factor B
F32	107,438	-14,126	8,849	36,03

F33	113,435	-18,468	4,239	56,09
CL34	113,500	-19,908	1,663	70,06

Los resultados de los ensayos siguientes demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 de la presente invención es un inhibidor de Aurora A. Adicionalmente, los resultados de los ensayos siguientes demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 es un inhibidor de Aurora A selectivo que puede reducir la inhibición de Aurora A o Aurora A/B dual. Igualmente, los resultados de los ensayos siguientes demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 induce el paro mitótico del ciclo de la célula mediante la inhibición de la actividad quinasa Aurora A. Adicionalmente, el compuesto del Ejemplo 1 demuestra la inhibición dirigida a la quinasa Aurora A, no a la Aurora B, *in vivo* con muestras de tumor de xenoinjerto, así como eficacia de crecimiento anti-tumor significativa en el modelo de ratón desnudo NCI-H446 de cáncer de pulmón de célula pequeña.

10 Ensayo de quinasa Aurora A

Este ensayo mide la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la actividad quinasa Aurora A *in vitro* mediante la medición de la polarización fluorescente por el TRANSCREENER® ADP en un formato de placa negra de 96 pocillos (CORNING® COSTAR® 3694). Preparar una solución en un tampón quinasa [ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacinoetanosulfónico (HEPES) 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 4mM, TRITON™ X-100 al 0,01% y ditioneitol (DTT) 2 mM] con adenosina trifosfato (ATP) y ciclo de activación de quinasa Aurora A (ENOGEN®, #326861) a unas concentraciones finales de ATP 20 μM y ciclo de activación de quinasa Aurora A 150 μM, respectivamente. La enzima Aurora A se agregó a la solución con una concentración final de 0,096 ng/μl. Los compuestos de ensayo se diluyeron de manera seriada 1:3 en dimetil sulfoxido (DMSO) al 20% para crear una curva de dosis respuesta de 10 puntos a las concentraciones finales partiendo de 20 μM. El tampón DMSO solo sin compuesto de ensayo se usó como control positivo (actividad de Aurora A completa en la ausencia de inhibidor). El control negativo es una mezcla de reacción completa mas 100 nM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para determinar el nivel basal de adenosina 5'-difosfato (ADP). Agregar la solución de enzima Aurora A preparada a la placa que contiene los compuestos de ensayo y los controles positivo y negativo y pre-incubar la mezcla durante 30 minutos a 22°C. La reacción se inició mediante la adición de solución de ATP y de ciclo de activación de quinasa Aurora A y continuó durante 30 minutos a 22°C. A continuación, la reacción se interrumpió mediante la adición de 25 μl (1:1, v/v) de mezcla de detección de ADP conteniendo trazador rojo lejano de ADP, anticuerpo de ADP y el tampón de parada y detección (Bellbrook Labs cat # 3003-10K). Las placas se mantuvieron en la oscuridad durante al menos 2 horas para permitir el desplazamiento del trazador de ADP Alexa633 (unido al anticuerpo ADP2) por el ADP producido en la reacción quinasa, y se determinó la disminución de polarización de fluorescencia (Ultra 384, Tecan). Se usó una curva patrón de ADP/ATP en el tampón quinasa anterior para determinar la conversión de ADP para los compuestos de ensayo.

La diferencia entre el valor de la media de los controles positivos y negativos se tomó como el 100% de actividad. Se usó un ajuste de curva logística de cuatro parámetros para generar los valores de IC₅₀ usando el software ActiBase™ (IDBS, Alameda CA). El ensayo muestra una relación significativa mínima (MSR) de ≤ 3.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 se determinó que tiene un IC₅₀ de 1,12 ± 0,15 nM (n=4). El ensayo bioquímico de Aurora A alcanza el límite de detección inferior del ensayo de manera que el IC₅₀ reportado no puede reflejar la potencia de inhibición del compuesto absoluta *in vitro*; sin embargo, el ensayo por sí mismo está estadísticamente validado de manera que estos datos proporcionan el IC₅₀ que da por resultado lo que el compuesto demuestra en el ensayo. En consecuencia, los resultados muestran que el Ejemplo 1 inhibe la actividad de quinasa Aurora A *in vitro*.

40 Ensayo de quinasa Aurora B

Este ensayo mide la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la actividad quinasa Aurora B *in vitro* mediante la medición de la polarización fluorescente por el TRANSCREENER® ADP en un formato de placa negra de 96 pocillos (CORNING COSTAR 3694). Preparar una solución de enzima Aurora B en un tampón quinasa (HEPES 37,5 mM pH 7,4, MgCl₂ 6,25 mM, TRITON™ X-100 al 0,0075% y DTT 2,5 mM) con enzima Aurora B (concentraciones finales 0,39 ng/μl), péptido INCEP 0,1 μM (GenScript, #92480_1, concentraciones finales 0,1 μM), ATP (concentración final 10 μM), e Histone H3 (Anaspec, #KLH08-4, concentración final 5 μM). Los compuestos de ensayo se diluyeron de manera seriada 1:3 en DMSO al 20% para crear una curva de dosis respuesta de 10 puntos a las concentraciones finales partiendo de 20 μM. El tampón DMSO solo sin compuesto se usó como control positivo (actividad de Aurora B completa en la ausencia de inhibidor). El control negativo es la mezcla de reacción completa mas EDTA 100 nM para determinar el nivel basal de ADP. Agregar la solución de enzima Aurora B preparada a la placa que contiene los compuestos de ensayo y los controles positivo y negativo. Pre-incubar la mezcla durante 30 minutos a 22°C. Se agregaron las soluciones de ATP e Histone H3 anteriores para iniciar la reacción y la placa se incubó durante 45 minutos a 22°C. La reacción se interrumpió mediante la adición de 25 μl (1:1, v/v) de mezcla de detección de ADP conteniendo trazador rojo lejano de ADP, anticuerpo ADP y tampón de parada y detección (Bellbrook Labs cat # 3003-10K). Las placas se mantuvieron en la oscuridad durante al menos 2 horas para permitir el despla-

miento de trazador ADP Alexa633 (unido al anticuerpo ADP2) y se determinó el ADP producido en la reacción quinasa antes de la polarización fluorescente (Ultra 384, Tecan). Se estableció una curva patrón de ADP/ATP en el tampón quinasa descrita anteriormente para determinar la conversión de ADP para el compuesto de ensayo.

5 La diferencia entre el valor de la mediana del control positivo y negativo se tomó como el 100% de actividad. Se usó un ajuste de curva logística de cuatro parámetros para generar los valores de IC₅₀ usando el software ActivityBase™ (IDBS, Alameda CA). El ensayo muestra una relación significativa mínima (MSR) de ≤ 3 .

10 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 se determinó que tiene un IC₅₀ de 1510 \pm 668 nM (n=5). Los resultados muestran que el Ejemplo 1 inhibe la actividad quinasa Aurora B *in vitro* menos de lo que inhibe la actividad quinasa Aurora A *in vitro*.

Ensayo de multiplexado fenotípico basado en células de contenido de histona H3 fosfo-Ser10 y ADN

15 El ensayo mide el paro mitótico inducido por la inhibición de Aurora A. El paro mitótico inducido por la inhibición de Aurora A se midió con el incremento del marcador mitótico histone H3 fosfo-Ser10, el incremento de contenido de ADN 4N (G2/M), y fenotipos de inhibición de la proliferación celular con tratamiento de compuesto de 24 horas usando Acumen Explorer™ (citómetro de microplaca de fluorescencia de escaneado por Laser (TTP LabTech LTD, UK)). Se sembraron células Hela procedentes del American Type Culture Collection (ATCC) a 5000 células/pocillo en placas con poli-D-lisina BD BIOCAT™ de 96 pocillos (Becton Dickinson, catálogo #356640) y se incubaron a 37°C durante 24 horas bajo CO₂ al 5% en medio esencial mínimo (MEM) (es decir, Gibco, catálogo #31095) con suero de albúmina fetal (FBS) al 1% (por ejemplo, Gibco, catálogo # 16000), aminoácidos no esenciales al 1% (por ejemplo, Gibco, catálogo #11140), piruvato sódico al 1% (por ejemplo, Gibco, catálogo #11360) y penicilina-estreptomicina al 1% (por ejemplo, Gibco, catálogo #15140). Las células se trataron mediante la adición de los compuestos de ensayo al medio, dosificando en 10 puntos de diluciones en serie 1:3 a lo largo del intervalo de 20 μ M a 0,001 μ M, y con concentración en DMSO final de 0,25%. Después de 24 horas de exposición a los compuestos, las células se fijaron con PREFER™ (Anatech LTD, catálogo # 414) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se permeabilizaron con TRITON® X-100 al 0,1% en solución de PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS (por ejemplo, Sigma, catálogo #A7030) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo policlonal de conejo anti-histona H3 fosfo-Ser10 primario (Millipore, catálogo # 06-570) a 1:1000 en PBS con BSA al 1% a las células y se incubaron durante una noche a 4°C. Después de dos lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpo secundario marcado IgG anti-conejo de cabra Alexa 488 1:1000 en PBS (Invitrogen catálogo # A11008) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, se agregó una solución conteniendo 10 μ g/ml de yoduro de propidio (Invitrogen, catálogo # P3566) y 50 μ g/ml de Ribonucleasa A (Sigma, catálogo # R-6513) en PBS a núcleos teñidos. Las placas de fluorescencia se escanearon con ACUMEN EXPLORER™ (citómetro de microplaca de fluorescencia de escaneado por Laser (que comprende excitación por láser de iones de argón de 488 nm y detección por tubo fotomultiplicador múltiple, fabricado por TTP LabTech LTD) para medir el contenido en histona H3 fosfo-Ser10 y ADN. El análisis de imágenes se basó en señales de fluorescencia celular para identificar células en diferentes sub-poblaciones. Los resultados del ensayo son porcentajes de inhibición de proliferación de células, porcentaje de células positivas de histona H3 fosfo-Ser10, porcentajes de 2N (contenido de ADN diploide o ciclo celular G1, en donde N se refiere a un complemento único de cromosomas, el contenido de ADN haploide) y el porcentaje de 4N mas >4N (ciclo celular G2/M y posterior) de perfiles de histograma de ADN. Los valores de IC₅₀ y EC₅₀ se determinaron mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado usando ACTIVITY BASE™.

45 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra paro mitótico con EC₅₀ de 108 \pm 15 nM (n=4) para el incremento de histona H3 P-Ser10, EC₅₀ de 108 \pm 27 nM (n=4) para incremento de contenido de ADN 4N, e IC₅₀ de 52,9 \pm 7 nM (n=4) para la inhibición de la proliferación celular, respectivamente.

Ensayo basado en células de inhibición con histona H3 fosfo-Ser10 de Aurora B

50 El ensayo mide la disminución de histona H3 fosfo-Ser10 inducida por la inhibición de Aurora B con una hora de tratamiento con el compuesto de ensayo. Las células NCI-H446 procedentes del American Type Culture Collection (ATCC) se sembraron a 12000 células/pocillo en placas con poli-D-lisina BD BIOCAT™ de 96 pocillos (Becton Dickinson, catálogo # 356640) y se incubaron a 37°C durante 24 horas bajo CO₂ al 5% en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (por ejemplo, Gibco, catálogo # 52400) con adición de FBS al 10% (por ejemplo, Gibco, catálogo # 16000) y penicilina-estreptomicina al 1% (por ejemplo, Gibco, catálogo #15140). Las células se trataron mediante la adición de los compuestos de ensayo al medio, dosificando en 10 puntos de las diluciones en serie 1:3 a lo largo del intervalo de 40 μ M a 0,002 μ M, con concentración en DMSO final de 0,2%. Después de una hora de exposición a los compuestos de ensayo, las células se fijaron con formaldehído al 16% en PBS (concentración final de 4% a partir de la solución madre de solución al 37% de formaldehído, Sigma, catálogo # F1635) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con PBS y se permeabilizaron con metanol frío durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron una vez con TRITON® X-100 al 0,1% en solución de PBS, dos veces con PBS y se bloquearon leche desnatada al 3% en PBS (Difco, catálogo # 232100) durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo policlonal de conejo anti-histona H3 fosfo-Ser10 primario (Millipore, catálogo # 06-570) a 1:1000 en leche desnatada al 3% en PBS a las células y se incubaron durante una noche a 4°C. Después de lavadas una vez con TRITON® X-100 al 0,1% en solución de PBS y dos veces con PBS, las células se incubaron con anticuerpo secundario marcado IgG anti-conejo de cabra Alexa 488 1:1000 en PBS (Invitrogen catálogo # A11008) durante una hora a temperatura ambiente. Después de dos lavados mas con PBS, se agregó una solución conteniendo 10 µg/ml de yoduro de propidio (Invitrogen, catálogo # P3566) y 50 µg/ml de Ribonucleasa A (Sigma, catálogo # R-6513) en PBS a núcleos teñidos. Las placas de fluorescencia se escanearon con ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de microplaca de fluorescencia de escaneado por Laser (que comprende excitación por láser de iones de argón de 488 nm y detección por tubo fotomultiplicador múltiple, fabricado por TTP LabTech LTD) para medir la fosforilación de proteína H3 y contenido de ADN. El análisis de imágenes se basó en señales de fluorescencia celular para identificar células en diferentes sub-poblaciones. El resultado del ensayo es el porcentaje de células positivas de histona H3 fosfo-Ser10. Los valores de IC₅₀ se determinaron mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado usando el Genedata Screener®.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC₅₀ de inhibición de Aurora B de 1467 ± 456 nM (n=4). Tomado conjuntamente con los datos del ensayo basado en células de fósforo-Thr288 MSD en Aurora A, proporcionado en la presente invención más abajo, el Ejemplo 1 muestra selectividad por Aurora A frente a Aurora B.

Preparación de lisados de células y extracción de histona

Este es el protocolo para preparar los sobrenadantes de lisados de células a usar para el ensayo de inhibición de fosforilación de Aurora A mediante ELISA Meso Scales Discovery (MSD). El lisado de células de cáncer de pulmón de célula pequeña SCLC H446 se preparó de acuerdo con las especificaciones del fabricante MSD (http://www.meso-scale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Phospho_Aurora_A_Thr288_WCL.pdf) usando tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,5; 10 µg/ml de leupeptina; 10 µg/ml de tripsina-quimotripsina; 10 µg/ml de tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK); 10 µg/ml de aprotinina; β-glicerofosfato 60 mM; Triton X-100 al 1%; pirofosfato sódico (Na₂H₂P₂O₇) 2,5 mM; NaCl 150 mM; EDTA 15 mM; ácido etilenoglicoltetraacético (EGTA) 5 mM; hidrocloreuro de N-alfa-4-tosil-L-arginina metil éster (TAME) 2 mM; sal disódica de 4-nitrofenil fosfato hexahidrato (PNPP) 15 mM; benzamidina 5 mM; vanadato sódico 1 mM; fluoruro sódico 10 mM; 50 µg/ml de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF); DTT 1 mM; ácido okadaico 1 µM; microcistina 1 µM). La concentración de proteína sobrenadante se midió mediante el ensayo DC-Protein de BioRad (BioRad, catálogo # 500-0111) y para el ensayo de fósforo-Thr288 MSD en Aurora A se usaron 25 µl de 1 mg/ml de lisado de célula.

Ensayo basado en células de fósforo-Thr288 MSD en Aurora A

El propósito del ensayo es medir la actividad de inhibición de la quinasa Aurora A en cultivo celular. El ensayo se realizó usando placas ELISA Meso Scale Discovery (MSD) de 96 cavidades (kit de lisado de célula entera JCD # K150, Meso Scale Discovery, MD).

Se bloqueó una placa MULTI-SPOT® Phospho-Aurora A Singleplex con 150 µl/pocillo de solución A de bloqueo (concentración final 3% de BSA). Agitar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora y lavar con tampón TrisWash de MSD tres veces. Dispensar 25 µl de 1 mg/ml de lisados de células dentro de la placa MULTI-SPOT® Phospho-Aurora de MSD. Incubar la mezcla durante un tiempo adicional de 3 horas a temperatura ambiente y lavar la mezcla con tampón TrisWash de MSD tres veces. El anticuerpo de detección (SULFO-TAGTM anti-Aurora A Phospho-T288) se diluyó 50x en tampón de dilución de anticuerpo BSA al 1% (1 parte de BSA al 3% con 2 partes de tampón de lavado de MSD; 0,02% de bloqueador D-R), y se agregaron 25 µl/pocillo dentro de la placa con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con tampón TrisWash de MSD antes de agregar 150 µl/pocillo de 2X tampón de lectura T de MSD dentro de la placa y las placas se leyeron en un instrumento MSD SECTOR M Imager 6000. El porcentaje de inhibición se definió como [(100-(valor MSD-valor de inhibición máximo MSD))/(valor de inhibición mínimo MSD-valor de inhibición máximo MSD)]*100. El "máximo" y "mínimo" se definieron por compuesto de control positivo 2 µM Alisertib frente al control negativo DMSO solo.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra inhibición a Aurora A con tratamiento de compuesto de 1 hora en la célula con un IC₅₀ a 1,4 ± 1,1 nM (n=2). Los datos muestran que el Ejemplo 1 demuestra actividad de inhibición quinasa Aurora A en cultivo celular.

Preparación de lisado de proteína de tumor y extracción de histona

Este es el protocolo para preparar lisados de tumor de xenoinjerto y extracto de histona usado en los ensayos de inhibición del sitio diana *in vivo* (IVTI) siguientes. Las muestras de tumor se enfriaron en nitrógeno líquido y se colocaron sobre hojas y el mortero y el pistilo sobre un recipiente con hielo seco. Las muestras de tejido de tumor se molieron con el pistilo y los tejidos de tumor pulverizados se transfirieron a un tubo conteniendo esférulas Lysing Matrix D (catálogo #6913-500; Biomedicals MP Lysing Matrix D) y 0,6 µl de tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,5; 10 µg/ml de leupeptina; 10 µg/ml de tripsina-quimotripsina; 10 µg/ml de TPCK; 10 µg/ml de aprotinina; β-glicerofosfato 60 mM; Triton X-100 al 1%; pirofosfato sódico (Na₂H₂P₂O₇) 2,5 mM; NaCl 150 mM; EDTA 15 mM; EGTA 5 mM;

5 hidrocloreuro de N-alfa-4-tosil-L-arginina metil éster (TAME) 2 mM; PNPP 15 mM; benzamida 5 mM; vanadato sódico 1 mM; fluoruro sódico 10 mM; 50 µg/ml de PMSF; DTT 1 mM; ácido okadaico 1 µM; microcistina 1 µM mas comprimido libre de EDTA completo (# 1873580; Roche). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 30 segundos a la velocidad 6.0 en Bio101 fastPrep (#Bio 101; Thermo Seweant). El lisado de tumor se preparó de acuerdo con las especificaciones del fabricante MSD (http://www.meso.scale.com/CatalogSystemWed/Documents/Phospho_Aurora_A_Thr288-WCL.pdf). La concentración de proteína del sobrenadante se determinó mediante el ensayo Biorad DC-Protein (#500-0111).

10 Se usó el kit de extracción de histona total (#OP-0006; EpiQuik) para extraer la histona total del gránulo de tejido de tumor en la etapa centrifuga anterior, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (<http://epigentek.com/docs/OP-0006.pdf>). La concentración de proteína se midió mediante el ensayo Biorad DC-Protein (#500-0111; BioRad), y para los ensayos IVTI de histona H3 fosfo-Ser10 se usaron 25 mg/ml de proteína de extracto de histona.

Ensayo con fósforo-Thr288 MSD de inhibición del sitio diana *in vivo* (IVTI) de Aurora A

15 El propósito de este ensayo es medir la inhibición *in vivo* de quinasa Aurora A con muestras de tumor de xenoinjerto. El ensayo se realizó con formato de placa ELISA Meso Scale Discovery (MSD) de 96 pocillos. Se cargó una placa MULTI-SPOT® Phospho-Aurora A Singleplex (kit de lisado de células JCD K150; Meso Scale Discovery, MD) con 150 µl/pocillo de solución de bloqueo A (BSA al 3% de concentración final). Agitar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora y lavar con tampón TrisWash tres veces. Los lisados de tumores se prepararon a partir del protocolo de lisado de tumores anterior a 1 mg/ml y se dispensaron 25 µl/pocillo dentro de la placa MULTI-SOPT® Phospho-Aurora A MSD. Incubar la mezcla durante un tiempo adicional de 3 horas a temperatura ambiente, y lavar 3 veces con tampón de lavado TrisWash. Se agregó anticuerpo de detección SULFO-TAGTM anti-Aurora A Phospho-T288 en tampón de dilución de anticuerpo de BSA al 1% (anticuerpo diluido 50x en el tampón con 1 parte de BSA al 3% mas 2 partes de tapón de lavado; 0,02% de bloqueador D-R) en la cantidad de 25 µl pocillo dentro de la placa y agitar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavar la placa 3 veces con tampón TrisWash, agregar 150 µl/pocillo de 2X tampón de lectura T dentro de la placa, y a continuación leer inmediatamente sobre un instrumento MSD SECTORTM Imager 6000. El porcentaje de inhibición se definió como $[100 - (\text{lectura de MSD media del grupo de tratamiento del compuesto} / \text{lectura de MSD media del grupo con vehículo})] * 100$.

25 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un TED₅₀ de 2,13 mg/kg con el modelo de xenoinjerto H446 en ratones desnudos (Dosis Eficaz Umbral) en un estudio de dosis respuesta a las 3 horas pos-dosificación. Los datos muestran que el Ejemplo 1 demuestra inhibición de quinasa Aurora A *in vivo* con muestras de tumor de xenoinjerto al TED especificado.

Ensayo con histona H3 fosfo-Ser10 MSD de inhibición del sitio diana *in vivo* (IVTI) de Aurora B

35 El propósito de este ensayo es medir la actividad de inhibición *in vivo* de quinasa Aurora A con muestras de tumor de xenoinjerto para+ determinar la inhibición de histona H3 fosfo-Ser10 ya que es un substrato quinasa más abajo directo de Aurora B. Realizar el ensayo con un formato de placa ELISA Meso Scale Discovery (MSD) de 96 pocillos. Se agrega solución de bloqueo A (concentración final BSA al 3%) a una placa MULTI-SPOT® Histone H3 4-Spot (kit de lisado de células entera, catálogo # K150 EWD-3 JCD, Meso Scale Discovery, MD) a 150 µl/pocillo y agitar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con tampón TrisWash MSD, se dispensó el extracto de histona, preparado a 0,25 mg/ml con el protocolo de lisado de tumor anterior, sobre la placa MSD a 25 µl/cavidad. Incubar la mezcla durante un tiempo adicional de 3 horas a temperatura ambiente, lavar 3 veces con tampón TrisWash MSD. El anticuerpo de detección SULFO-TAGTM anti-histona H3 fosfo-Ser10 se diluyó 50x en 3 ml de tampón de dilución de anticuerpo de BSA al 1% (1 ml de BSA al 3% con 2 ml de tampón de lavado MSD; 0,01% de bloqueador D-M), y se agregaron 25 µl/pocillo dentro de la placa y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la placa se lavó 3 veces con tampón TrisWash MSD. Agregar 150 µl/pocillo de 2X de tampón de lectura T de MSD a la placa. Leer la placa inmediatamente con un instrumento MSD SECTORTM Imager 6000. El porcentaje de inhibición se definió como $[100 - (\text{lectura de MSD media del grupo de tratamiento del compuesto} / \text{lectura de MSD media del grupo con vehículo})] * 100$.

45 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 no proporciona más del 50% de inhibición de histona H3 fosfo-Ser10 en un estudio de dosis respuesta a 30 mg/kg a las 3 horas pos-dosificación, y en un estudio en el trascurso del tiempo a 50 mg/kg 1 hora post-dosificación. El resultado sugiere que el Ejemplo 1 no inhibe la Aurora B *in vivo* con muestras de tumor de xenoinjerto a la dosis especificadas.

Eficacia de crecimiento anti-tumor con modelo de xenoinjerto en ratón desnudo SCLC NCI-H446

55 El ensayo es para medir la inhibición del crecimiento de tumor *in vivo* en modelos de xenoinjerto en ratones desnudos SCLC NCI-H446 y SCLC NCI-H69. Todos los estudios *in vivo* se realizaron de acuerdo con el Institutional Ani-

mal Care and Use Protocols. Para los modelos de xenoinjerto, las células NCI-H446 de cáncer de pulmón de célula pequeña humana y las células NCI-H69 de cáncer de pulmón de célula pequeña humanas se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones del vendedor. Las células se recolectaron, lavaron y resuspendieron en una mezcla 1:1 de medio libre de suero y Matrigel (354234, Becton Dickinson). A continuación, las células se implantaron dentro de ratones hembra desnudos atímicos (Harlan Laborastories) subcutáneamente en el flanco trasero a 5×10^6 células/ratón. El volumen del tumor se estimó usando la fórmula: $v = l \times w^2 \times 0,536$, en donde l = diámetro medido mayor y w = diámetro perpendicular más pequeño. Los datos se analizaron con el software SAS (SAS Institutes Inc, NC).

Cuando el volumen del tumor alcanzó los 150 mm^3 en ratones desnudos, los animales se distribuyeron aleatoriamente por el volumen del tumor y el compuesto de ensayo se administró en la formulación usando vehículo de hidroxipropil beta ciclodextrina al 20% (HPB-CD)/tampón de fosfato 25 mM pH 8, con pH final ajustado a pH 9 con NaOH 1 N. Se usaron diez animales por vehículo y grupos de tratamiento. Para cada punto de tiempo dado, los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de vehículo de control. Los volúmenes de tumores se dan como medias junto con los errores estándar para grupo de tratamiento.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 demostró eficacia de crecimiento anti-tumor significativa en modelo de ratones desnudos de xenoinjerto en NCI-H446 de cáncer de pulmón de célula pequeña y en modelo de ratones desnudos de xenoinjerto en NCI-H69 de cáncer de pulmón de célula pequeña.

Tabla 4: Inhibición del crecimiento del tumor de xenoinjerto en SCLC H446 *in vivo* con tratamiento del Ejemplo 1

Programa de dosificación	Media de volumen del tumor (mm^3)	SE del volumen del tumor (mm^3)	Valor de p	Delta T/C (%)	Regresión (%)
Vehículo	698,61	319,434	NA	NA	NA
Ejemplo 1 30 mg/kg; BID x21	106,19	22,729	<0,001*	NA	-45,8
Ejemplo 1 50 mg/kg; BID x21	31,62	4,340	<0,001*	NA	-83,9

El análisis para el volumen del tumor está basado en el Log 10 y la estructura de covarianza SpatialPower.
 *: Significancia ($p < 0,05$); NA: No Aplicable.
 Delta T/C (%) está calculada el día 30 cuando el volumen del tumor en un grupo tratado está en o por encima del volumen del tumor de la línea base (día 16).
 La fórmula es $100 \times (T - TO) / (C - CO)$, en donde T y C son volúmenes de tumores de punto final medios en los grupos tratados o de control, respectivamente. TO y CO son volúmenes de tumores de la línea base medios en estos grupos. La regresión (%) se calculó cuando el volumen de punto final está por debajo de la línea base. La fórmula es $100 \times (T - TO) / TO$, en donde TO son los volúmenes de tumores de la línea base medios en los grupos tratados.

20

25

30 Tabla 5: Inhibición del crecimiento del tumor de xenoinjerto en SCLC H69 *in vivo* con tratamiento del Ejemplo 1

Programa de dosifi-	Media de volumen	SE del volumen del	Valor de p	Delta T/C	Regresión (%)
---------------------	------------------	--------------------	------------	-----------	---------------

ES 2 716 732 T3

cación	del tumor (mm³)	tumor (mm³)		(%)	
Vehículo	687,61	95,175	NA	NA	NA
Ejemplo 1 30 mg/kg; BID x14	73,35	9,269	<0,001*	NA	-63,6
Ejemplo 1 50 mg/kg; BID x14	72,32	8,035	<0,001*	NA	-63,1

El análisis para el volumen del tumor está basado en el Log 10 y la estructura de covarianza SpatialPower.

*: Significancia (p<0,05); NA: No Aplicable.

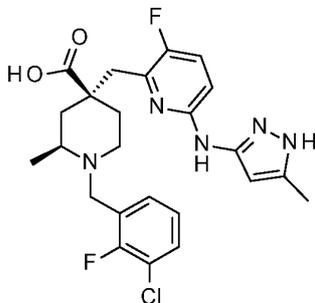
Delta T/C (%) está calculada el día 30 cuando el volumen del tumor en un grupo tratado está en o por encima del volumen del tumor de la línea base (día 16).

La fórmula es $100 \cdot (T - TO) / (C - CO)$, en donde T y C son volúmenes de tumores de punto final medios en los grupos tratados o de control, respectivamente. TO y CO son volúmenes de tumores de la línea base medios en estos grupos. La regresión (%) se calculó cuando el volumen de punto final está por debajo de la línea base. La fórmula es $100 \cdot (T - TO) / TO$, en donde TO son los volúmenes de tumores de la línea base medios en los grupos tratados.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

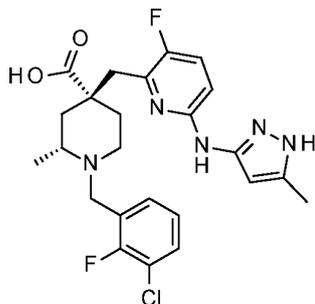
ácido (2S,4S)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:



5

y

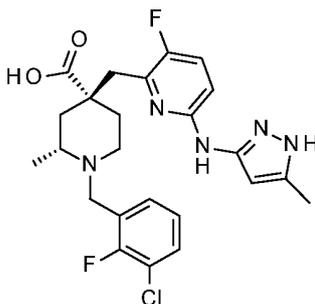
ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:



10

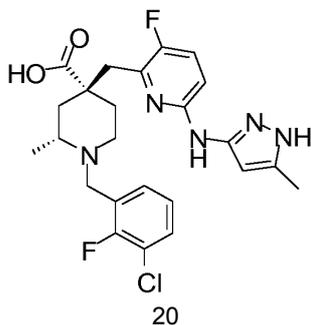
o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

15 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, el cual es ácido (2R,4R)-1-[(3-cloro-2-fluoro-fenil)metil]-4-[[3-fluoro-6-[(5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-2-piridil]metil]-2-metil-piperidino-4-carboxílico:



- 4.** Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 5.** El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en terapia.
- 5** **6.** El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 7.** El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón de célula no pequeña, y linfoma no Hodgking.
- 10** **8.** El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de célula pequeña.
- 9.** El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
- 10.** El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer de mama triple-negativo.
- 15** **11.** El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer cervical.
- 12.** El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer de cabeza y cuello.