



CSA221040

Organización y
Digitalización CSA Ltda



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

08-129814

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: CO-CRISTAL DE MALEATO DE AZD1152

SOLICITANTE: ASTRAZENECA AB

DIRECCIÓN: Sodertalje S-SE-151 85, Suecia

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 05 de Diciembre de 2008

P2008/000188

OlarteRaisbeck



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129814- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:15:23 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2008/000188

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: ASTRAZENECA AB

Dirección: S-151 85 Södertälje

Nacionalidad o Domicilio: Suecia

Lugar de Constitución: Suecia

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: J. IAN RAISBECK

Dirección: World Trade Center, Torre A, Calle
100 No. 8A-37 Piso 10.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996

TP 135.799

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: 1) George Joseph SEPENDA; 2) Richard STOREY;

Dirección: Charter way, Macclesfield Cheschire SK10 2NA Gran Bretaña

Nacionalidad o Domicilio: 1) Estadounidense 2) Británico

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2007/001771

Fecha Mayo 14, 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/132227

Fecha Noviembre 22, 2007

6

Título (54) CO-CRISTAL DE MALEATO DE AZD1152

Clasificación Internacional (51) C07D 403/12, C07F 9/09, A61K 31/661, A61P 35/00

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

Mayo 16, 2006

(31) Número de Solicitud

0609621.8

9

Comprobante de pago No. 08-93,854

Fecha Diciembre 2 de 2008

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia autentica.

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional, Secuencias.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 No. 08-129814--00000-0000
 Fecha: 2008-12-05 16:15:23 Dep: 2020 NULCRACIONI
 Tom 11 PATENTILIH LVE 378 FASLACIONALI
 Act 411 PRESENTACION Folios 128

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés

No. 11426

El Ministerio de Relaciones Exteriores en Estocolmo certifica por el presente documento que Mrs. Anna-Karin Östin, de la Oficina de Registro de Compañías de Suecia, Sundsvall, ha expedido y firmado la anterior certificación en su calidad oficial.

En Estocolmo, este día 14 de Agosto de 2007.

(Firmado)

Hay un sello del Ministerio de Relaciones Exteriores de Suecia.

Hay un sello firmado de la Embajada de Sudán en Estocolmo.

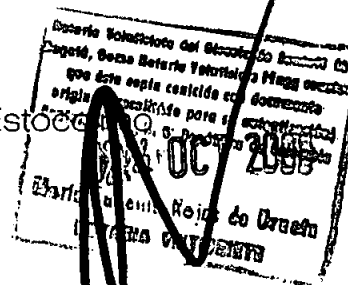
Firma de Agneta S...

Y sello de ...

Firma: Mohamed Hussein.

Fecha: 20 de Agosto de 2007.

Sello: "Anne-Marie Bonde - Notario Público de Estocolmo"



Certificación Notarial

Yo, la suscrita Anne-Marie Bonde, Notario Público de la ciudad de Estocolmo, certifico por medio del presente que Anders Burén, debidamente autorizado para firmar en nombre de Astrazeneca AB ha expedido y firmado el anterior documento en original, del cual la presente es una copia auténtica.

Derechos: 340 coronas. Estocolmo, 26 de Octubre de 2007.

Ex oficio:

(Firmado) Sello: "Anne-Marie Bonde - Notario Público de Estocolmo".

Apostilla adjunta:

APOSTILLE	
(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Suecia
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Anne-Marie Bonde
3. Actuando en calidad de:	Notario Público
4. Lleva el sello / estampilla de:	Notario Público de Estocolmo.
<u>Certificado</u>	
5. En:	Estocolmo
6. El:	Día 26 de Octubre de 2007
7. Por:	Björn Sandin, Notario Público
8. Bajo el No.	4071
9. Sello / estampilla:	Björn Sandin, Notario Público de Estocolmo.
10. Firma:	(Firmado)

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Cert.Min. Rel."

Fecha: 13 de Noviembre de 2007.

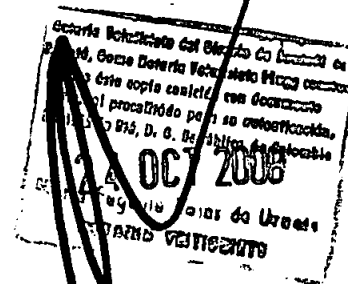
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 10-054




Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : Sweden

This public document

2. has been signed by Anne-Marie Bonde

3. acting in the capacity of Notary Public

4. bears the seal/stamp of

Notary Public in Stockholm

Certified

5. at Stockholm

6. the 26.10.2007

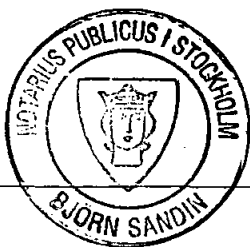
7. by Björn Sandin

Notary Public

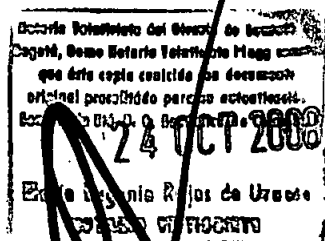
8. No 4071

9. Seal/stamp:

10. Signature:



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Björn Sandin", with a horizontal line drawn through it.



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Friery
Juan Guillermo Mour
Natalia Castro

Zayde Chahí
Simón Salina
Alexander Agudé
Camilo A. Rodríguez
Lina Mosquera
Catalina Barbastefan

Of Counsel
Guillermo Chahí
Graciela Mel
Jacqueline Chaparr
Cruz E. de Moncaleán

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

domiciled in

domiciliado en

AstraZeneca AB

Västra Malarehamnen 9 S-151 85 Södertälje, Sweden

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Friery and/or Juan Guillermo Mour and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Friery y/o Juan Guillermo Mour y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones, dar fe y dar fe en juicio a todas las reclamaciones, dar fe y dar fe que por motivo de lo encomendado se presenten, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

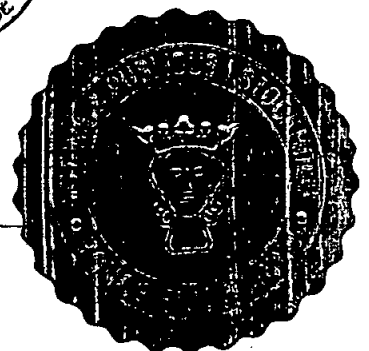
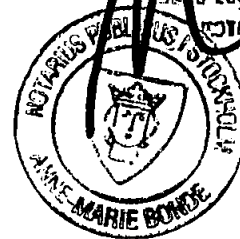
Anders Burén
Authorized Signatory

Date/Fecha:

24 OCTOBER 2007

City/Country/Ciudad,País:

SÖDERTÄLJE



I, the undersigned, Anne-Marie Bonde, Notary Public of the City of Stockholm
hereby certify that

ANDERS BURÉN

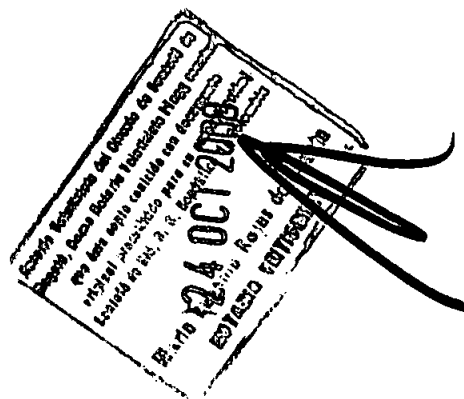
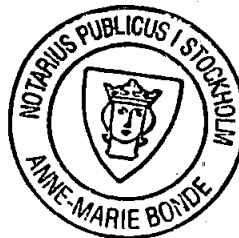
duly authorized to sign for

ASTRAZENECA AB

has issued and signed the foregoing document.

Fee 340:- Stockholm 2007-10-26

Crowns Ex officio:



Anders Burén
Authorized Signatory



18/10/08

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as DULY AUTHORISED SIGNATORY of ASTRAZENECA AB

3. That ASTRAZENECA AB having its principal place of business located in SODERTALJE, SWEDEN

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

1. CERTIFICATE OF INCORPORATION OF ASTRAZENECA AB

2. AUTHORISATION IN FAVOUR OF SIGNATORY

NOTARY PUBLIC (Signature):

Name and Particulars (e.g. Notary's name, Jurisdiction, Date of Licence Expiration)

SEAL (optional)

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

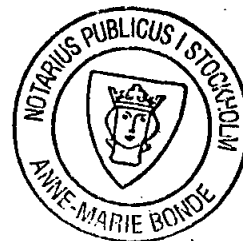
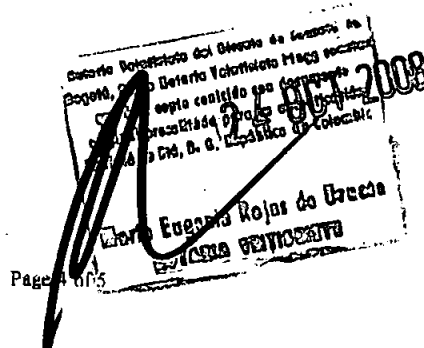
2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

4. Que con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):



Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés

BOLAGSVERKET

851 81 Sund... Tel. 060-18 40 00 - Fax: 060 129840.
bolagsverket@bolagsverket (Ilegible)

Certificado de Existencia

Yo, Anna-Karin Östin, de Bolagsverket, la Oficina de Registro de Compañías de Suecia, certifico por medio del presente documento que AstraZeneca AB

Registro No. 556011-7482

es una compañía debidamente constituida según las leyes de Suecia, vigente y con existencia corporativa legal hasta donde muestran los registros de esta oficina en la fecha que se indica más adelante.

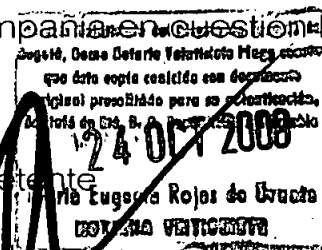
En testimonio de lo anterior, he puesto mi firma y estampado el sello oficial de Bolagsverket en Sundsvall, este día 8 de Agosto del año 2007.

(Firmado) Anna-Karin Östin.

Hay un sello de Bolagsverket

Bolagsverket, la Oficina de registro de Compañías de Suecia, es el Registrador Oficial de las Compañías Limitadas y otras formas de empresas comerciales en Suecia. Antes de que se expida un Certificado de existencia, los registros radicados en esta oficina se examinan para tener la seguridad de que la compañía en cuestión llena los siguientes requerimientos:

- La compañía tiene una Junta Directiva competente
- La compañía tiene un Auditor titulado calificado.



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

- La compañía ha llenado sus obligaciones con respecto a la radicación correcta de su informe anual.
- La compañía no es el sujeto de acciones legales de división de compañías, terminación o bancarrota.
- La compañía no ha sido disuelta como resultado de una fusión y no ha salido del registro por ninguna otra razón.

El Certificado está firmado por un funcionario autorizado para expedir estos y similares documentos en nombre de Bolagsverket, la Oficina de Registro de Compañías de Suecia.

Sello: "Anne-Marie Bonde – Notario Público de Estocolmo".

Certificación Notarial

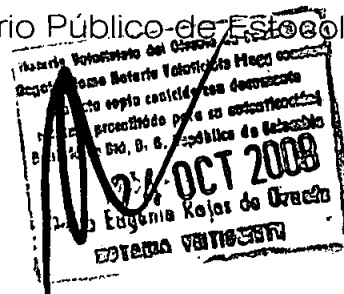
Yo, la suscrita Anne-Marie Bonde, Notario Público de la ciudad de Estocolmo, certifico por medio del presente que Anna-Karin Östin, debidamente autorizada para firmar en nombre de la Oficina de Registro de Compañías de Suecia, ha expedido y firmado el anterior documento en original, del cual la presente es una copia auténtica.

Derechos: 340 coronas. Estocolmo, 26 de Octubre de 2007.

Ex oficio:

(Firmado) Sello: "Anne-Marie Bonde – Notario Público de Estocolmo".

Apostilla adjunta:




Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

APOSTILLE
(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suecia

El presente documento público

2. Ha sido firmado por: Anne-Marie Bonde

3. Actuando en calidad de: Notario Público

4. Lleva el sello / estampilla de: Notario Público de Estocolmo.

Certificado

5. En: Estocolmo

6. El: Día 26 de Octubre de 2007

7. Por: Björn Sandin, Notario Público

8. Bajo el No. 4070

9. Sello / estampilla: Björn Sandin, Notario Público de Estocolmo.

10. Firma: (Firmado)

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Cert.Bolagsverket"

Fecha: 13 de Noviembre de 2007.

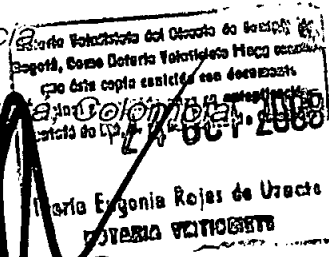
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 10-053




Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : Sweden

This public document

2. has been signed by Anne-Marie Bonde

3. acting in the capacity of Notary Public

4. bears the seal/stamp of

Notary Public in Stockholm

Certified

5. at Stockholm

6. the 26.10.2007

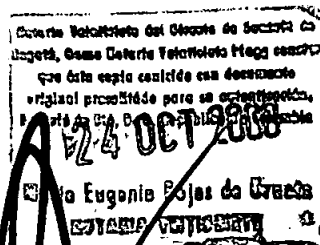
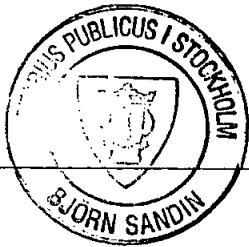
7. by Björn Sandin

Notary Public

8. No 4070

9. Seal/stamp:

10. Signature:



Bolagsverket

851 81 Sundsvall
Besökare: Badhusparken
Tel: 060-18 40 00 • Fax: 060-12 98 40
bolagsverket@bolagsverket.se • bolagsverket.se



Certificate of Good Standing

I, Anna-Karin Östin, of Bolagsverket, the Swedish Companies Registration Office, do hereby certify that

AstraZeneca AB
registration number: 556011-7482

is a duly incorporated company under the laws of Sweden and is in good standing and has a legal corporate existence as far as the records of this office show as of the date stated below.

In testimony hereof, I have hereunto set my hand and the official seal of Bolagsverket at Sundsvall, this 8th day of August in the year of two thousand and seven.

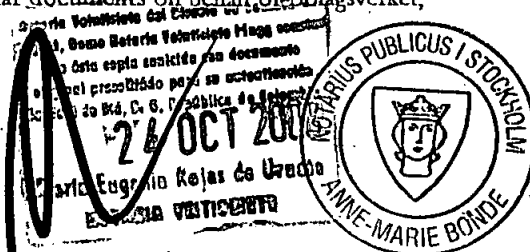

Anna-Karin Östin



Bolagsverket, the Swedish Companies Registration Office, is the official registrar of limited companies and other forms of business enterprise in Sweden. Before a Certificate of Good Standing is issued, the records kept by this office are examined to ensure that the following requirements are fulfilled for the company in question:

- the company has a registered competent board of directors
- the company has a registered qualified auditor
- the company has fulfilled its obligations regarding the correct filing of its annual report
- the company is not the subject of company division, winding up or bankruptcy proceedings
- the company has not been dissolved as the result of a merger and has not been struck off the register for any other reason.

The Certificate is signed by an official authorized to issue these and similar documents on behalf of Bolagsverket, the Swedish Companies Registration Office.



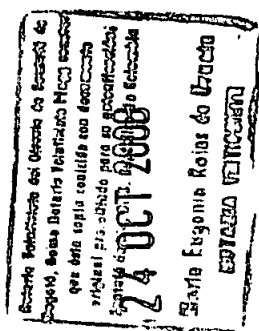
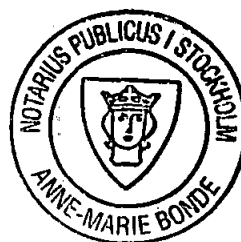
THE SWEDISH COMPANIES REGISTRATION OFFICE

has issued and signed the foregoing document in original of which this is a true copy.

Fee 340;- Stockholm 2007-10-26

Crowns **Ex officio:**

Lucretia Mott



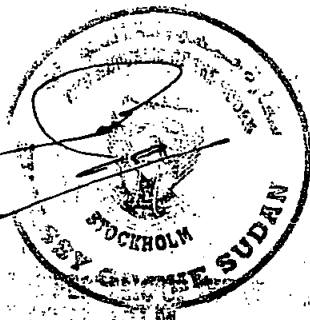
11426
The Ministry for Foreign
Affairs in Stockholm, hereby
certifies that
Mrs Anna-Karin Bostic

**Swedish Companies Registration
Office, Sundsvall**

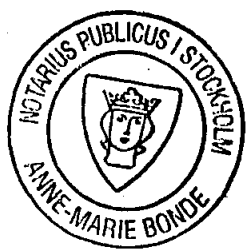
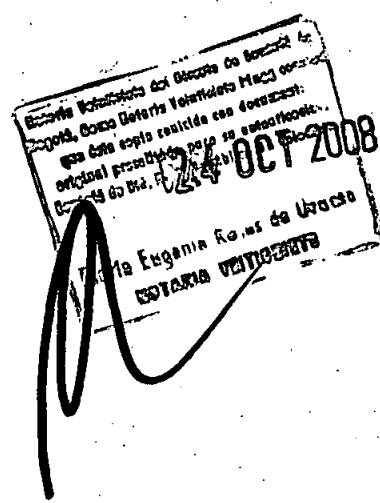
has issued and signed the
foregoing attestation in his
official capacity

For Stockholm this 14th day of August
2007 PAID

Agneta Söderlund



SIGNATURE OF Agneta Söderlund
AND STAMP OF: Svea MFA
SIGNATURE: Mohamed Hussein
DATE: 20-08-07



Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

Yo, ADRIAN PETER MARK WATNEY de 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, Reino Unido, Notario Público debidamente autorizado certifico exclusivamente que Blair Consular Services Limited a nombre de su cliente ASTRAZENECA AB, el día de hoy a presentado ante mí el documento adjunto a éste, correspondiente a la cesión firmada por Joseph George Sependa y Richard Storey y que dicho Blair Consular Services Limited ha representado ante mí por que dicha presentación que su mencionado cliente los ha representado y que dicho documento adjunto es un documento auténtico y original.

Firmado y sellado en 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, Reino Unido este día 26 de septiembre de 2008.

(Firmado) Adrian Peter Mark Watney – Notario Público

Sello redondo ilegible.

Hay dos sellos de la Notaria 27 firmado y fechado el 14 de noviembre de 2008.

Apostilla adjunta:



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Ministerio de Justicia

APOSTILLE

(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)
Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

El presente documento público

2. Ha sido firmado por: A P M Watney

3. Actuando en calidad de: Notario Publico

4. Lleva el sello / estampilla de: Dicho Notario Público.

Certificado

5. En: Londres

6. El: Día 30 de septiembre de 2008

7. Por: Secretario de Estado Principal de su Majestad
para las Relaciones Exteriores y la Commonwealth.

8. Bajo el No. H931283

9. Sello / estampilla: Oficina del Exterior y de la Commonwealth – Londres

10. Firma: (Firmado)L. Blades

Por el Secretario de Estado

Si este documento va a ser usado en un país que no haga parte de la convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una Apostilla o certificado de legalización sólo confirma que la firma, sello o estampilla que lleva el documento es genuina. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Relaciones Exteriores y de la Commonwealth apruebe el contenido.

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto:

"Astrazeneca AB – Certificación notarial"

Fecha: 19 de noviembre de 2008.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com.

Traducción No. 12-180



Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES

Licencia 376 de 1993 del Ministerio de Justicia

BE IT KNOWN that I, ADRIAN PETER MARK WATNEY of 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, United Kingdom, a duly authorised Notary Public

CERTIFY ONLY that Blair Consular Services Limited on behalf of their client

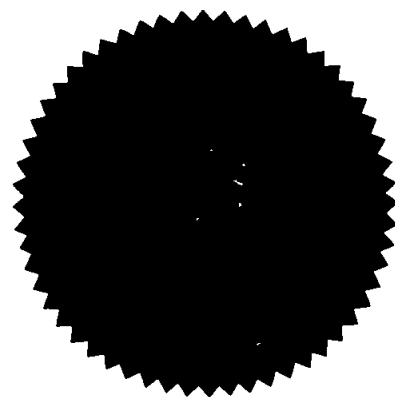
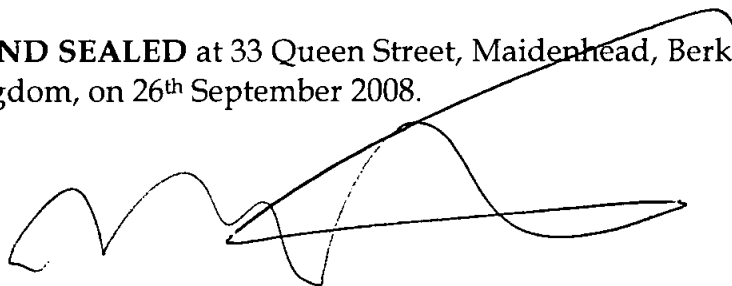
ASTRAZENECA AB

have this day presented to me the hereto annexed document

ASSIGNMENT signed by Joseph George Sependa and Richard Storey

and that the said Blair Consular Services Limited have represented to me by such presentation that their said client has represented to them that the said annexed document is a authentic original document.

SIGNED AND SEALED at 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, United Kingdom, on 26th September 2008.



Adrian Peter Mark Watney
Notary Public

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **A P M Watney**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres
6. the/le **30 September 2008**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H931283**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **L Blades**

LB



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

102291-1P CO

ASSIGNMENT

The undersigned,

SEPENDA, George, Joseph
STOREY, Richard

domiciled in

AstraZeneca, Charter Way, Macclesfield, Cheshire,
SK10 2NA, United Kingdomhereby state under oath to be the sole and true inventors
of

MALEATE CO-CRYSTAL OF AZD1152

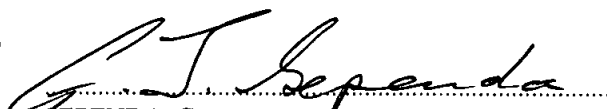
We state as well that we assign, without reservations or
limitation, in favor of

AstraZeneca AB

a corporation organized and existing under the laws of
Sweden

domiciled in

SE-151 85 Södertälje, Sweden

all rights inherent to said invention, and that the above
mentioned corporation hereby is enabled to apply, in its
name, for the corresponding patent in the Republic of
Colombia.
SEPENDA, George, Joseph

TRASPASO

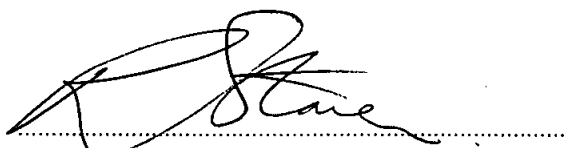
abajo firmado

domiciliado en

decla bajo juramento ser único y verdadero inventor
de.Declar asimismo que ced y
transf sin reserva ni limitación, a favor de la
sociedad

organizada y existente de conformidad con la leyes de

domiciliada en

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la
citada sociedad queda facultada para solicitar en su
nombre la patente correspondiente en la República de
Colombia.
STOREY, Richard

102291-1P CO

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los días del mes de
 2008, comparecí personalmente ante mí,
 Notario Publico,

a quien doy fé de conocer y me consta que
 la persona descrita y firmante
 del documento que precede, declarado ante mí que
 otorga el mismo para los fines y propósitos que
 en él se expresan.

NOTARY PUBLIC (Notario Público)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this day of
 2008 personally appeared before me, a Notary Public,

to me known and known to me to be the person
 described in and who executed the foregoing document,
 and duly acknowledged to me that
 executed the same for the uses and purposes
 therein expressed.

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los días del mes de
 2008, comparecí personalmente ante mí,
 Notario Publico,

a quien doy fé de conocer y me consta que
 la persona descrita y firmante
 del documento que precede, declarado ante mí que
 otorga el mismo para los fines y propósitos que
 en él se expresan.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this day of
 2008 personally appeared before me, a Notary Public,

to me known and known to me to be the person
 described in and who executed the foregoing document,
 and duly acknowledged to me that
 executed the same for the uses and purposes
 therein expressed.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 November 2007 (22.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/132227 A1

(51) International Patent Classification:

C07D 403/12 (2006.01) A61K 31/661 (2006.01)

C07F 9/09 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(74) Agent: GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY; AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SE).

(21) International Application Number:

PCT/GB2007/001771

(22) International Filing Date: 14 May 2007 (14.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0609621.8 16 May 2006 (16.05.2006) GB

(71) Applicant (for all designated States except MG, US): ASTRAZENECA AB [SE/SE]; S-151 85 Södertälje (SE).

(71) Applicant (for MG only): ASTRAZENECA UK LIMITED [GB/GB]; 15 Stanhope Gate, London Greater London W1K 1LN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SEPENDA, George, Joseph [US/GB]; AstraZeneca, Charter Way, Macclesfield Cheshire SK10 2NA (GB). STOREY, Richard [GB/GB]; AstraZeneca, Charter Way, Macclesfield Cheshire SK10 2NA (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

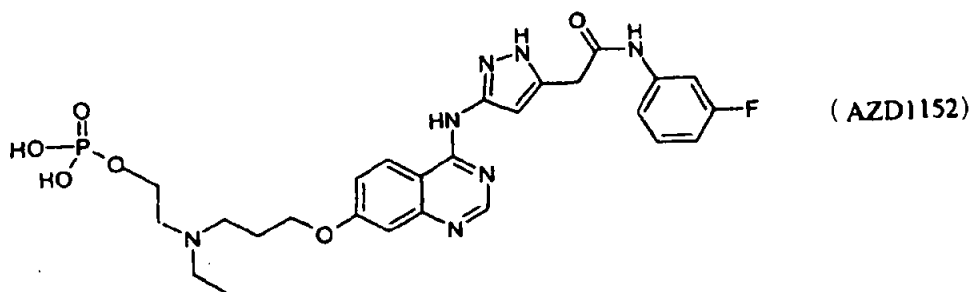
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MALEATE CO-CRYSTAL OF AZD1152



(57) Abstract: The present invention relates to a novel co-crystal of 2-[ethyl[3-(4-[(5-[2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl]-1H-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl)oxy]propyl]amino} ethyl dihydrogen phosphate (AZD1152) which is an aurora kinase inhibitor that is useful in the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer.

WO 2007/132227 A1

MALEATE CO-CRYSTAL OF AZD1152

21

The present invention relates to a novel co-crystal and more particularly to a novel co-crystal form of 2-{ethyl[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate (herein referred to as AZD1152) which is an aurora kinase inhibitor that is useful in the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer. More specifically the invention relates to a maleate co-crystal of AZD1152, to a process for the preparation of a maleate co-crystal of AZD1152, to pharmaceutical compositions containing a maleate co-crystal of AZD1152, to the use of a maleate co-crystal of AZD1152 in the manufacture of a medicament for the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer, and to methods of treating hyperproliferative diseases such as cancer in the human or animal body by administering a therapeutically effective amount of a maleate co-crystal of AZD1152. This invention also relates to a particular crystalline form of a maleate co-crystal of AZD1152.

Cancer (and other hyperproliferative diseases) is characterised by uncontrolled cellular proliferation which occurs when the normal regulation of cell proliferation is lost. This loss often appears to be the result of genetic damage to the cellular pathways that control a cell's progress through its cell cycle.

In eukaryotes, an ordered cascade of protein phosphorylation is thought to control the cell cycle. Several families of protein kinases that play critical roles in this cascade have been identified. The activity of many of these kinases is increased in human tumours when compared to normal tissue. This can occur by either increased levels of expression of the protein (for example as a result of gene amplification), or by changes in expression of co activators or inhibitory proteins.

The first identified, and most widely studied of these cell cycle regulators are the cyclin dependent kinases (or CDKs). More recently, protein kinases that are structurally distinct from the CDK family have been identified and found to play critical roles in regulating the cell cycle. These kinases also appear to be important in oncogenesis and include human homologues of the *Drosophila* aurora and *S.cerevisiae* Ipl1 proteins. The three human homologues of these genes aurora-A, aurora-B and aurora-C (also known as aurora2, aurora1 and aurora3 respectively) encode cell cycle regulated serine-threonine protein kinases (summarised in Adams *et al.*, 2001, Trends in Cell Biology, 11(2): 49-54). These show a peak of expression and kinase activity through G2 and mitosis. Several

-2-

observations implicate the involvement of human aurora proteins in cancer. The aurora-A gene maps to chromosome 20q13, a region that is frequently amplified in human tumours including both breast and colon tumours. Aurora-A may be the major target gene of this amplicon, since aurora-A DNA is amplified and mRNA overexpressed in greater than 50% of primary human colorectal cancers. In these tumours aurora-A protein levels appear greatly elevated compared to adjacent normal tissue. In addition, transfection of rodent fibroblasts with human aurora-A leads to transformation, conferring the ability to grow in soft agar and form tumours in nude mice (Bischoff et al., 1998, The EMBO Journal. 17(11): 3052-3065). Other work (Zhou et al., 1998, Nature Genetics. 20(2): 189-93) has shown that artificial over-expression of aurora-A leads to an increase in centrosome number and an increase in aneuploidy, a known event in the development of cancer.

It has also been shown that there is an increase in expression of aurora-B (Adams *et al.*, 2001, Chromsoma. 110(2):65-74) and aurora-C (Kimura *et al.*, 1999, Journal of Biological Chemistry, 274(11): 7334-40) in tumour cells when compared to normal cells. Aurora-B is over-expressed in cancer cells and increased levels of aurora-B have been shown to correlate with advanced stages of colorectal cancer (Katayama et al (1999) J. Natl. Cancer Inst. 91:1160). Furthermore, one report suggests that overexpression of aurora-B induces aneuploidy through increased phosphorylation of histone H3 at serine 10 and that cells over-expressing aurora-B form more aggressive tumours that develop metastases (Ota, T. et al, 2002, Cancer Res. 62: 5168-5177). Aurora-B is a chromosome passenger protein which exists in a stable complex with at least three other passenger proteins, Survivin, INCENP and Borealin (Carmena M. et al. 2003, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 842-854). Survivin is also up-regulated in cancer and contains a BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein (IAP) Repeat) domain and may therefore play a role in protecting tumour cells from apoptosis and/or mitotic catastrophe.

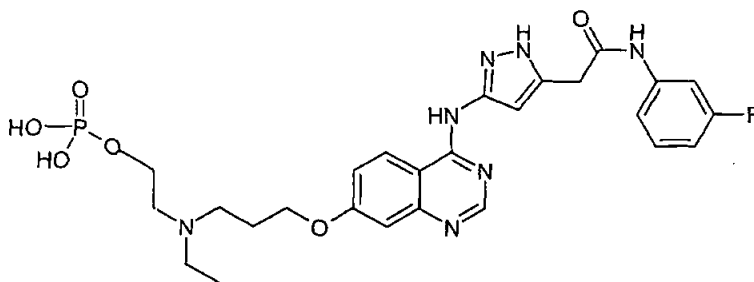
With regard to aurora-C, its expression is thought to be restricted to the testis but it has been found to be over-expressed in various cancer lines. (Katayama H et al, 2003, Cancer and Metastasis Reviews 22: 451-464).

Importantly, it has also been demonstrated that abrogation of aurora-A expression and function by antisense oligonucleotide treatment of human tumour cell lines (WO 97/22702 and WO 99/37788) leads to cell cycle arrest and exerts an antiproliferative effect in these tumour cell lines. Additionally, small molecule inhibitors of aurora-A and aurora-B have been demonstrated to have an antiproliferative effect in human tumour cells (Keen

-3-

et al. 2001, Poster #2455, American Association of Cancer Research annual meeting), as has selective abrogation of aurora-B expression alone by siRNA treatment (Ditchfield *et al.* 2003, *Journal of Cell Biology*, 161(2): 267-280). This indicates that inhibition of the function of aurora-A and/or aurora-B will have an antiproliferative effect that may be useful in the treatment of human tumours and other hyperproliferative disease. The inhibition of aurora kinases as a therapeutic approach to these diseases may have significant advantages over targeting signalling pathways upstream of the cell cycle (e.g. those activated by growth factor receptor tyrosine kinases such as epidermal growth factor receptor (EGFR) or other receptors). Since the cell cycle is ultimately downstream of all of these diverse signalling events, cell cycle directed therapies such as inhibition of aurora kinases would be predicted to be active across all proliferating tumour cells, whilst approaches directed at specific signalling molecules (e.g. EGFR) would be predicted to be active only in the subset of tumour cells which express those receptors. It is also believed that significant "cross talk" exists between these signalling pathways meaning that inhibition of one component may be compensated for by another.

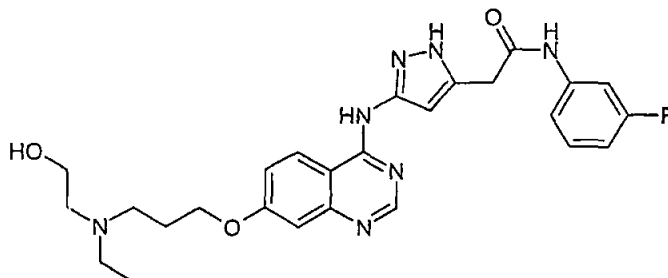
Inhibitors of the aurora kinases are described in International Patent Applications WO 03/55491 and WO 2004/058781, and in particular WO 2004/058781 discloses a compound which possesses the following structural formula, referred to herein as AZD1152:



AZD1152

AZD1152 is a pro-drug that is rapidly and completely converted (in human plasma) to the active moiety referred to herein as AZD1152 HQPA:

-4-



AZD1152 HQPA

AZD1152 HQPA is an ATP-competitive and reversible inhibitor of the aurora
5 kinases with potent activity against aurora A, B-INCENP and C-INCENP (K_i 's 1369
 ± 419.2 nM, 0.359 ± 0.386 nM and 17.03 ± 12.2 nM respectively). AZD1152 has been
found to inhibit tumour growth in a panel of human colorectal (SW620, HCT116,
Colo205) and lung (A549, Calu-6) tumour xenografts with statistical significance.

AZD1152 is disclosed in WO 2004/058781 as the dihydrochloride salt and also as
10 the free base in hydrated forms. In particular the free form is disclosed in the trihydrate to
tetrahydrate form.

From a manufacturing perspective, hydrated forms are problematic as they require
controls to be in place during manufacture, drying, storage and processing. In addition,
obtaining and maintaining a sample of compound with a consistent stoichiometric
15 compound to water ratio is difficult. In the case of the previously disclosed forms of
AZD1152, and in particular with the free form, water molecules are only loosely bound to
each molecule of AZD1152, so the extent of association and disassociation of water
molecules to the AZD1152 drug varies greatly with temperature and relative humidity.
Therefore, for a given weight of AZD1152, the actual amount of AZD1152 in terms of
20 number of molecules of AZD1152 will depend upon the temperature and relative humidity
as the water content will vary. The effectiveness of any dose determined by weight is thus
also dependent on the temperature and relative humidity to which it is exposed. Dynamic
Vapour Sorption has been used to measure the variation in the level of water associated
with AZD1152 with humidity.

25 WO 2004/058781 discloses, in general terms, certain pharmaceutically acceptable
salts of the compounds disclosed therein. AZD1152 is only disclosed as the
dihydrochloride salt and as the free form. No other forms of AZD1152 are mentioned. In
particular, WO 2004/058781 does not disclose any other co-crystal of AZD1152 and it

-5-

certainly does not consider whether any particular co-crystals of particular compounds would possess surprising benefits and particularly not benefits that might ameliorate the problems discussed herein.

Unexpectedly and surprisingly we have found that the maleate co-crystal of
5 AZD1152 exists in an anhydrous form, which is substantially non-hygroscopic.
Furthermore, although the stoichiometric ratio of drug to maleate may vary within a range of, for example, 0.8:1 to 1.2:1, or 0.9:1 to 1.1:1, we have found that the maleate co-crystal of AZD1152 disclosed herein has a reproducible stoichiometric ratio of drug to maleate of substantially 1:1. The effectiveness of a weight dose of AZD1152 maleate co-crystal is
10 therefore affected by temperature and relative humidity to a much lesser extent than that of the free form, the dihydrochloride salt and other co-crystal forms of AZD1152 that have been evaluated. Additionally, the maleate co-crystal of AZD1152 is easier to manufacture as there is less need to control the humidity levels in the manufacturing process. The anhydrous nature of the maleate co-crystal further means that it will be possible to
15 formulate it using limited aqueous conditions and/or high temperature environments because of the lower risk of hydration /dehydration during processing conditions that use aqueous environments e.g. wet granulation.

Additionally, we have discovered that a maleate co-crystal of AZD1152 surprisingly contains fewer impurities than the free form. In particular, it appears that
20 certain recalcitrant impurities that are present in the free form are surprisingly present to a much lesser extent after conversion of the free form into the maleate form.

Accordingly, the present invention provides a maleate co-crystal of AZD1152.

For the avoidance of doubt, the terms "maleate co-crystal of AZD1152",
"AZD1152 maleate co-crystal" or "AZD1152 maleate" (or any other similar term used
25 herein) refer to all forms of association between AZD1152 and maleic acid, including salt forms. In particular, these terms encompass:

- (i) a non-ionic association between the AZD1152 and maleic acid (i.e. where no proton transfer has occurred between the drug and the maleic acid); or
- 30 (ii) an ionic interaction where proton transfer between the AZD1152 and maleic acid has occurred to form a maleate salt of AZD1152, or
- (iii) mixtures of (i) and (ii) above.

-6-

In a particular embodiment of the invention, the maleate co-crystal comprises is a non-ionic association between the AZD1152 drug and the maleic acid (i.e. where no proton transfer has occurred between the drug and the maleic acid).

In an alternative embodiment of the invention, the maleate co-crystal is a maleate salt of AZD1152.

In a particular embodiment, a maleate co-crystal of AZD1152 is formed by mixing AZD1152 free form with maleic acid in a suitable solvent such as methanol, dimethyl sulphoxide (DMSO) or a mixture of DMSO with methanol, acetonitrile, and other similar solvents. The maleate co-crystal may be isolated by allowing crystallisation to occur and then isolating the resultant crystalline material. The identity of a maleate co-crystal of AZD1152 of the present invention can be confirmed by proton nuclear magnetic resonance (NMR) analysis.

It should also be understood that a compound or co-crystal of the invention may exhibit the phenomenon of tautomerism and that the formulae drawings within this specification can represent only one of the possible tautomeric forms. It is to be understood that the invention encompasses any tautomeric form which has Aurora kinase inhibitory activity and in particular Aurora-A and/or Aurora-B kinase inhibitory activity and is not to be limited merely to any one tautomeric form utilised within the formulae drawings.

The present invention also relates to a particular crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152. This crystalline form is prepared by crystallising the maleate crystal of AZD1152 from an organic solvent such as a mixture of methanol and dimethyl sulphoxide (DMSO). Further experimental details are provided in the Examples.

Accordingly, the invention provides a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152.

The crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152 is characterised in that it provides an X-ray powder diffraction pattern substantially as shown in Figure 1.

The most prominent X-ray powder diffraction peaks for the crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152 are shown in table 1:

-7-

Table 1

Angle 2-Theta °	Relative Intensity %	Angle 2-Theta °	Relative Intensity %
5.118	100	22.425	18.8
6.446	18.8	23.228	26.8
8.158	28.1	23.583	37.7
10.171	13.1	23.994	25.7
11.917	5.9	24.271	24.1
12.861	18	24.671	23.3
13.849	48.3	25.32	19.1
14.909	25.2	25.574	32.9
15.234	36	25.813	43.8
15.738	27.6	26.21	35.3
16.506	18.8	27.122	16
16.884	23	27.946	45.4
17.232	42.5	28.418	31.6
18.134	13.8	28.847	21.7
19.327	62.7	29.725	26.1
19.82	38.8	30.521	18.8
20.082	61	31.74	15.4
20.582	61.4	33.424	14.7
21.008	32	36.181	15.3
21.663	87.3	38.106	10.8

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with at least one specific peak at about 2-theta = 15.2°.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about 2-theta = 12.9°.

-8-

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about 2-theta = 15.2 or 10.2°.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about 2-theta = 18.1°.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with at least one specific peak at about 2-theta = 10.2°, 12.9°, 15.2° or 18.1°.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about 2-theta = 12.9° and 15.2° and/or 10.2°.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about 2-theta = 10.2°, 12.9°, 15.2° and 18.1°.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about any one of or combination of the 2-theta ° values shown in table 1.

According to the present invention there is provided a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern substantially the same as the X-ray powder diffraction pattern shown in Figure 1.

When it is stated herein that the present invention relates to a crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152, the degree of crystallinity as determined by X-ray powder diffraction data is conveniently greater than about 60%, more conveniently greater than about 80%, preferably greater than about 90%.

In the preceding paragraphs defining the X-ray powder diffraction peaks for the crystalline forms of the maleate co-crystal of AZD1152, the term "at about" is used in the expression "...at about 2-theta = ..." to indicate that the precise position of peaks (i.e. the recited 2-theta angle values) should not be construed as being absolute values because, as will be appreciated by those skilled in the art, the precise position of the peaks may vary slightly between one machine and another, from one sample to another, or as a result of slight variations in measurement conditions utilised. It is also stated in the preceding

-9-

paragraphs that the crystalline forms of the maleate co-crystal of AZD1152 provide X-ray powder diffraction patterns 'substantially' the same as the X-ray powder diffraction patterns shown in Figure 1, and have substantially the most prominent peaks (2-theta angle values) shown in Table 1 and in particular at about 2-theta = 10.2°, 12.9°, 15.2° or 18.1°.

5 It shall be appreciated that the use of the term 'substantially' in this context is also intended to indicate that the 2-theta angle values of the X-ray powder diffraction patterns may vary slightly from one machine to another, from one sample to another, or as a result of slight variations in measurement conditions utilised, so the peak positions shown in the Figure or quoted in the Table are again not to be construed as absolute values.

10 In this regard, it is known in the art that an X-ray powder diffraction pattern may be obtained which has one or more measurement errors depending on measurement conditions (such as equipment, sample preparation or machine used). In particular, it is generally known that intensities in an X-ray powder diffraction pattern may fluctuate depending on measurement conditions and sample preparation. For example, persons
15 skilled in the art of X-ray powder diffraction will realise that the relative intensity of peaks can be affected by, for example, grains above 30 microns in size and non-unitary aspect ratios, which may affect analysis of samples. The skilled person will also realise that the position of reflections can be affected by the precise height at which the sample sits in the diffractometer and the zero calibration of the diffractometer. The surface planarity of the
20 sample may also have a small effect. Hence a person skilled in the art will appreciate that the diffraction pattern data presented herein is not to be construed as absolute (for further information see Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996). Therefore, it shall be understood that the crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152 of the present invention is not limited to the crystals
25 that provide X-ray powder diffraction patterns identical to the X-ray powder diffraction patterns shown in Figure 1 and any crystals providing X-ray powder diffraction patterns substantially the same as that shown in Figure 1 fall within the scope of the present invention. A person skilled in the art of X-ray powder diffraction is able to judge the substantial identity of X-ray powder diffraction patterns.

30 Generally, a measurement error of a diffraction angle in an X-ray powder diffractogram is about 2-theta = 0.5° or less (or, more suitably, about 2-theta = 0.2° or less) and such degree of a measurement error should be taken into account when considering the X-ray powder diffraction pattern in Figure 1, and when interpreting the peak positions

-10-

referred to in the text above and in Table 1. Therefore, where it is stated, for example, that the co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with at least one specific peak at about $2\text{-theta} = 15.2^\circ$ (or any one of the other angles mentioned above) then this can be interpreted as being $2\text{-theta} = 15.2^\circ$ plus or minus 0.5° , or $2\text{-theta} = 15.2^\circ$ plus or minus 0.2° .

According to another aspect of the invention, there is provided a method of preparing a maleate co-crystal of AZD1152 as herein defined, said method comprising the step of mixing a solution of AZD1152 free form with maleic acid in a suitable solvent such as methanol, N-methyl-2-pyrrolidinone, dimethyl sulfoxide (DMSO) or a mixture of DMSO with methanol, acetonitrile, and other similar solvents. The method may further comprise the steps of crystallisation and, optionally, isolation of the crystalline maleate co-crystal of AZD1152 thus formed.

The process may additionally comprise the further steps of washing the maleate co-crystal of AZD1152 with a suitable solvent; and drying the maleate co-crystal of AZD1152.

Suitably, AZD1152 free form is dissolved in a suitable solvent (such as dimethylsulfoxide, methanol, a mixture thereof or N-methyl-2-pyrrolidinone) and generally mixed with a solution of maleic acid (which is dissolved in either the same or a compatible solvent). Alternatively solid maleic acid may be added to the AZD1152 free form solution (or vice versa, i.e. the AZD1152 free form solution may be added to the solid maleic acid). Suitably, the solution is stirred to facilitate mixing of the AZD1152 free form and the added maleic acid. The materials (ideally but not exclusively in a 1:1 ratio) may be mixed at ambient temperature although the procedure may also be performed at higher temperatures.

Any suitable method known in the art for isolating the crystalline maleate form of AZD1152 may be used. Suitably, the maleate co-crystal of AZD1152 is collected by filtration.

Preferably the washed maleate co-crystal of AZD1152 is dried under vacuum.

In general, a ratio of AZD1152 free form : maleic acid of 1:1 is desired. This desired 1:1 ratio can be obtained by mixing the AZD1152 free form and maleic acid at compositions anywhere within the range of 0.6 – 1.4 AZD1152 free form : 1.0 maleic acid. Suitably, the ratio of AZD1152 free form: maleic acid in the mixture is within the range of 0.9 – 1.1 and particularly 1.0 – 1.1 AZD1152 free form : 1.0 - 1.1 maleic acid. Generally

-11-

an excess of maleic acid should be used and in particular the ratio of AZD1152 free form: maleic acid in the mixture is within the range of 0.6 – 1.0 and particularly 0.9 – 1.0 AZD1152 free form : 1.0 maleic acid.

AZD1152 maleate co-crystal typically self crystallise, but it will be appreciated by a person skilled in the art that seeding may be used if required or desired in order to promote co-crystal formation.

According to a further aspect of the invention there is provided a pharmaceutical composition which comprises a maleate co-crystal of AZD1152, as defined herein in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier.

The compositions of the invention may be in a form suitable for oral use (for example as tablets, lozenges, hard or soft capsules, aqueous or oily suspensions, emulsions, dispersible powders or granules, syrups or elixirs), for topical use (for example as creams, ointments, gels, or aqueous or oily solutions or suspensions), for administration by inhalation (for example as a finely divided powder or a liquid aerosol), for administration by insufflation (for example as a finely divided powder) or for parenteral administration (for example as a sterile aqueous or oily solution for intravenous, subcutaneous, intramuscular or intramuscular dosing or as a suppository for rectal dosing).

The compositions of the invention may be obtained by conventional procedures using conventional pharmaceutical excipients, well known in the art. Thus, compositions intended for oral use may contain, for example, one or more colouring, sweetening, flavouring and/or preservative agents.

Suitable pharmaceutically acceptable excipients for a tablet formulation include, for example, inert diluents such as lactose, sodium carbonate, calcium phosphate or calcium carbonate, granulating and disintegrating agents such as corn starch or algenic acid; binding agents such as starch; lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid or talc; preservative agents such as ethyl or propyl *p*-hydroxybenzoate, and anti-oxidants, such as ascorbic acid. Tablet formulations may be uncoated or coated either to modify their disintegration and the subsequent absorption of the active ingredient within the gastrointestinal track, or to improve their stability and/or appearance, in either case, using conventional coating agents and procedures well known in the art.

Compositions for oral use may be in the form of hard gelatin capsules in which the active ingredient is mixed with an inert solid diluent, for example, calcium carbonate, calcium phosphate or kaolin, or as soft gelatin capsules in which the active ingredient is

-12-

mixed with water or an oil such as peanut oil, liquid paraffin, soya bean oil, coconut oil, or preferably olive oil, or any other acceptable vehicle.

Aqueous suspensions generally contain the active ingredient in finely powdered form together with one or more suspending agents, such as sodium
5 carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinyl-pyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents such as lecithin or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids (for example polyoxyethylene stearate), or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of
10 ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with
15 partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives (such as ethyl or propyl p-hydroxybenzoate, anti-oxidants (such as ascorbic acid), colouring agents, flavouring agents, and/or sweetening agents (such as sucrose, saccharine or aspartame).

20 Oily suspensions may be formulated by suspending the active ingredient in a vegetable oil (such as arachis oil, olive oil, sesame oil or coconut oil) or in a mineral oil (such as liquid paraffin). The oily suspensions may also contain a thickening agent such as beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. Sweetening agents such as those set out above, and flavouring agents may be added to provide a palatable oral preparation. These
25 compositions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as ascorbic acid.

Dispersible or lyophilised powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension or solution by the addition of water generally contain the active ingredient together with a dispersing or wetting agent, suspending agent and one or more preservatives. Suitable dispersing or wetting agents and suspending agents are exemplified
30 by those already mentioned above. Additional excipients such as sweetening, flavouring and colouring agents, may also be present.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be in the form of oil-in-water emulsions. The oily phase may be a vegetable oil, such as olive oil or arachis

-13-

oil, or a mineral oil, such as for example liquid paraffin or a mixture of any of these.

Suitable emulsifying agents may be, for example, naturally-occurring gums such as gum acacia or gum tragacanth, naturally-occurring phosphatides such as soya bean, lecithin, an esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides (for example sorbitan monooleate) and condensation products of the said partial esters with ethylene oxide such as polyoxyethylene sorbitan monooleate. The emulsions may also contain sweetening, flavouring and preservative agents.

Syrups and elixirs may be formulated with sweetening agents such as glycerol, propylene glycol, sorbitol, aspartame or sucrose, and may also contain a demulcent, preservative, flavouring and/or colouring agent.

The pharmaceutical compositions may also be in the form of a sterile injectable aqueous or oily suspension, solutions, emulsions or particular systems, which may be formulated according to known procedures using one or more of the appropriate dispersing or wetting agents and suspending agents, which have been mentioned above. A sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, for example a solution in polyethylene glycol.

Suppository formulations may be prepared by mixing the active ingredient with a suitable non-irritating excipient which is solid at ordinary temperatures but liquid at the rectal temperature and will therefore melt in the rectum to release the drug. Suitable excipients include, for example, cocoa butter and polyethylene glycols.

Topical formulations, such as creams, ointments, gels and aqueous or oily solutions or suspensions, may generally be obtained by formulating an active ingredient with a conventional, topically acceptable, vehicle or diluent using conventional procedure well known in the art.

Compositions for administration by insufflation may be in the form of a finely divided powder containing particles of average diameter of, for example, 30µm or much less preferably 5µm or less and more preferably between 5µm and 1µm, the powder itself comprising either active ingredient alone or diluted with one or more physiologically acceptable carriers such as lactose. The powder for insufflation is then conveniently retained in a capsule containing, for example, 1 to 50mg of active ingredient for use with a turbo-inhaler device, such as is used for insufflation of the known agent sodium cromoglycate.

-14-

Compositions for administration by inhalation may be in the form of a conventional pressurised aerosol arranged to dispense the active ingredient either as an aerosol containing finely divided solid or liquid droplets. Conventional aerosol propellants such as volatile fluorinated hydrocarbons or hydrocarbons may be used and the aerosol device is conveniently arranged to dispense a metered quantity of active ingredient.

For further information on formulation the reader is referred to Chapter 25.2 in Volume 5 of Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Therefore in a further aspect of the invention there is provided a maleate co-crystal of AZD1152 for use in therapy. Further provided is a maleate co-crystal of AZD1152 for use as a medicament. Another aspect of the invention provides a maleate co-crystal of AZD1152 for use as a medicament for the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer and in particular colorectal, breast, lung, prostate, bladder, renal or pancreatic cancer or leukaemia or lymphoma. The leukaemias and lymphomas mentioned herein maybe tumours of myeloid lineage such as acute myeloid leukaemia or of lymphoid lineage.

Additionally a maleate co-crystal of AZD1152 is provided for use in a method of treatment of a warm-blooded animal such as man by therapy. Another aspect of the invention provides a maleate co-crystal of AZD1152 for use in a method of treatment of hyperproliferative diseases such as cancer and in particular colorectal, breast, lung, prostate, bladder, renal or pancreatic cancer or leukaemia or lymphoma.

In another aspect of the invention, there is provided the use of a maleate co-crystal of AZD1152 in the preparation of a medicament for the treatment of a disease where the inhibition of one or more aurora kinase(s) is beneficial. In particular it is envisaged that inhibition of aurora A kinase and/or aurora B kinase may be beneficial. Preferably inhibition of aurora B kinase is beneficial. In another aspect of the invention, there is provided the use of a maleate co-crystal of AZD1152 in the preparation of a medicament for the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer and in particular colorectal, breast, lung, prostate, bladder, renal or pancreatic cancer or leukaemia or lymphoma.

According to yet another aspect, there is provided a maleate co-crystal of AZD1152 for use in the method of treating a human suffering from a disease in which the inhibition of one or more aurora kinase is beneficial, comprising the steps of administering to a person in need thereof a therapeutically effective amount of a maleate co-crystal of

-15-

AZD1152. In particular it is envisaged that inhibition of aurora A kinase and/or aurora B kinase may be beneficial. Preferably inhibition of aurora B kinase is beneficial. Further provided is a maleate co-crystal of AZD1152 for use in the method of treating a human suffering from a hyperproliferative disease such as cancer and in particular colorectal, breast, lung, prostate, bladder, renal or pancreatic cancer or leukaemia or lymphoma, comprising the steps of administering to a person in need thereof a therapeutically effective amount of a maleate co-crystal of AZD1152. The use of a maleate co-crystal of AZD1152 in any of the methods of treating a human described above also form aspects of this invention.

For the above mentioned therapeutic uses the dose administered will vary with the compound employed, the mode of administration, the treatment desired, the disorder indicated and the age and sex of the animal or patient. The size of the dose would thus be calculated according to well known principles of medicine.

In using a maleate co-crystal of AZD1152 for therapeutic or prophylactic purposes it will generally be administered so that a daily dose in the range, for example, 0.05 mg/kg to 50 mg/kg body weight is received, given if required in divided doses. In general lower doses will be administered when a parenteral route is employed. Thus, for example, for intravenous administration, a dose in the range, for example, 0.05 mg/kg to 25 mg/kg body weight will generally be used. Similarly, for administration by inhalation, a dose in the range, for example, 0.05 mg/kg to 25 mg/kg body weight will be used.

The treatment defined herein may be applied as a sole therapy or may involve, in addition to the compound of the invention, conventional surgery or radiotherapy or chemotherapy. Such chemotherapy may include one or more of the following categories of anti-tumour agents :-

(i) antiproliferative/antineoplastic drugs and combinations thereof, as used in medical oncology, such as alkylating agents (for example cis-platin, carboplatin, cyclophosphamide, nitrogen mustard, melphalan, chlorambucil, busulphan and nitrosoureas); antimetabolites (for example antifolates such as fluoropyrimidines like 5-fluorouracil and tegafur, raltitrexed, methotrexate, cytosine arabinoside and hydroxyurea; antitumour antibiotics (for example anthracyclines like adriamycin, bleomycin, doxorubicin, daunomycin, epirubicin, idarubicin, mitomycin-C, dactinomycin and mithramycin); antimitotic agents (for example vinca alkaloids like vincristine, vinblastine, vindesine and vinorelbine and taxoids like taxol and taxotere); and

-16-

topoisomerase inhibitors (for example epipodophyllotoxins like etoposide and teniposide, amsacrine, topotecan and camptothecin);

- (ii) cytostatic agents such as antioestrogens (for example tamoxifen, toremifene, raloxifene, droloxifene and idoxifene), oestrogen receptor down regulators (for example fulvestrant), antiandrogens (for example bicalutamide, flutamide, nilutamide and cypoterone acetate), LHRH antagonists or LHRH agonists (for example goserelin, leuprorelin and buserelin), progestogens (for example megestrol acetate), aromatase inhibitors (for example as anastrozole, letrozole, vorazole and exemestane) and inhibitors of 5 α -reductase such as finasteride;
- (iii) agents which inhibit cancer cell invasion (for example metalloproteinase inhibitors like marimastat and inhibitors of urokinase plasminogen activator receptor function);
- (iv) inhibitors of growth factor function, for example such inhibitors include growth factor antibodies, growth factor receptor antibodies (for example the anti-erb2 antibody trastuzumab [HerceptinTM] and the anti-erb1 antibody cetuximab [C225]), farnesyl transferase inhibitors, tyrosine kinase inhibitors and serine-threonine kinase inhibitors, for example inhibitors of the epidermal growth factor family (for example EGFR family tyrosine kinase inhibitors such as *N*-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy)quinazolin-4-amine (gefitinib, AZD1839), *N*-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-amine (erlotinib, OSI-774) and 6-acrylamido-*N*-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-(3-morpholinopropoxy)quinazolin-4-amine (CI 1033)), for example inhibitors of the platelet-derived growth factor family and for example inhibitors of the hepatocyte growth factor family;
- (v) antiangiogenic agents such as those which inhibit the effects of vascular endothelial growth factor, (for example the anti-vascular endothelial cell growth factor antibody bevacizumab [AvastinTM], compounds such as those disclosed in International Patent Applications WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 and WO 98/13354) and compounds that work by other mechanisms (for example linomide, inhibitors of integrin $\alpha v \beta 3$ function and angiostatin);
- (vi) vascular damaging agents such as Combretastatin A4 and compounds disclosed in International Patent Applications WO 99/02166, WO00/40529, WO 00/41669, WO01/92224, WO02/04434 and WO02/08213;
- (vii) antisense therapies, for example those which are directed to the targets listed above, such as ISIS 2503, an anti-ras antisense;

-17-

(viii) gene therapy approaches, including for example approaches to replace aberrant genes such as aberrant p53 or aberrant BRCA1 or BRCA2, GDEPT (gene-directed enzyme pro-drug therapy) approaches such as those using cytosine deaminase, thymidine kinase or a bacterial nitroreductase enzyme and approaches to increase patient tolerance to

5 chemotherapy or radiotherapy such as multi-drug resistance gene therapy; and

(ix) immunotherapy approaches, including for example ex-vivo and *in vivo* approaches to increase the immunogenicity of patient tumour cells, such as transfection with cytokines such as interleukin 2, interleukin 4 or granulocyte-macrophage colony stimulating factor, approaches to decrease T-cell anergy, approaches using transfected immune cells such as
10 cytokine-transfected dendritic cells, approaches using cytokine-transfected tumour cell lines and approaches using anti-idiotypic antibodies.

In addition a maleate co-crystal of AZD1152 may be used in combination with one or more cell cycle inhibitors. In particular with cell cycle inhibitors which inhibit bub1, bubR1 or CDK.

15 Such conjoint treatment may be achieved by way of the simultaneous, sequential or separate dosing of the individual components of the treatment. Such combination products employ the compounds of this invention within the dosage range described herein and the other pharmaceutically-active agent within its approved dosage range.

According to an aspect of the invention there is provided a combination suitable for
20 use in the treatment of cell proliferative disorders (such as cancer) comprising a maleate co-crystal of AZD1152 as defined hereinbefore and an additional anti-tumour agent as defined hereinbefore.

According to this aspect of the invention there is provided a pharmaceutical product comprising a maleate co-crystal of AZD1152 as defined hereinbefore and an additional
25 anti-tumour agent as defined hereinbefore for the conjoint treatment of cell proliferative disorders (such as cancer).

In addition to their use in therapeutic medicine, a maleate co-crystal of AZD1152 are also useful as pharmacological tools in the development and standardisation of *in vitro* and *in vivo* test systems for the evaluation of the effects of inhibitors of cell cycle activity
30 in laboratory animals such as cats, dogs, rabbits, monkeys, rats and mice, as part of the search for new therapeutic agents.

-18-

In the above other pharmaceutical composition, process, method, use and medicament manufacture features, the alternative and preferred embodiments of the compounds of the invention described herein also apply.

The maleate co-crystal (s) of the invention inhibit the serine-threonine kinase activity of the aurora kinases, in particular aurora A kinase and/or aurora B kinase and thus inhibit the cell cycle and cell proliferation. Compounds which inhibit aurora B kinase are of particular interest. These properties may be assessed for example, using one or more of the procedures set out below.

10 (a) In Vitro aurora A kinase inhibition test

This assay determines the ability of a test compound to inhibit serine-threonine kinase activity. DNA encoding aurora A may be obtained by total gene synthesis or by cloning. This DNA may then be expressed in a suitable expression system to obtain polypeptide with serine-threonine kinase activity. In the case of aurora A, the coding sequence was isolated from cDNA by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the BamHI and NotI restriction endonuclease sites of the baculovirus expression vector pFastBac HTc (GibcoBRL/Life technologies). The 5' PCR primer contained a recognition sequence for the restriction endonuclease BamHI 5' to the aurora A coding sequence. This allowed the insertion of the aurora A gene in frame with the 6 histidine residues, spacer region and rTEV protease cleavage site encoded by the pFastBac HTc vector. The 3' PCR primer replaced the aurora A stop codon with additional coding sequence followed by a stop codon and a recognition sequence for the restriction endonuclease NotI. This additional coding sequence (5' TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TCT TAA 3') encoded for the polypeptide sequence YPYDVDPDYAS. This sequence, derived from the influenza hemagglutinin protein, is frequently used as a tag epitope sequence that can be identified using specific monoclonal antibodies. The recombinant pFastBac vector therefore encoded for an N-terminally 6 his tagged, C terminally influenza hemagglutinin epitope tagged Aurora-A protein. Details of the methods for the assembly of recombinant DNA molecules can be found in standard texts, for example Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press and Ausubel et al. 1999, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc.

-19-

Production of recombinant virus can be performed following manufacturer's protocol from GibcoBRL. Briefly, the pFastBac-1 vector carrying the aurora A gene was transformed into *E. coli* DH10Bac cells containing the baculovirus genome (bacmid DNA) and via a transposition event in the cells, a region of the pFastBac vector containing
5 gentamycin resistance gene and the aurora A gene including the baculovirus polyhedrin promoter was transposed directly into the bacmid DNA. By selection on gentamycin, kanamycin, tetracycline and X-gal, resultant white colonies should contain recombinant bacmid DNA encoding aurora A. Bacmid DNA was extracted from a small scale culture of several BH10Bac white colonies and transfected into *Spodoptera frugiperda* Sf21 cells
10 grown in TC100 medium (GibcoBRL) containing 10% serum using CellFECTIN reagent (GibcoBRL) following manufacturer's instructions. Virus particles were harvested by collecting cell culture medium 72 hours post transfection. 0.5 ml of medium was used to infect 100 ml suspension culture of Sf21s containing 1×10^7 cells/ml. Cell culture medium was harvested 48 hours post infection and virus titre determined using a standard plaque
15 assay procedure. Virus stocks were used to infect Sf9 and "High 5" cells at a multiplicity of infection (MOI) of 3 to ascertain expression of recombinant aurora A protein.

For the large scale expression of aurora A kinase activity, Sf21 insect cells were grown at 28°C in TC100 medium supplemented with 10% foetal calf serum (Viralex) and 0.2% F68 Pluronic (Sigma) on a Wheaton roller rig at 3 r.p.m. When the cell density
20 reached 1.2×10^6 cells ml^{-1} they were infected with plaque-pure aurora A recombinant virus at a multiplicity of infection of 1 and harvested 48 hours later. All subsequent purification steps were performed at 4°C. Frozen insect cell pellets containing a total of 2.0×10^8 cells were thawed and diluted with lysis buffer (25 mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid]) pH7.4 at 4°C, 100 mM KCl, 25 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1
25 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride), 2 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM imidazole, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin), using 1.0 ml per 3×10^7 cells. Lysis was achieved using a dounce homogeniser, following which the lysate was centrifuged at 41,000g for 35 minutes. Aspirated supernatant was pumped onto a 5 mm diameter chromatography column containing 500 µl Ni NTA (nitrilo-tri-acetic acid)
30 agarose (Qiagen, product no. 30250) which had been equilibrated in lysis buffer. A baseline level of UV absorbance for the eluent was reached after washing the column with 12 ml of lysis buffer followed by 7 ml of wash buffer (25 mM HEPES pH7.4 at 4°C, 100 mM KCl, 20 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol). Bound aurora A protein was

-20-

eluted from the column using elution buffer (25 mM HEPES pH7.4 at 4°C, 100 mM KCl, 400 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol). An elution fraction (2.5 ml) corresponding to the peak in UV absorbance was collected. The elution fraction, containing active aurora A kinase, was dialysed exhaustively against dialysis buffer (25 mM HEPES pH7.4 at 4°C, 45% glycerol (v/v), 100 mM KCl, 0.25% Nonidet P40 (v/v), 1 mM dithiothreitol).

Each new batch of aurora A enzyme was titrated in the assay by dilution with enzyme diluent (25mM Tris-HCl pH7.5, 12.5mM KCl, 0.6mM DTT). For a typical batch (which may be obtained from Upstate), stock enzyme is diluted 1µl per ml with enzyme diluent and 20µl of dilute enzyme is used for each assay well. Test compounds (at 10mM in dimethylsulphoxide (DMSO) were diluted with water and 10µl of diluted compound was transferred to wells in the assay plates. "Total" and "blank" control wells contained 2.5% DMSO instead of compound. Twenty microlitres of freshly diluted enzyme was added to all wells, apart from "blank" wells. Twenty microlitres of enzyme diluent was added to "blank" wells. Twenty microlitres of reaction mix (25mM Tris-HCl, 12.7mM KCl, 2.5mM NaF, 0.6mM dithiothreitol, 6.25mM MnCl₂, 7.5mM ATP, 6.25µM peptide substrate [biotin-LRRWSLGLRRWSLGLRRWSLGLRRWSLG]) containing 0.2µCi [γ ³³P]ATP (Amersham Pharmacia, specific activity ≥ 2500 Ci/mmol) was then added to all test wells to start the reaction. The plates were incubated at room temperature for 60 minutes. To stop the reaction 100µl 20% v/v orthophosphoric acid was added to all wells. The peptide substrate was captured on positively-charged nitrocellulose P30 filtermat (Whatman) using a 96-well plate harvester (TomTek) and then assayed for incorporation of ³³P with a Beta plate counter. "Blank" (no enzyme) and "total" (no compound) control values were used to determine the dilution range of test compound which gave 50% inhibition of enzyme activity (IC₅₀ values).

(b) In Vitro aurora B kinase inhibition test

This assay determines the ability of a test compound to inhibit serine-threonine kinase activity. DNA encoding aurora B may be obtained by total gene synthesis or by cloning. This DNA may then be expressed in a suitable expression system to obtain polypeptide with serine-threonine kinase activity. In the case of aurora B, the coding sequence was isolated from cDNA by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pFastBac system in a manner similar to that described above for aurora A (i.e. to direct expression of a 6-histidine tagged aurora B protein).

-21-

For the large scale expression of aurora B kinase activity, Sf21 insect cells were grown at 28°C in TC100 medium supplemented with 10% foetal calf serum (Viralex) and 0.2% F68 Pluronic (Sigma) on a Wheaton roller rig at 3 r.p.m. When the cell density reached 1.2×10^6 cells ml^{-1} they were infected with plaque-pure aurora B recombinant virus at a multiplicity of infection of 1 and harvested 48 hours later. All subsequent purification steps were performed at 4°C. Frozen insect cell pellets containing a total of 2.0×10^8 cells were thawed and diluted with lysis buffer (50 mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid]) pH7.5 at 4°C, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride), 1 mM dithiothreitol, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin), using 1.0 ml per 2×10^7 cells. Lysis was achieved using a sonication homogeniser, following which the lysate was centrifuged at 41,000g for 35 minutes. Aspirated supernatant was pumped onto a 5 mm diameter chromatography column containing 1.0 ml CM sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) which had been equilibrated in lysis buffer. A baseline level of UV absorbance for the eluent was reached after washing the column with 12 ml of lysis buffer followed by 7 ml of wash buffer (50 mM HEPES pH7.4 at 4°C, 1 mM dithiothreitol). Bound aurora B protein was eluted from the column using a gradient of elution buffer (50 mM HEPES pH7.4 at 4°C, 0.6 M NaCl, 1 mM dithiothreitol, running from 0% elution buffer to 100% elution buffer over 15 minutes at a flowrate of 0.5 ml/min). Elution fractions (1.0 ml) corresponding to the peak in UV absorbance was collected. Elution fractions were dialysed exhaustively against dialysis buffer (25 mM HEPES pH7.4 at 4°C, 45% glycerol (v/v), 100 mM KCl, 0.05% (v/v) IGEPAL CA630 (Sigma Aldrich), 1 mM dithiothreitol). Dialysed fractions were assayed for aurora B kinase activity.

Aurora B-INCENP enzyme (as supplied by Upstate) was prepared by activating aurora B (5µM) in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1 % 2-mercaptoethanol, 0.1 mM sodium vandate, 10 mM magnesium acetate, 0.1 mM ATP with 0.1 mg/ml GST-INCENP [826 - 919] at 30 °C for 30 minutes.

Each new batch of aurora B-INCENP enzyme was titrated in the assay by dilution with enzyme diluent (25mM Tris-HCl pH7.5, 12.5mM KCl, 0.6mM DTT). For a typical batch, stock enzyme is diluted 15µl per ml with enzyme diluent and 20µl of dilute enzyme is used for each assay well. Test compounds (at 10mM in dimethylsulphoxide (DMSO)) were diluted with water and 10µl of diluted compound was transferred to wells in the assay plates. "Total" and "blank" control wells contained 2.5% DMSO instead of compound.

-22-

Twenty microlitres of freshly diluted enzyme was added to all wells, apart from "blank" wells. Twenty microlitres of enzyme diluent was added to "blank" wells. Twenty microlitres of reaction mix (25mM Tris-HCl, 12.7mM KCl, 2.5mM NaF, 0.6mM dithiothreitol, 6.25mM MnCl₂, 15mM ATP, 6.25µM peptide substrate [biotin-LRRWSLGLRRWSLGLRRWSLGLRRWSLG]) containing 0.2µCi [γ ³³P]ATP (Amersham Pharmacia, specific activity ≥ 2500 Ci/mmol) was then added to all test wells to start the reaction. The plates were incubated at room temperature for 60 minutes. To stop the reaction 100µl 20% v/v orthophosphoric acid was added to all wells. The peptide substrate was captured on positively-charged nitrocellulose P30 filtermat (Whatman) using a 96-well plate harvester (TomTek) & then assayed for incorporation of ³³P with a Beta plate counter. "Blank" (no enzyme) and "total" (no compound) control values were used to determine the dilution range of test compound which gave 50% inhibition of enzyme activity (IC₅₀ values).

15 (c) *In vitro* cell phenotype and substrate phosphorylation assay

This assay is used to determine the cellular effects of compounds on SW620 human colon tumour cells *in vitro*. Compounds typically cause inhibition of levels of phosphohistone H3 and an increase in the nuclear area of the cells.

10⁴ SW620 cells per well were plated in 100µl DMEM media (containing 10 % FCS and 1 % glutamine) (DMEM is Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma D6546)) in costar 96 well plates and left overnight at 37°C and 5% CO₂ to adhere. The cells were then dosed with compound diluted in media (50 µl is added to each well to give 0.00015µ - 1 µM concentrations of compound) and after 24 hours of treatment with compound, the cells were fixed.

25 The cells were first examined using a light microscope and any cellular changes in morphology were noted. 100 µl of 3.7 % formaldehyde was then added to each well, and the plate was left for at least 30 minutes at room temperature. Decanting and tapping the plate on a paper towel removed the fixative and plates were then washed once in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma D8537)) using an automated plate washer. 100 µl PBS and 0.5 % triton X-100 was added and the plates were put on a shaker for 5 minutes. The plates were washed in 100 µl PBS and solution tipped off. 50 µl of primary antibody, 1:500 rabbit anti-phosphohistone H3 in PBS 1% BSA (bovine serum albumin) and 0.5 % tween, was added. Anti-phosphohistone H3 rabbit polyclonal 06-750 was

-23-

purchased from Upstate Biotechnology. The plates were left 1 hour at room temperature on a shaker.

The next day, the antibody was tipped off and the plates were washed twice with PBS. In an unlit area, 50 µl of secondary antibody, 1:10,000 Hoechst and 1:200 Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgGA (cat no. 11008 molecular probes) in PBS 1 % BSA, 0.5 % tween was added. The plates were wrapped in tin foil and shaken for 1 hour at room temperature. The antibody was tipped off and plates were washed twice with PBS. 200 µl PBS was added to each well, and the plates were shaken for 10 minutes, PBS was removed. 100 µl PBS was added to each well and the plates were sealed ready to analyse. Analysis was carried out using an Arrayscan Target Activation algorithm to measure cellular levels of phosphohistone H3 and changes in nuclear area. Results were reported as the effective concentration required to give 50% inhibition of phosphohistone H3 levels and similarly for a 50% increase in nuclear area of cells (EC50 values).

The invention is illustrated herein by means of non-limiting Examples, data and Figures in which, unless otherwise stated:-

- (i) yields are given for illustration only and are not necessarily the maximum attainable;
- (ii) where product is used for seeding it can be obtained by prior known process such as those described in WO 2004/058781;
- (iii) the identity of AZD1152 maleate co-crystal prepared as described herein was confirmed by ¹H NMR at 400 MHz in hexadeuterated dimethylsulphoxide with added tetramethylsilane (TMS) for reference (TMS = 0.00 ppm).

As described herein AZD1152 and AZD1152 HQPA are disclosed in WO 2004/058781. The process details provided in WO2004/058781 in relation to AZD1152, AZD1152 HQPA and all the intermediates en route to said compounds are incorporated herein by reference in their entirety.

Preparation Method 1

Step 1 - Preparation of 7-(3-hydroxypropoxy)quinazolin-4(3H)-one

2-Amino-4-fluorobenzoic acid and 1,3-propanediol were stirred together and heated to 120°C. Formamidine acetate was added and the mixture stirred for 3.5 hour to yield 7-fluoroquinazoline-4-one. A solution of potassium hydroxide in 1,3-propanediol was then

-24-

added to the mixture over a period of 2 hours and 50 minutes, which was then cooled to 15°C. Following this, the mixture was heated to 125°C for 5 hours before cooling to 75°C. Dilute hydrochloric acid (about 6%w/w) was gradually added to the reaction mixture until pH 4.5 was achieved. The mixture was cooled to 0°C over 6 hours and maintained at that temperature for a further hour prior to isolation of the crude product by centrifugation. The crude material was washed with water and dried *in vacuo* before dissolving in methanol at gentle reflux and partially concentrating under reduced pressure at a temperature of 42°C. This solution was then cooled to 0°C over a period of 3 hours and the resultant product was isolated by filtration, prior to drying *in vacuo*. 7-(3-Hydroxypropoxy)quinazolin-4(3H)-one was recovered in a 73% yield.

¹H-NMR (DMSO d₆) : 11.90 (br s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.10 (m, 2H), 4.17 (t, 2H), 3.58 (t, 2H), 1.92 (m, 2H) :

MS (+ve ESI) : 221 (M+H)⁺

Step 2 - Preparation of 4-chloro-7-(3-chloropropoxy)quinazoline

7-(3-Hydroxypropoxy)quinazolin-4(3H)-one, toluene and *N,N*-diisopropyl-formamide (DIPF) were mixed together and heated to 76°C, before thionyl chloride was added over a period of 1 hour at 76°C. Additional thionyl chloride was then added over a period of 1 hour after which the temperature was maintained at 76°C for 1 hour. The mixture was refluxed for 11 hours to effect a clear solution which was cooled to 38°C and subjected to vacuum distillation to remove toluene and thionyl chloride. Toluene was then added and the solution kept at 35°C whilst it was clarified with a filter aid (celite or harborlite and activated carbon). The resulting solution was partially concentrated before heptane was added and the mixture chilled to 0°C and stirred for 23 hours. The light brown suspension that formed was isolated by filtration, washed with cold heptane then dried *in vacuo* at 30°C to yield 4-chloro-7-(3-chloropropoxy)quinazoline (63.6%)

¹H-NMR (DMSO d₆) : 13.25 (br s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.17 (m, 2H), 4.21 (t, 2H), 3.83 (t, 2H), 2.23 (m, 2H) :

MS (+ve ESI) : 257, 259 (M+H)⁺.

-25-

Step 3 - Preparation of (3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)acetic acid

4-Chloro-7-(3-chloropropoxy)quinazoline was added to 1 molar equivalent of a solution of (3-amino-1H-pyrazol-5-yl)acetic acid in *N*-methylpyrrolidinone (NMP) and then left for a period of 12 hours. Crystallisation of the product was observed to occur with and without seeding and with and without the addition of acetonitrile as an anti-solvent. The resultant solid was isolated by filtration, washed with *N*-methylpyrrolidinone and acetonitrile and then dried *in vacuo* to yield (3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)acetic acid.hydrochloride as an off-white solid:

¹H-NMR (DMSO *d*₆; contains NMP as a solvate) : 8.92 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.46 (pr of d, 1H), 7.38 (d, 1H), 6.7 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.85 (t, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.3 (t, 2H), 2.7 (s, 3H), 2.51 (m, 6H), 2.27 (m, 2H), 2.18 (t, 2H), 1.93 (m, 2H).

MS (+ve ESI) : 362.1015 (M+H)⁺.

Step 4 - Preparation of 2-(3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)-N-(3-fluorophenyl)acetamide

4-Dimethylaminopyridine (DMAP), *N*-methylmorpholine and 3-fluoroaniline (in a large excess) were added to a suspension of (3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)acetic acid.hydrochloride in *N,N*-dimethylacetamide (DMA) and the resulting slurry was stirred at or below room temperature. A solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDCI.HCl) previously dissolved in water was then added in a controlled manner over a period of 8 hour so as to maintain the reaction at ambient temperature. The mixture was seeded with a small amount of product and left to stir for several hours. Anti-solvent acetonitrile followed by water were also added to precipitate more product. The material was isolated by filtration and the cake washed with a mixture of *N,N*-dimethylacetamide : water : acetonitrile, warm acetonitrile and then dried (*in vacuo* or under a stream of nitrogen) to yield 2-(3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)-N-(3-fluorophenyl)acetamide.

¹H-NMR (DMSO *d*₆; contains residual DMA): 10.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.59 (pr of m, 1H), 7.46(pr of d, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.95 (s), 2.83 (s), 2.56 (s), 2.25 (m, 2H), 1.95 (s) :

MS (+ve ESI) : 455 (M+H)⁺.

-26-

Step 5 - Preparation of 2-{3-[(7-{3-[ethyl(2-hydroxyethyl)amino]propoxy}-quinazolin-4-yl)amino]-1H-pyrazol-5-yl}-N-(3-fluorophenyl)acetamide (AZD1152 HOPA)

2-(3-{[7-(3-Chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)-N-(3-fluorophenyl)acetamide and 2-(ethylamino)ethanol (12 molar equivalents) were added to
 5 *N,N*-dimethylacetamide under an inert atmosphere (such as provided by nitrogen) and the mixture heated to 90°C with stirring. After 12 hours, water was added in a controlled manner and the batch seeded with product whilst hot. The mixture was cooled to 20°C in a carefully controlled manner to crystallise the product in the required form. The product was then filtered and washed with a mixture of water/ *N,N*-dimethylacetamide and
 10 acetonitrile. Following this, the cake was slurried for a period with warm acetonitrile (40°C), filtered, washed with more acetonitrile and then dried (*in vacuo* or under a stream of nitrogen) to afford the anhydrous 2-{3-[(7-{3-[ethyl(2-hydroxyethyl)amino]propoxy}-quinazolin-4-yl)amino]-1H-pyrazol-5-yl}-N-(3-fluorophenyl)acetamide as an off-white solid in a yield of ~90%.

15 ¹H-NMR (DMSO *d*₆): 10.55 (s, 1H), 9.45 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.63 (pr of m, 1H), 7.47 (pr of d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.76 (t, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.25 (m, 4H), 2.25 (m, 2H), 1.25 (t, 3H): MS (+ve ESI) : 508.4 (M+H)⁺.

20 **Step 6 - Preparation of mono(*tert*-butyl) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-pyrazol-3-yl)amino]-quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate [AZD1152 t-Bu P(5)ester]**

2-{3-[(7-{3-[Ethyl(2-hydroxyethyl)amino]propoxy}-quinazolin-4-yl)amino]-1H-pyrazol-5-yl}-N-(3-fluorophenyl)acetamide and pyridine.hydrochloride were mixed in *N,N*-
 25 dimethylacetamide and the solution chilled to -15°C. Di-*tert*-butyl diethylphosphoramidite (1.5 – 2.1 molar equivalents) was then added whilst the temperature was maintained. The reaction mixture was treated *in situ* with 30% w/w hydrogen peroxide (about 4.2 mole equivalents) whilst the temperature was kept below ambient temperature. Remaining hydrogen peroxide was destroyed by the addition of
 30 sodium metabisulphite (as a 10% w/v aqueous solution) whilst maintaining the temperature below 40°C. The resulting solution of di-*tert*-butyl 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate was then heated to 40°C and sodium

-27-

hydroxide solution (2M) added to adjust to pH 5 – 6.5. The temperature and pH was maintained for a period of about 90 minutes with seeding. Water was then charged and the pH adjusted further to within the range pH 8 – 9 to optimise the recovery. The warm reaction mixture was filtered directly to afford mono-*tert*-butyl 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate which was washed with a mixture of *N,N*-dimethylacetamide/water and water and finally dried (*in vacuo* or a stream of a suitable inert gas) to afford mono(*tert*-butyl) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate as an off-white solid at a yield of between 86 – 93%.

¹H-NMR (DMSO *d*₆): 10.48 (s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.67 (pr of m, 1H), 7.48 (pr of d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.34 (t, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (t, 3H):

MS (+ve ESI) : (M+H)⁺ 644.2761 fragment (less butyl) 588.2147.

Step 7 - Preparation of 2-{ethyl[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate (AZD1152)

Mono(*tert*-butyl) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate was suspended in a 1:1 mixture of water/tetrahydrofuran (THF) and treated at elevated temperatures (preferably 50-60°C) with an excess of between 1.5 and 3.0 molar equivalents of hydrochloric acid for a period of about 1 hour. The hot solution was then basified using 2.0M sodium hydroxide to within the range pH 4.5-5.5, cooled to 60°C and seeded. Water was added to the slurry in a controlled manner with controlled cooling of the crystallisation mixture to room temperature and the product was isolated by filtration. The filter-cake was washed with water and dried *in vacuo*. After drying, the solid 2-{ethyl[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate was equilibrated under ambient conditions to constant weight to give a hydrated form as a pale yellow needle-like material.

¹H-NMR (DMSO *d*₆) :

-28-

MS (+ve ESI) : 587.8 (M+H)⁺

¹H-NMR (DMSO d₆) : 10.53 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.13 (q, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.24 (t, 3H) :

5 MS (+ve ESI) : 588 (M+H)⁺.

C₂₆H₃₁FN₇O₆P + 3.0 H₂O requires C, 48.7%; H, 5.8%; N, 15.3%; Found C, 48.8%; H, 5.35%; N, 15.15%.

10 **Step 8 - Preparation of 2-{ethyl[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate.maleate [AZD1152 maleate]**

2-Butenedioic acid (Z) (1.57 molar equivalents; 449.80 µmoles; 52.21 mg) was dissolved in methanol (123.54 mmol; 5.00 ml; 3.96 g) and to this solution was added a previously prepared methanolic solution of AZD1152 (as the free form trihydrate - 1.00 molar
15 equivalents, 286.14 µmoles; 40.00 mL; 31.87 g) followed by more methanol (123.54 mmol; 5.00 mL; 3.96 g). The mixture was left to stir overnight at room temperature. A white suspension was produced and the solid recovered by filtration then dried *in vacuo*. Analysis by NMR confirmed the co-crystal was the maleate.

20 **Alternative Step 8:**

Crude AZD1152 (estimated at 7.44g @ 100%, 11.61 millimoles) was added to dimethylsulphoxide (36ml) and left at ambient to produce a pale brown solution. To this solution was added a solution of maleic acid (1.76g, 15.16 millimoles, 1.31 mole equivalents) in methanol (36ml) and the mixture left to stand overnight at ambient
25 temperature. Next day an aliquot of the clear solution was transferred to a vial, scratched and left sealed for several hours. A deposit of white solid formed and this was transferred to the flask and left to stir. Gradually the solution turned turbid and solid deposited. The slurry was left to settle for several days and finally filtered. The cake was washed with a 1:1 mixture of dimethylsulphoxide/methanol (15ml in total), slurried *in situ* with methanol
30 (3 x 25ml) and then dried *in vacuo*. NMR confirmed the solid to be the maleate co-crystal of AZD1152 (in about a 78.7% yield).

-29-

Preparation Method 2**Step 1 - Preparation of 2-(3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)-N-(3-fluorophenyl)acetamide**

5 To a suspension of (3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)acetic acid.hydrochloride (prepared as described in Preparation Method 1 above) in *N,N*-dimethylacetamide (DMA) is added 4-dimethylaminopyridine (DMAP) whilst maintaining a temperature of 15 - 25°C (ideally 15°C) followed by *N*-methylmorpholine whilst also maintaining the temperature. 3-Fluoroaniline (in a large excess which ideally is

10 between 10 – 15 mole equivalents) is added at such a rate as to maintain the temperature below 25°C. Meanwhile 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDCI.HCl) is dissolved in water to afford a solution about 42% w/v (the quantity of water present is important to the outcome of the crystallisation later in the process). This solution is added in a controlled manner to the slurry over a period of 8 hour so as to

15 maintain the reaction between 20 - 25°C; then the mixture is seeded with crystals of the preferred form of the product (ideally an amount of about 1% of the expected yield). The mixture is stirred for about 16 hours whilst maintaining the temperature (ideally 20 - 25°C) then anti-solvents acetonitrile followed by water are added in a controlled manner and to maintain the temperature between 20 - 25°C followed by an extended stir of about 21

20 hours; this is to optimise the recovery and form of the product. The material is isolated by filtration and the cake washed with a mixture of *N,N*-dimethylacetamide : water : acetonitrile (volume ratios of 5 : 3 : 2), acetonitrile and then dried (*in vacuo* or under a stream of nitrogen) to afford 2-(3-{[7-(3-chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)-*N*-(3-fluorophenyl)acetamide containing some DMA in about 76 - 78%

25 yield.

¹H-NMR (DMSO d₆; contains residual DMA): 10.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.59 (pr of m, 1H), 7.46(pr of d, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.95 (s), 2.83 (s), 2.56 (s), 2.25 (m, 2H), 1.95 (s) :

MS (+ve ESI) : 455 (M+H)⁺.

30

Step 2 - (Preparation of 2-{3-[(7-{3-[ethyl(2-hydroxyethyl)amino]propoxy}-quinazolin-4-yl)amino]-1H-pyrazol-5-yl}-N-(3-fluorophenyl)acetamide (AZD1152 HOPA)

5 2-(3-{[7-(3-Chloropropoxy)quinazolin-4-yl]amino}-1H-pyrazol-5-yl)-N-(3-fluorophenyl)acetamide and 2-(ethylamino)ethanol (ideally 12 molar equivalents) were added to *N,N*-dimethylacetamide under an inert atmosphere (such as provided by nitrogen) and the mixture heated to 90°C with stirring. After a period of 12 – 16 hours (ideally 12 hours) the reaction is cooled back to about 85°C and water added in a controlled manner to
 10 maintain the temperature between 80 - 85°C. The batch is adjusted to 80°C and seeded with crystals of the preferred form of the product (ideally an amount of about 1% of the expected yield). The mixture was cooled to 20°C in a carefully controlled manner over a period of about 20 hours so as to crystallise the product in the required form and of a size sufficient to afford a good filtration rate. The product is then filtered and washed with a
 15 mixture of water / *N,N*-dimethylacetamide and acetonitrile and suitably deliquored to afford a hydrated form of the product. Following this, the cake is slurried *in situ* for a period (ideally 2 hours) with warm acetonitrile (ideally at a temperature of 40°C) then filtered, washed with more acetonitrile and then dried (*in vacuo* or under a stream of nitrogen) to afford the almost anhydrous 2-{3-[(7-{3-[ethyl(2-
 20 hydroxyethyl)amino]propoxy}-quinazolin-4-yl)amino]-1H-pyrazol-5-yl}-N-(3-fluorophenyl)acetamide as an off-white solid in a yield of 85 - 90%.

¹H-NMR (DMSO *d*₆): 10.55 (s, 1H), 9.45 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.63 (pr of m, 1H), 7.47 (pr of d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.76 (t, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.25 (m, 4H), 2.25 (m, 2H), 1.25 (t, 3H):
 25 MS (+ve ESI) : 508.4 (M+H)⁺.

Step 3 - Preparation of mono(*tert*-butyl) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-pyrazol-3-yl)amino]-quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate [AZD1152 t-Bu P(5)ester]

30

To a slurry of pyridine.hydrochloride in *N,N*-dimethylacetamide was charged a solution of 2-{3-[(7-{3-[Ethyl(2-hydroxyethyl)amino]propoxy}-quinazolin-4-yl)amino]-1H-pyrazol-5-yl}-N-(3-fluorophenyl)acetamide and di-*tert*-butyl diethylphosphoramidite (ideally 1

-31-

molar equivalents) in *N,N*-dimethylacetamide over an extended period (ideally 3 hours) and maintaining the temperature between -20 to -10°C (ideally -15°C). This is followed by the further addition of di-*tert*-butyl diethylphosphoramidite (ideally 0.5 molar equivalents) during a period of 1 hour also maintaining the temperature between -20 to -10°C (ideally -15°C).

The reaction mixture is treated *in situ* with 30% w/w hydrogen peroxide (about 4.2 mole equivalents) whilst the temperature was kept below -10°C (ideally -12 to -8°C) and held for a period at this temperature (ideally 16 hours). Remaining hydrogen peroxide is destroyed by the addition of sodium metabisulphite (as a 10% w/v aqueous solution) whilst maintaining the temperature below 40°C.

The resulting solution of di-*tert*-butyl 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethylamino)ethyl phosphate was then heated to 40°C and sodium hydroxide solution (ideally 2M) added to adjust to pH 5.5 - 6.5 (ideally pH 6) with seeding with suitably crystalline material. The temperature is held and a range of pH 5-6 maintained by the addition of extra sodium hydroxide solution for a period of at least 2 hours. Water is then charged and the pH adjusted further to within the range pH 8 - 9 (ideally pH 8.8) whilst maintaining the temperature (ideally 40°C but within range 35 - 45°C) for a period of 16 hours so as to optimise the recovery. The warm reaction mixture is filtered directly to afford mono-*tert*-butyl 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethylamino)ethyl phosphate which was washed several times with water and finally dried (either *in vacuo* or a stream of a suitable inert gas) to afford the mono(*tert*-butyl) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]-quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethylamino)ethyl phosphate as an off-white solid at a yield of between 86 - 93%.

¹H-NMR (DMSO d₆): 10.48 (s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.67 (pr of m, 1H), 7.48 (pr of d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.34 (t, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (t, 3H):

MS (+ve ESI) : (M+H)⁺ 644.2761 fragment (less butyl) 588.2147.

-32-

Step 4 - Preparation of 2-{ethyl[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl})-1H-pyrazol-3-yl]amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate (AZD1152)

5 Mono(*tert*-butyl) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl})-1H-pyrazol-3-yl]amino]-quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl phosphate was suspended in a mixture of water / tetrahydrofuran (THF) and treated with an excess of between 1.5 and 3.0 molar equivalents of hydrochloric acid (ideally of a concentration of 2M and containing 1.5 mole equivalents). The mixture is heated to 55 - 65°C (ideally 60°C) and held at 60°C
10 for about 1 hour. The hot solution is then basified using sodium hydroxide (preferably of 2M concentration and containing 1.7 mole equivalents) to afford a pH within the range pH 5.0 - 5.5 and then seeded at 55 - 65°C (ideally 60°C) with crystals of the preferred form of the product (ideally an amount of about 0.05% w/w of the expected yield). The mixture is stirred at this temperature for at least one hour before water is added and the slurry stirred
15 and cooled in a controlled manner over a period of about 12 hours prior to stirring at ambient temperature for at least 4 hours and then isolating the product by filtration. The filter-cake is washed successively with water then THF and dried either *in vacuo* or using a humidification procedure whereby an inert gas dampened with water vapour is passed over the solid until a constant weight is obtained. After the drying *in vacuo* the solid 2-{ethyl[3-
20 ({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl})-1H-pyrazol-3-yl]amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate is equilibrated under ambient conditions to constant weight to give a hydrated form as a pale yellow needle-like material. The product is obtained in about 81% yield.

¹H-NMR (DMSO d₆) :

25 MS (+ve ESI) : 587.8 (M+H)⁺

¹H-NMR (DMSO d₆) : 10.53 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.13 (q, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.24 (t, 3H) :

MS (+ve ESI) : 588 (M+H)⁺.

30 C₂₆H₃₁FN₇O₆P + 3.0 H₂O requires C, 48.7%; H, 5.8%; N, 15.3%; Found C, 48.8%; H, 5.35%; N, 15.15%.

Step 5 - Preparation of 2-{ethyl}[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate.maleate [AZD1152 maleate]

5

2-Butenedioic acid (Z) (1.57 molar equivalents; 449.80 μ moles; 52.21 mg) was dissolved in methanol (123.54 mmol; 5.00 ml; 3.96 g) and to this solution was added a previously prepared methanolic solution of AZD1152 (as the free form trihydrate - 1.00 molar equivalents, 286.14 μ moles; 40.00 mL; 31.87 g) followed by more methanol (123.54 mmol; 5.00 mL; 3.96 g). The mixture was left to stir overnight at room temperature. A white suspension was produced and the solid recovered by filtration then dried *in vacuo*. Analysis by NMR confirmed the co-crystal was the maleate of AZD1152.

10

Alternative to Step 5 above:

15

Crude AZD1152 (estimated at 7.44g @ 100%, 11.61 millimoles) was added to dimethylsulphoxide (36ml) and left at ambient to produce a pale brown solution. To this solution was added a solution of maleic acid (1.76g, 15.16 millimoles, 1.31 mole equivalents) in methanol (36ml) and the mixture left to stand overnight at ambient temperature. Next day an aliquot of the clear solution was transferred to a vial, scratched and left sealed for several hours. A deposit of white solid formed and this was transferred to the flask and left to stir. Gradually the solution turned turbid and solid deposited. The slurry was left to settle for several days and finally filtered. The cake was washed with a 1:1 mixture of dimethylsulphoxide/methanol (15ml in total), slurried *in situ* with methanol (3 x 25ml) and then dried *in vacuo*. Analysis by NMR confirmed the co-crystal was the maleate of AZD1152 (in about a 78.7% yield).

20

25

Further alternative to Step 5 above:

AZD1152 (as the free form trihydrate - 1.00 molar equivalent, 8.51 mmol; 5.74 g) and 2-butenedioic acid (Z) (1.20 molar equivalents; 10.2 mmol; 1.19 g) are dissolved in dimethylsulphoxide (35ml) and heated to 60°C. The anti-solvent acetonitrile (20 ml) was added to the hot mixture then the mixture is seeded with crystals of the preferred form of the product AZD1152 Maleate (0.005 molar equivalents; 42.6 micromol; 30.7 mg - ideally an amount of about 0.5% w/w of the expected yield). The reaction mixture is held

30

-34-

at 60°C for 4 hours before a further charge of acetonitrile (40 ml) is added over a period of 3 hours. The mixture is left agitating at 60°C for 12 – 20 hours (ideally 16 hours). The reaction is cooled to 20°C in a controlled manner and the product isolated by filtration. The cake is washed with a mixture of dimethylsulphoxide / acetonitrile (1 : 2 volume ratio) followed by acetonitrile. The solid is dried *in vacuo* or under a stream of warm inert gas (ideally 40°C) to afford the AZD1152 Maleate as a white solid in about 88% yield.

Brief Description of the Drawings

Figure 1: X-Ray Powder Diffraction Pattern for the maleate co-crystal of AZD1152 (prepared by Method 1 above) - with the 2θ values plotted on the horizontal axis and the relative line intensity (count) plotted on the vertical axis.

Figure 2: A Differential Scanning Calorimetry Thermogram for AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Method 1 above.

Figure 3: A Differential Scanning Calorimetry Thermogram for AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Method 2 above.

Figure 4: Dynamic Vapour Sorption Isotherm plot for a batch of AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Method 1 above.

Figure 5: Dynamic Vapour Sorption Isotherm plot for a batch of AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Method 2 above.

Figure 6: Dynamic Vapour Sorption Isotherm plot for AZD1152 free form.

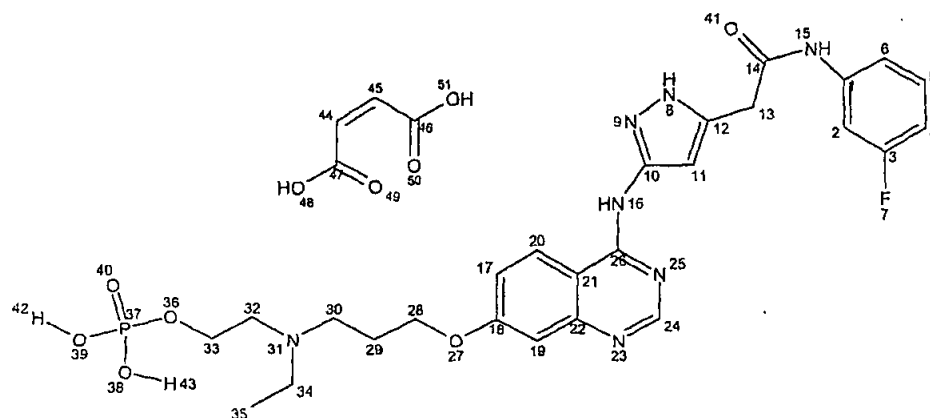
Figure 7: X-Ray Powder Diffraction Pattern for the maleate co-crystal of AZD1152 (prepared by Method 2 above) - with the 2θ values plotted on the horizontal axis and the relative line intensity (count) plotted on the vertical axis.

Characterisation Data

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The structure and approximate ratio of components in the co-crystal can be confirmed with proton NMR spectroscopy. Typical data are shown below.

-35-



Chemical shift / ppm		Chemical shift / ppm	
Atom	¹ H	Atom	¹ H
1	NR	27	NR
2	7.63 (m)	28	4.32 (2H t, 5.8)
3	NR	29	2.25 (m)
4	6.89 (m)	30	3.37 (m)
5	7.33 (m)	31	NR
6	7.37 (m)	32	3.48 (m)
7	NR	33	4.22 (m)
8	9.76* (s, broad)	34	3.30 (2H q, 7.1)
9	NR	35	1.28 (3H t, 7.1)
10	NR	36	NR
11	6.77 (s)	37	NR
12	NR	38	NR
13	3.85 (s)	39	NR
14	NR	40	NR
15	10.51 (s)	41	NR
16	11.99* (s, broad)	42	14.0 (s, broad)
17	7.48 (dd, 9.1, 2.4)	43	14.0 (s, broad)
18	NR	44	6.28 (s)
19	7.29 (d, 2.4)	45	6.28 (s)
20	8.81(d, 9.3)	46	NR

-36-

Chemical shift / ppm		Chemical shift / ppm	
Atom	¹ H	Atom	¹ H
21	NR	47	NR
22	NR	48	14.0 (s, broad)
23	NR	49	NR
24	8.98(s)	50	NR
25	NR	51	14.0 (s, broad)
26	NR		

NR = No Resonance

NMR integration fits approximately with a 1 : 1.04 maleic acid to AZD1152 ratio.

Differential Scanning Calorimetry

5 Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis was conducted on AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Preparation Methods 1 and 2 using a Mettler DSC820e. Samples of typically less than 5mg of material contained in a 40µl aluminium pan fitted with a pierced lid were heated over the temperature range 25°C to 325°C at a constant heating rate of 10°C per minute. A purge gas using nitrogen was used - flow rate
10 100 ml per minute.

The results for a batch of AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Method 1 above (see figure 2) indicate that the maleate co-crystal shows a large, sharp endotherm with an onset temperature of 180°C due to melting. Following the melt a large endothermic event is observed due to the degradation of the maleic acid following the
15 melt. It will be understood that the onset and/or peak temperature values of the DSC may vary slightly from one machine to another, one method to another or from one sample to another, and so the values quoted are not to be construed as absolute.

The results for the AZD1152 maleate co-crystal prepared by Method 2 above (see figure 3) indicate that the maleate co-crystal shows a large, sharp endotherm with an onset
20 temperature of 183°C due to melting. Following the melt a large endothermic event is observed due to the degradation of the maleic acid following the melt. It will be understood that the onset and/or peak temperature values of the DSC may vary slightly from one machine to another, one method to another or from one sample to another, and so the values quoted are not to be construed as absolute.

Dynamic Vapour Sorption

Analytical Instrument: Surface Measurements Systems Dynamic Vapour Sorption Analyser.

- 5 About 5 mg of material contained in a quartz holder at a specified temperature was subjected to humidified nitrogen at a flow rate of 200 ml/minute of nitrogen at 25°C at the following relative humidities (RH): 0, 20, 40, 60, 80, 95, 80, 60, 40, 20, 0% RH in duplicate.

10 The weight of the material at a particular relative humidity was monitored until it was stable according to a weight criteria of 0.002% weight change per minute averaged over 10 minutes. If the weight was still changing then it stayed at a particular relative humidity until the weight was stable (up to a maximum time of 12 hours).

The results for a batch of AZD1152 maleate co-crystal prepared according to Method 1 are shown in Figure 4. The results for a batch of AZD1152 maleate co-crystal
15 prepared according to Method 2 above are shown in Figure 5.

The Dynamic Vapour Sorption results shown in Figures 4 and 5 indicate that the sample is non-hygroscopic and the weight uptake is attributed to surface adsorption. The weight loss observed in Figure 5 during Cycle 1 is attributed to a small amount of solvent present in the sample from manufacture. This is confirmed by the reduced weight at
20 0%RH. Once this solvent has evaporated the material maintains its weight at 0%RH. This observation will be fully understood by the person skilled in the art.

The Dynamic Vapour Sorption of AZD1152 free form is shown in Figure 6.

Dynamic Vapour Sorption of AZD1152 free form indicates that the level of water is quite variable depending on the relative humidity of storage. This change in water level
25 is due to different hydration states which can range from a dehydrated state to a tetrahydrated state and higher.

X-Ray Powder Diffraction

It is stated above that the X-ray powder diffraction pattern for the maleate co-crystal of AZD1152 is shown in Figure 1.
30

A further manufacturing method for AZD1152 maleate has been presented in Method 2 above. The X-ray powder diffraction pattern for the maleate co-crystal of

-38-

AZD1152 produced by Method 2 is shown in Figure 7. The key peaks are shown in table 2 below.

Table 2

Angle (2-theta)	Relative intensity (%)	Angle (2-theta)	Relative intensity (%)
5.13	80.3	22.45	13.5
6.45	57.9	23.22	21.8
8.14	40.5	23.58	33.8
10.18	9.1	23.98	20.8
11.96	7.8	24.30	14.8
12.85	58.4	24.65	16.1
13.85	14.3	25.56	27.8
14.96	12.5	25.83	52.5
15.27	25.7	26.37	35.6
15.75	13	27.98	38.4
16.53	19.7	28.44	34.3
17.29	23.6	28.91	16.9
19.31	100	29.72	29.6
19.78	55.1	30.34	13
20.10	99.5	32.72	14.5
20.60	40.5	36.21	22.3
21.01	20.5	38.18	11.9
21.68	82.3		

As stated above, it is known in the art that an X-ray powder diffraction pattern may be obtained which has one or more measurement errors depending on measurement conditions (such as equipment, sample preparation or machine used). In particular, it is generally known that intensities in an X-ray powder diffraction pattern may fluctuate depending on measurement conditions and sample preparation. For example, persons skilled in the art of X-ray powder diffraction will realise that the relative intensity of peaks can be affected by, for example, grains above 30 microns in size and non-unitary aspect ratios, which may affect analysis of samples. The skilled person will also realise that the position of reflections can be affected by the precise height at which the sample sits in the diffractometer and the zero calibration of the diffractometer. The surface planarity of the sample may also have a small effect. Hence a person skilled in the art will appreciate that the diffraction pattern data presented herein is not to be construed as absolute (for further information see Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996).

-39-

It is also stated above that, in general, a measurement error of a diffraction angle in an X-ray powder diffractogram is about $2\text{-}\theta = 0.5^\circ$ or less (or, more suitably, about $2\text{-}\theta = 0.2^\circ$ or less) and such degree of a measurement error should be taken into account when considering the X-ray powder diffraction pattern in Figure 1, and when interpreting the peak positions referred to in the text above and in Table 1.

With this in mind, a person skilled in the art will appreciate that the data presented in Figure 7 and Table 2 above indicate that the maleate co-crystal of AZD1152 produced by Method 2 is the same crystalline form as the maleate co-crystal of AZD1152 produced by Method 1 (and shown in Figure 1 and Table 1).

10

15

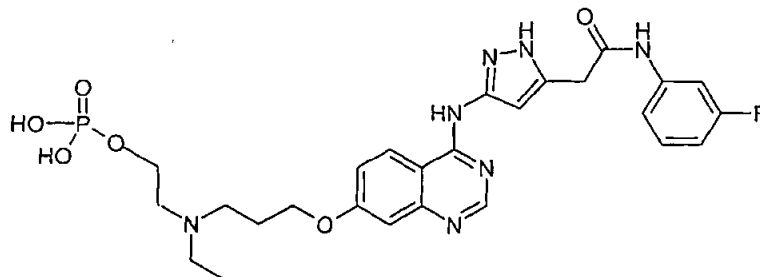
20

25

30

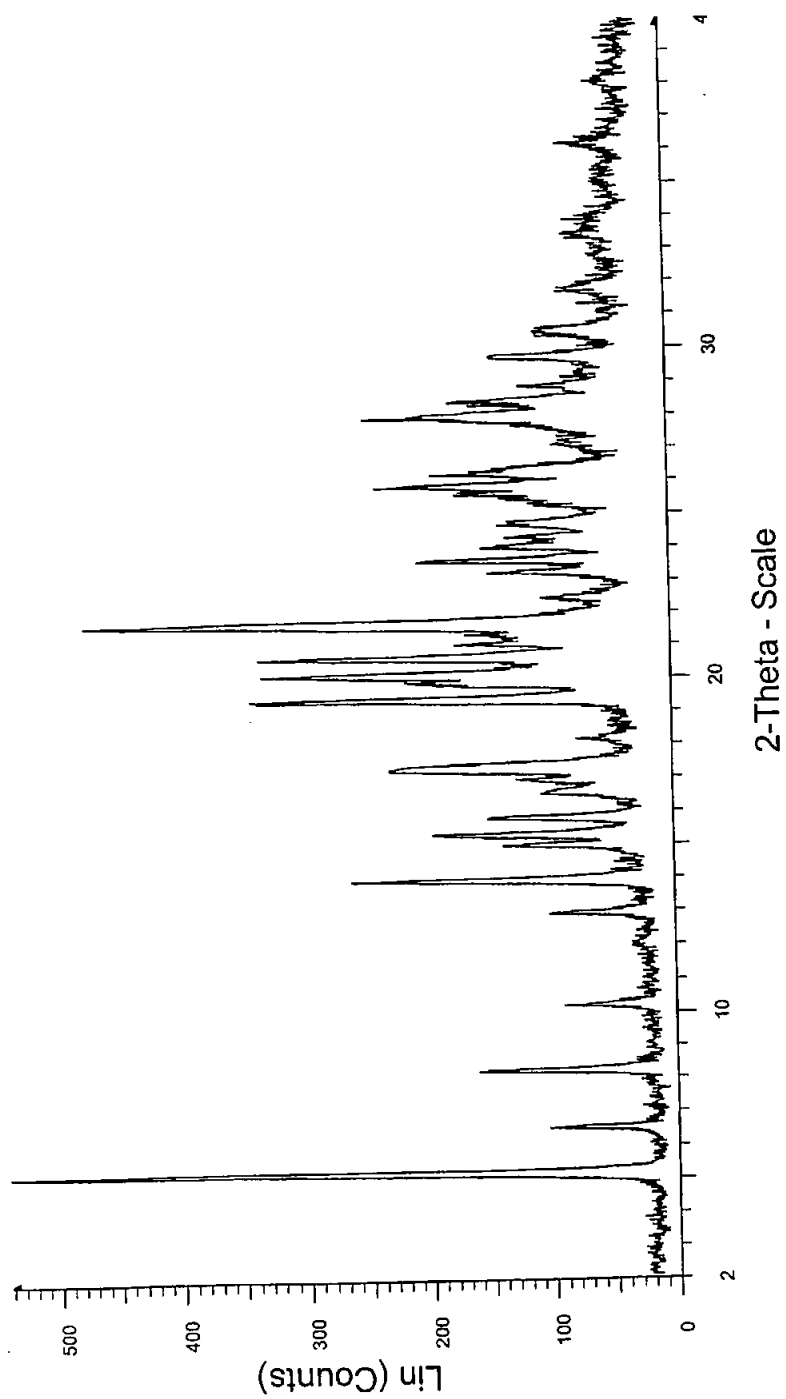
CLAIMS

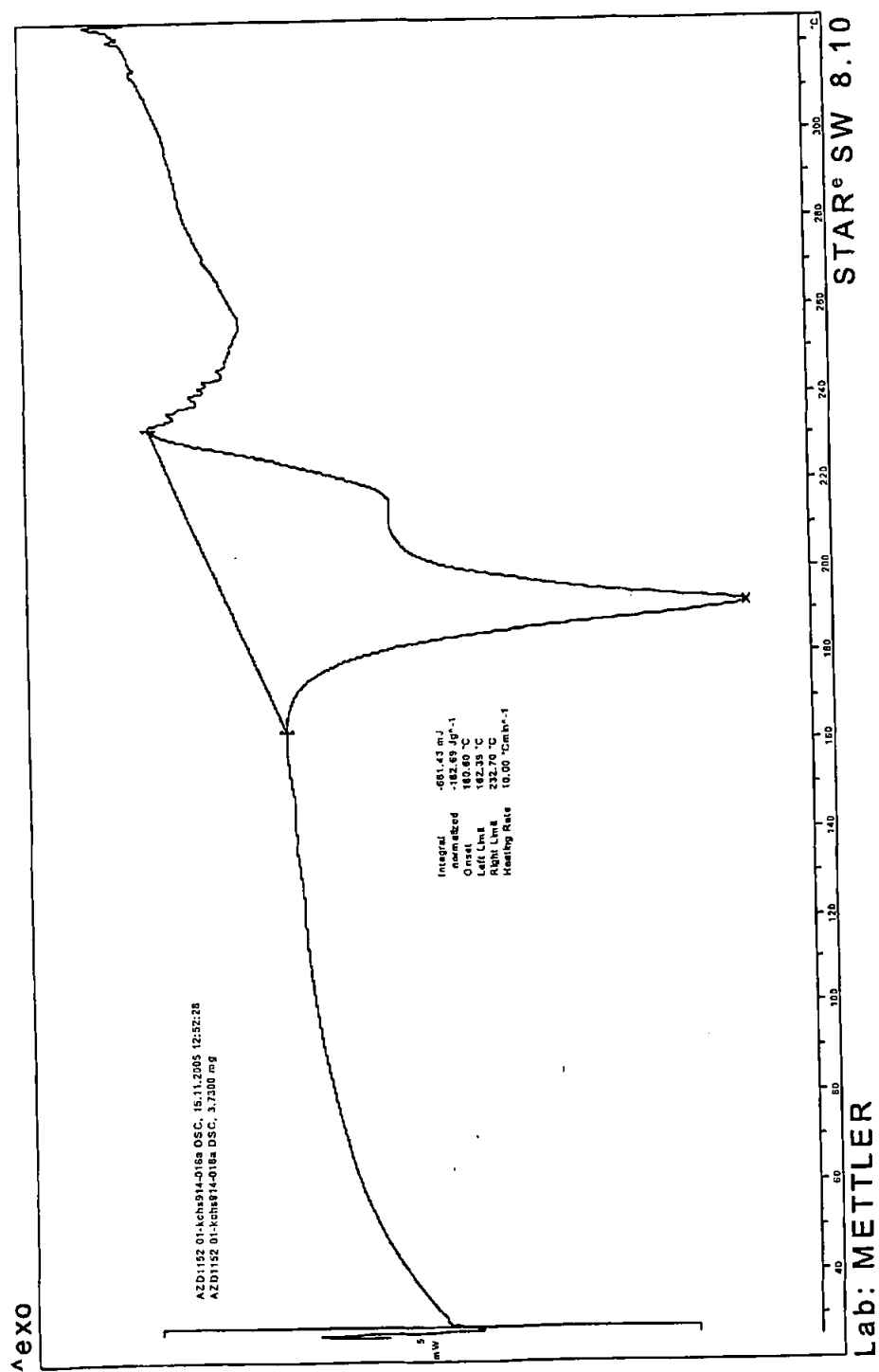
1. A maleate co-crystal of AZD1152, wherein AZD1152 is

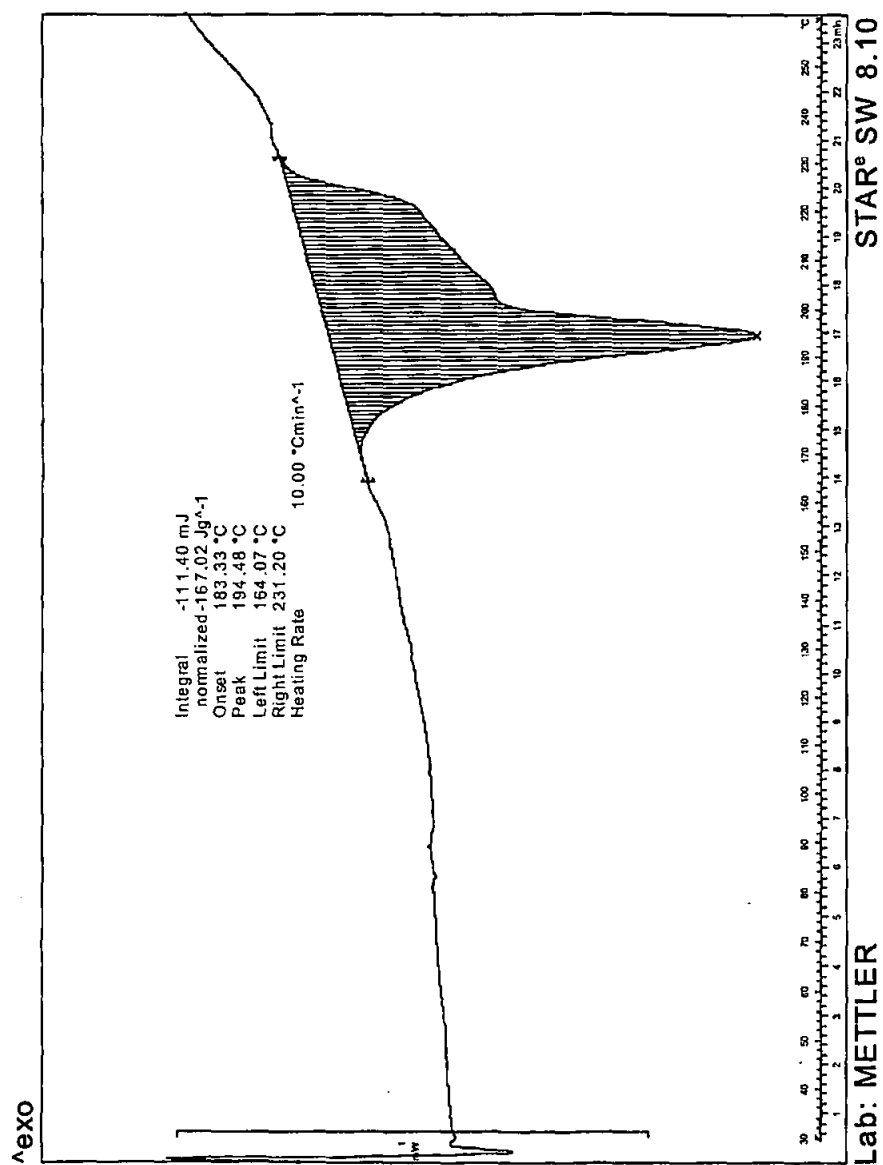


5

2. A crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152 as defined in claim 1.
3. A crystalline form of the maleate co-crystal of AZD1152 according to claim 2,
10 wherein said co-crystal has an X-ray powder diffraction pattern with specific peaks at about 2-theta = 12.9° and 15.2° and/or 10.2°.
4. A method of preparing a maleate co-crystal of AZD1152 as defined in claim 1, said method comprising the step of mixing a solution of AZD1152 free form with maleic acid
15 in a suitable solvent such as methanol, dimethyl sulphoxide (DMSO) or a mixture thereof.
5. A pharmaceutical composition comprising a maleate co-crystal of AZD1152, as defined in claim 1 in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier.
- 20 6. A maleate co-crystal of AZD1152 as defined in claim 1 for use in therapy.
7. The use of a maleate co-crystal of AZD1152 as defined in claim 1 in the preparation of a medicament for the treatment of a disease where the inhibition of one or more aurora kinase(s) is beneficial.
- 25 8. The use of a maleate co-crystal of AZD1152 as defined in claim 1 in the preparation of a medicament for the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer.

**Figure 1**

Figure 2

Figure 3

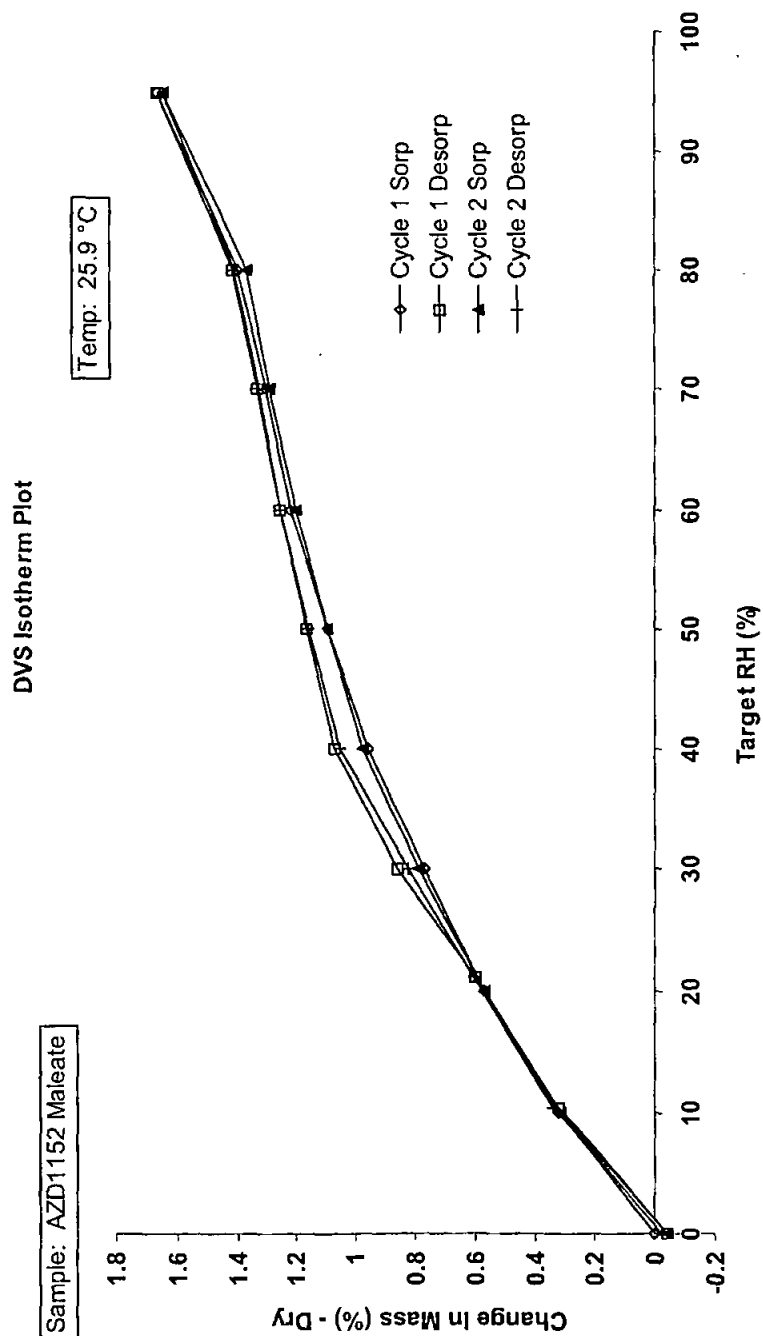


Figure 4

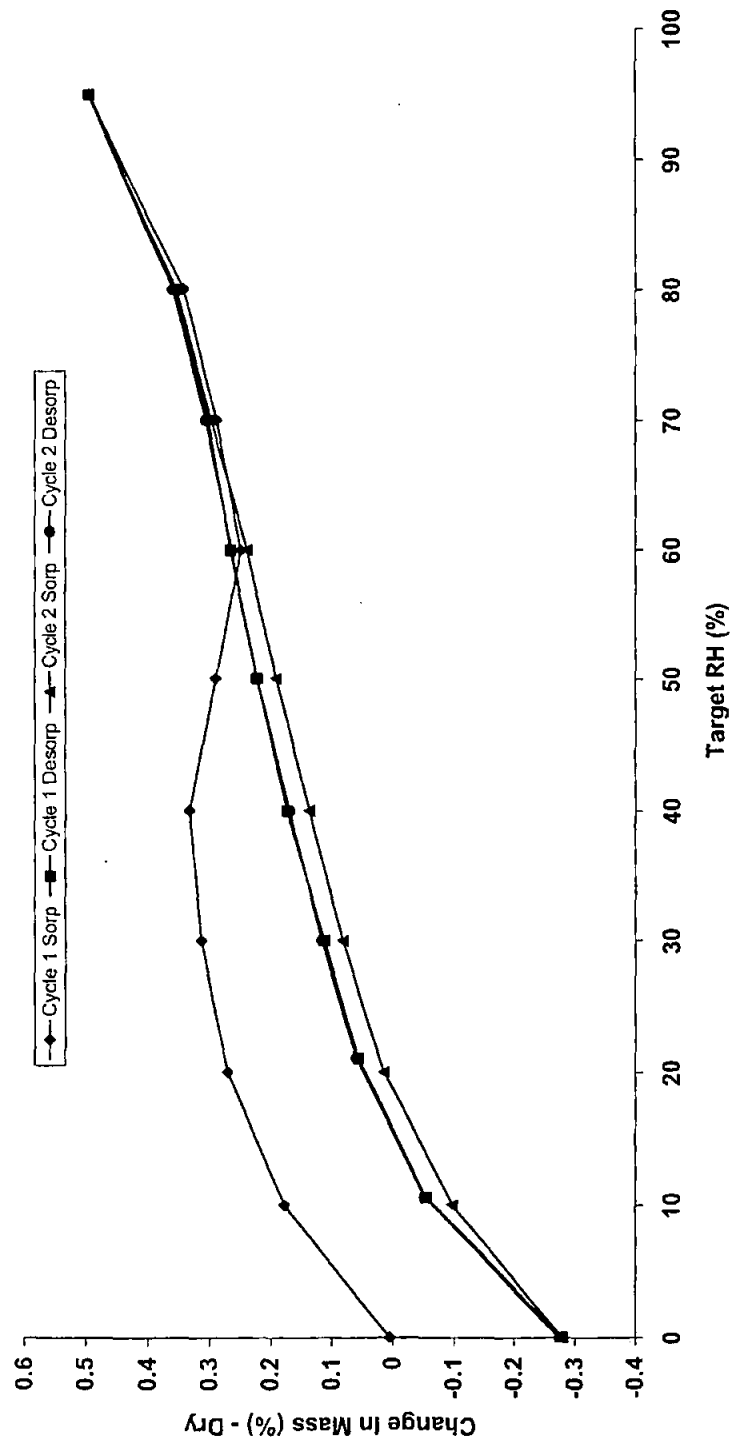


Figure 5

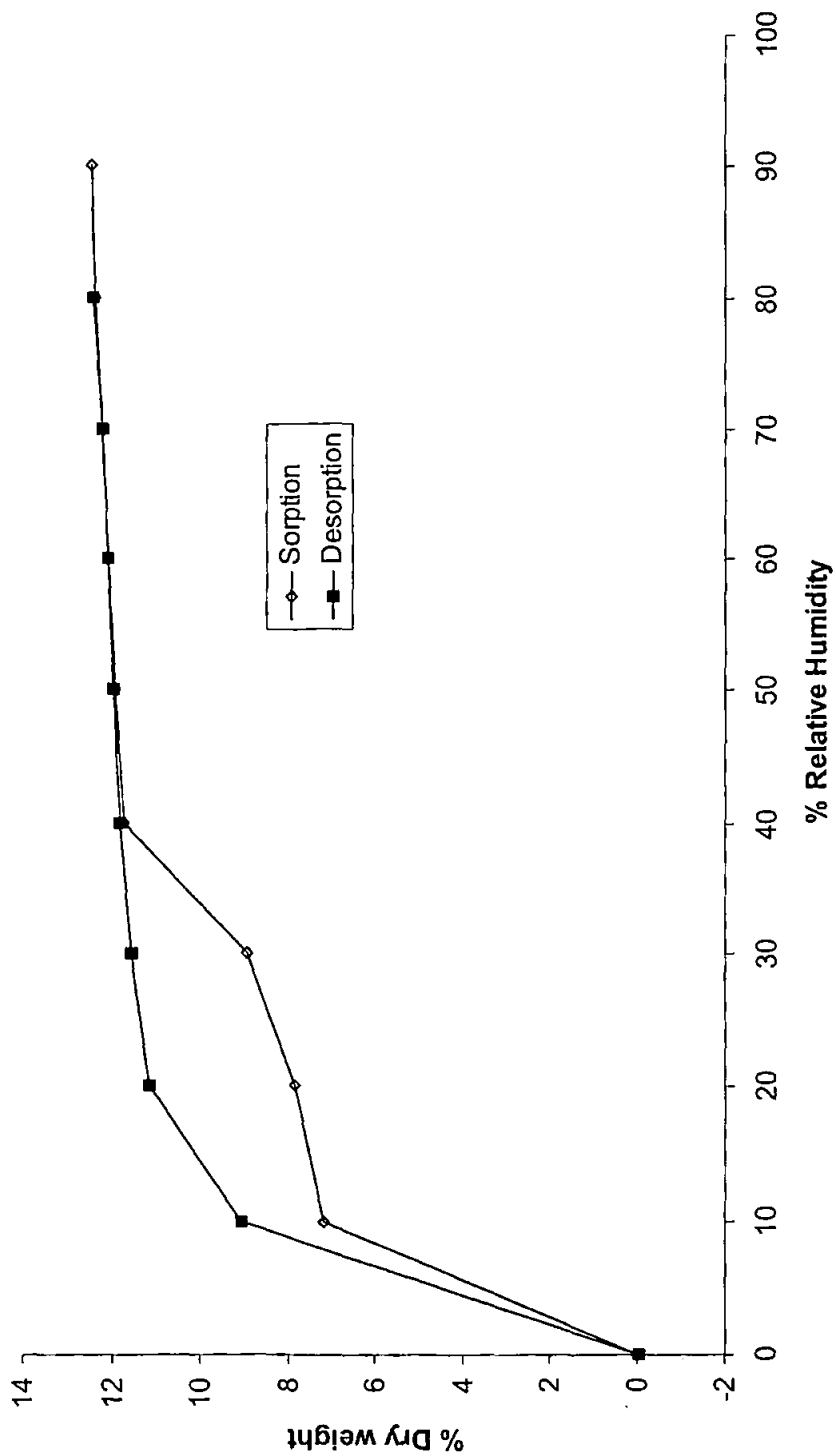
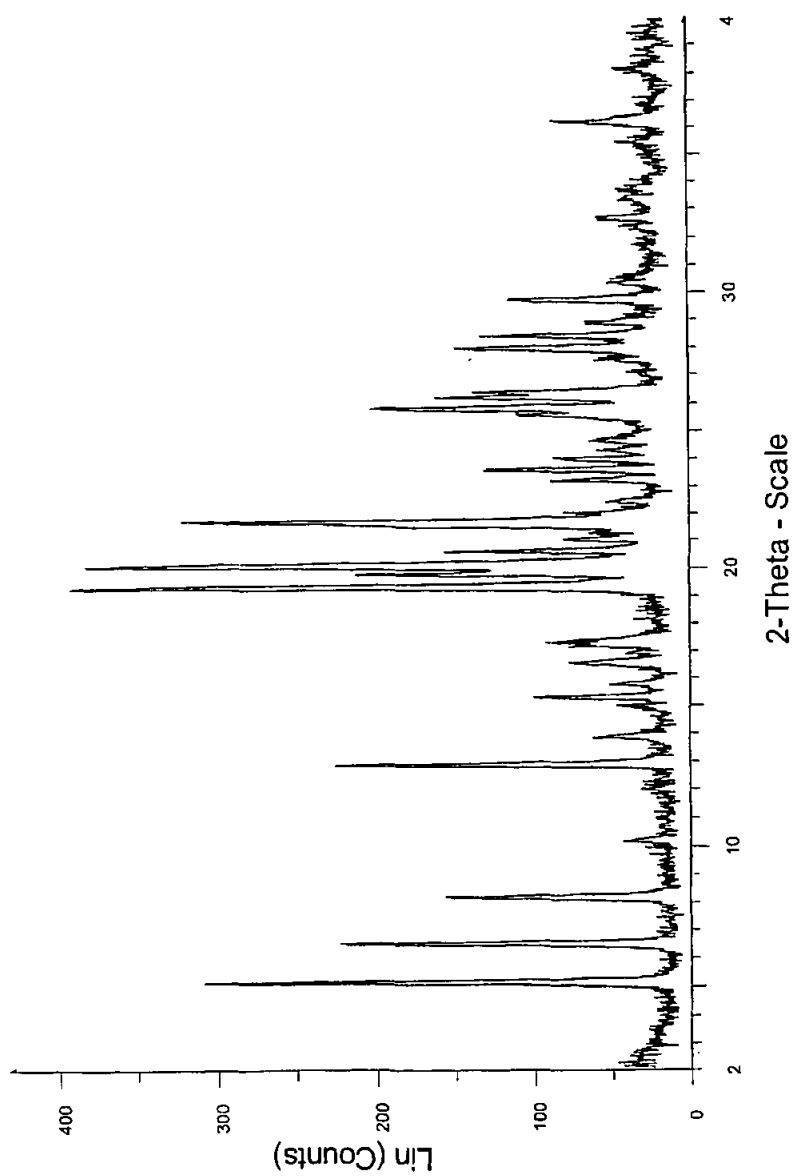


Figure 6

**Figure 7**

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN
MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Bureau International



(43) Fecha de publicación internacional
22 de Noviembre de 2007 (22.11.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/132227 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07D 403/12 (2006.01) A61K 31/661 (2006.01)
C07F 9/09 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/GB2007/001771

(22) Fecha de presentación internacional: 14 de Mayo de 2007
(14.05.2007)

(25) Idioma de presentación:

Inglés

(26) Idioma de publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la prioridad:

0609621.8 16 de Mayo de 2006 (16.05.2006) GB

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo MG, US): **ASTRAZENECA AB** [SE/SE]; S-151 85 Södertälje (SE).

(71) Solicitante (para MG solamente): **ASTRAZENECA UK LIMITED** [GB/GB]; 15 Stanhope Gate, London Greater London W1K 1LN (GB).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): **SEPENDA, George, Joseph** [US/GB]; AstraZeneca, Charter Way, Macclesfield Cheshire SK10 2NA (GB). **STOREY, Richard** [GB/GB]; AstraZeneca, Charter Way, Macclesfield Cheshire SK10 2NA (GB).

(74) Mandatario: **GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY;** AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SE).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

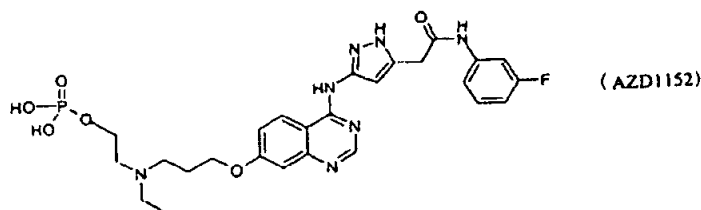
Publicada:

- con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT

(54) Title: MALEATE CO-CRYSTAL OF AZD1152

(54) Título: CO-CRISTAL DE MALEATO DE AZD1152



(AZD1152)

(57) Abstract: The present invention relates to a novel co-crystal of 2-[ethyl[3-(4-[(5-[2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl)-1H-pyrazol-3-yl]amino]quinazolin-7-yl]oxy)propyl]amino]ethyl dihydrogen phosphate (AZD1152) which is an aurora kinase inhibitor that is useful in the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con un nuevo co-cristal de 2-[etil[3-(4-[(5-[2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil)-1H-pirazol-3-il]amino]quinazolin-7-il]oxi)propil]amino]etil dihidrógeno fosfato (AZD1152) el cual es un inhibidor de la aurora quinasa que es útil en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer.

WO 2007/132227 A1

CO-CRISTAL DE MALEATO DE AZD1152

La presente invención se relaciona con un nuevo co-cristal y más particularmente con una nueva forma de co-cristal de 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato (aquí referido como AZD1152) el cual es un inhibidor de la aurora quinasa que es útil en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer. Más específicamente la invención se relaciona con un co-cristal de maleato de AZD1152, con un proceso para la preparación de un co-cristal de maleato de AZD1152, con las composiciones farmacéuticas que contienen un co-cristal de maleato de AZD1152, con el uso de un co-cristal de maleato de AZD1152 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer, y con métodos de tratar enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer en el cuerpo humano o animal administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de un co-cristal de maleato de AZD1152. Esta invención también se relaciona con una forma cristalina particular de un co-cristal de maleato de AZD1152.

El cáncer (y otras enfermedades hiperproliferativas) está caracterizado por una proliferación celular incontrolada la cual ocurre cuando la regulación normal de la proliferación de las células se pierde. Esta pérdida frecuentemente parece ser el resultado de un daño genético en la ruta celular que controla el progreso de la célula a través de su ciclo celular.

En eucariotas, se piensa que una cascada ordenada de fosforilación de proteína controla el ciclo celular. Varias familias de proteínas quinasas que juegan papeles críticos en esta cascada han sido identificadas. La actividad de muchas de estas quinasas es incrementada en tumores humanos cuando se compara al tejido normal. Esto puede ocurrir debido a niveles incrementados de expresión de la proteína (por ejemplo como resultado de la amplificación del gen), o por cambios en la expresión de co-activadores o proteínas inhibidoras.

El cebador identificado, y más ampliamente estudiado de estos reguladores del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclina (o CDK). Más recientemente, proteínas quinasas que son estructuralmente distintas de la familia CDK han sido identificadas y encontradas para jugar papeles críticos en la regulación del ciclo celular. Estas quinasas también parecen ser importantes en la oncogénesis e incluyen homólogos humanos de las proteínas Ipl1 *Drosophila* aurora y *S.cerevisiae*. Los tres homólogos

humanos de estos genes aurora-A, aurora-B y aurora-C (también conocidos como aurora2, aurora1 y aurora3 respectivamente) codifican el ciclo celular regulado por las proteínas serina-treonina quinasas (resumido en Adams y *otros*, 2001, Trends in cell Biology. 11(2): 49-54). Estas muestran un pico de expresión y actividad quinasa a través de G2 y mitosis.

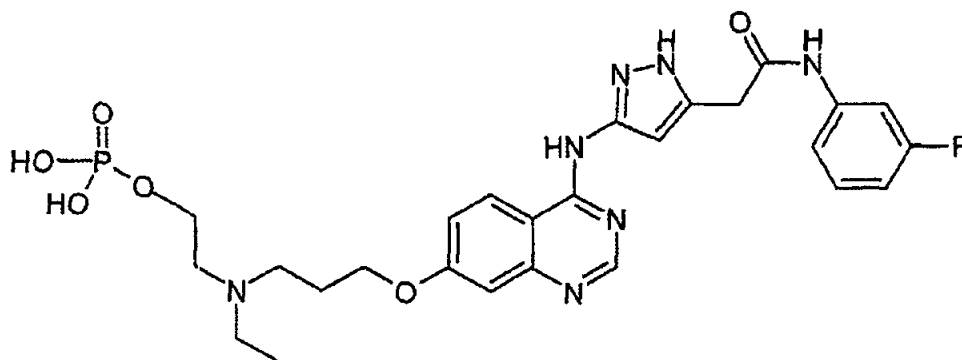
- 5 Varias observaciones implican la inclusión de proteínas aurora humanas en el cáncer. Los mapas de genes aurora-A para el cromosoma 20q13, una región que es frecuentemente amplificada en tumores humanos incluyendo tumores de mamas y colon. Aurora-A puede ser el gen objetivo principal de este amplicón, ya que el ADN aurora-A es amplificado y el ARNm sobreexpresado en más de 50% de los cánceres colorectales humanos primarios.
- 10 En estos tumores los niveles de proteína aurora-A aparecen grandemente elevados comparados con el tejido normal adyacente. En adición, la transfección de fibroblastos de roedores con aurora-A humanos conduce a la transformación, confiriendo la capacidad de crecer en agar blando y forma tumores en ratones desnudos (Bischoff y *otros*, 1998, The EMBO Journal. 17(11): 3052-3065). Otro trabajo (Zhou y *otros*, 1998, Nature Genetics. 20(2): 189-93) ha mostrado que la sobreexpresión artificial de aurora-A conduce a un incremento en el número de centrosomas y un incremento en aneuploide, un evento conocido en el desarrollo del cáncer.

- También ha sido mostrado que hay un incremento en la expresión de aurora-B (Adams y *otros*, 2001, Chromsoma. 110(2):65-74) y aurora-C (Kimura y *otros*, 1999, Journal de Biological Chemistry, 274(11): 7334-40) en células de tumor cuando se comparan con las células normales. Aurora-B es sobreexpresado en células de cáncer y ha sido mostrado que niveles incrementados de aurora-B correlacionan con etapas avanzadas del cáncer colorectal (Katayama y *otros* (1999) J. Natl. Cancer Inst. 91:1160). Además, un reporte sugiere que la sobreexpresión de aurora-B induce aneuploide a través de la
- 25 fosforilación incrementada de histona H3 en serina 10 y que las células que sobreexpresan aurora-B forman tumores más agresivos que desarrollan metástasis (Ota, T. y *otros*, 2002, Cancer Res. 62: 5168-5177). Aurora-B es una proteína de transporte del cromosoma que existe en un complejo estable con al menos otras tres proteínas de transporte, Survivin, INCENP y Borealin (Carmena M. y *otros* 2003, Nat. Rev. Mol. cell Biol. 4: 842-854).
- 30 Survivin es también regulado hacia arriba en el cáncer y contiene un dominio BIR (Repetición del Inhibidor de proteína de apoptosis (IAP) de Baculovirus) y puede por lo tanto jugar un papel en la protección de células de tumor de la apoptosis y/o catástrofe mitótica.

Con relación a aurora-C, su expresión se piensa que esté restringida al testículo pero se ha encontrado estar sobreexpresado en varias líneas de cáncer. (Katayama H y *otros*, 2003, *Cáncer and Metastasis Reviews* 22: 451-464).

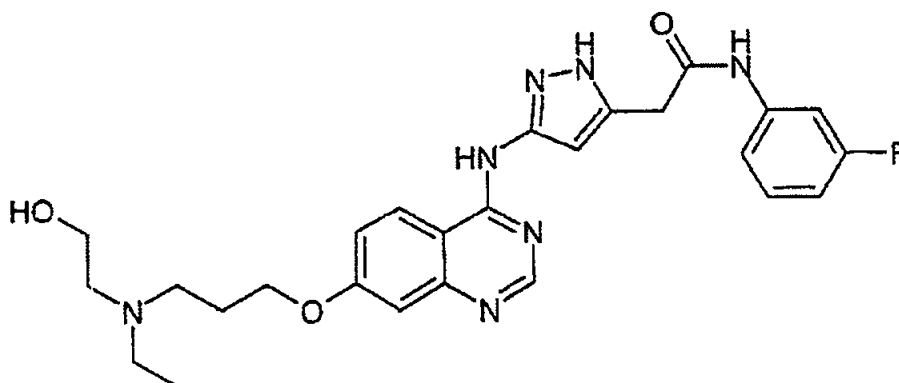
De manera importante, ha sido también demostrado que la abrogación de la
5 expresión y función de aurora-A por tratamiento con oligonucleótido antisentido de líneas celulares de tumor humano (WO 97/22702 y WO 99/37788) conduce a la detención del ciclo celular y ejerce un efecto antiproliferativo en estas líneas celulares de tumor. Adicionalmente, ha sido demostrado que los inhibidores de molécula pequeña de aurora-A y aurora-B tienen un efecto antiproliferativo en células tumorales humanas (Keen y *otros*
10 2001, Póster #2455, Reunión anual de la American Association of Cancer Research), ya que tiene abrogación selectiva de la expresión aurora-B sola por tratamiento ARNsi (Ditchfield y *otros* 2003, *Journal of cell Biology*, 161(2): 267-280). Esto indica que la inhibición de la función de aurora-A y/o aurora-B tendrá un efecto antiproliferativo que puede ser útil en el tratamiento de tumores humanos y otras enfermedades
15 hiperproliferativas. La inhibición de aurora quinasas como una aproximación terapéutica a estas enfermedades puede tener ventajas significativas sobre las rutas de señalización objetivo aguas arriba del ciclo celular (por ejemplo aquellas activadas por el receptor del factor de crecimiento de tirosina quinasas tal como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) u otros receptores). Ya que el ciclo celular está finalmente aguas abajo
20 de todos los diversos eventos de señalización, las terapias dirigidas al ciclo celular tal como la inhibición de las aurora quinasas serían predichas para ser activas a través de la proliferación de las células tumorales, mientras que aproximaciones dirigidas a moléculas de señalización específica (por ejemplo EGFR) podrían ser predichas para ser activas solamente en el subconjunto de células tumorales que expresan aquellos receptores.
25 También se cree que existe una “conversación cruzada” significativa entre estas rutas de señalización lo que significa que la inhibición de un componente puede ser compensado por otro.

Inhibidores de las aurora quinasas son descritos en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 03/55491 y WO 2004/058781, y en particular WO 2004/058781 describe
30 un compuesto que posee la siguiente fórmula estructural, referida aquí como AZD1152:



AZD1152

AZD1152 es un profármaco que es rápidamente y completamente convertido (en el plasma humano) a la fracción activa referida aquí como AZD1152 HQPA:



AZD1152 HQPA

AZD1152 HQPA es un inhibidor reversible y ATP-competitivo de las aurora quinasas con potente actividad contra la aurora A, B-INCENP y C-INCENP (1369 ± 419.2 nM, 0.359 ± 0.386 nM y 17.03 ± 12.2 nM de K_i respectivamente). Se ha encontrado que el AZD1152 inhibe el crecimiento de tumores en un panel de injertos heterólogos de tumores colorectales (SW620, HCT116, Colo205) y de pulmón (A549, Calu-6) humanos con importancia estadística.

AZD1152 es divulgado en WO 2004/058781 como la sal de dihidrocloruro y también como la base libre en formas hidratadas. En particular la forma libre es descrita en la forma de trihidrato a tetrahidrato.

Desde una perspectiva de fabricación, las formas hidratadas son problemáticas ya que requieren controles para estar en el lugar durante la fabricación, secado, almacenaje y procesamiento. En adición, obtener y mantener una muestra del compuesto con una

relación compuesto a agua estequiométrica consistente es difícil. En el caso de las formas previamente descritas de AZD1152, y en particular con la forma libre, las moléculas de agua son solamente escasamente unidas a cada molécula de AZD1152, de manera que la extensión de la asociación y disociación de las moléculas de agua al fármaco AZD1152 varía ampliamente con la temperatura y la humedad relativa. Por lo tanto, para un peso dado de AZD1152, la cantidad actual de AZD1152 en términos de número de moléculas de AZD1152 dependerá de la temperatura y la humedad relativa ya que el contenido de agua variará. La efectividad de cualquier dosis determinada por peso es así también dependiente de la temperatura y la humedad relativa a la cual está expuesta. La Sorción de Vapor Dinámico ha sido usada para medir la variación en el nivel de agua asociado con AZD1152 con la humedad.

WO 2004/058781 divulga, en términos generales, algunas sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos aquí. AZD1152 es solamente divulgado como la sal de dihidrocloruro y como la forma libre. Otras formas de AZD1152 no son mencionadas. En particular, WO 2004/058781 no divulga ningún otro co-cristal de AZD1152 y ciertamente no considera si co-cristales particulares de compuestos particulares poseerían beneficios sorprendentes y particularmente no beneficios que pudieran mejorar los problemas discutidos aquí.

Inesperadamente y sorprendentemente hemos encontrado que el co-cristal de maleato de AZD1152 existe en una forma anhidra, el cual es sustancialmente no-higroscópico. Además, aunque la relación estequiométrica del fármaco a maleato puede variar dentro de un rango de, por ejemplo, 0.8:1 a 1.2:1, ó 0.9:1 a 1.1:1, hemos encontrado que el co-cristal de maleato de AZD1152 descrito aquí tiene una relación estequiométrica reproducible del fármaco a maleato de sustancialmente 1:1. La efectividad de una dosis por peso del co-cristal de maleato de AZD1152 es por lo tanto afectada por la temperatura y la humedad relativa en una extensión mucho menor que aquella de la forma libre, la sal de dihidrocloruro y otras formas de co-cristales de AZD1152 que han sido evaluadas. Adicionalmente, el co-cristal de maleato de AZD1152 es más fácil de fabricar ya que hay menos necesidad de controlar los niveles de humedad en el proceso de fabricación. La naturaleza anhidra del co-cristal de maleato significa además que sería posible formularla usando condiciones acuosas limitadas y/o ambientes de alta temperatura debido a un menor riesgo de hidratación/deshidratación durante las condiciones del procesamiento que usa ambientes acuosos por ejemplo granulación en húmedo.

Adicionalmente, hemos descubierto que un co-cristal de maleato de AZD1152 sorprendentemente contiene menos impurezas que la forma libre. En particular, parece que ciertas impurezas recalcitrantes que están presentes en la forma libre están sorprendentemente presentes en una extensión mucho menor después de la conversión de la forma libre en la forma de maleato.

En consecuencia, la presente invención proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152.

Para evitar dudas, los términos “co-cristal de maleato de AZD1152”, “co-cristal de maleato AZD1152” o “maleato AZD1152” (o cualquier otro término similar usado aquí) se refiere a todas las formas de asociación entre AZD1152 y ácido maleico, incluyendo la forma de sales. En particular, estos términos abarcan:

- (i) una asociación no iónica entre el AZD1152 y ácido maleico (es decir donde ninguna transferencia de protón ha ocurrido entre el fármaco y el ácido maleico); o
- (ii) una interacción iónica donde la transferencia de protón entre el AZD1152 y el ácido maleico ha ocurrido para formar una sal de maleato de AZD1152, o
- (iii) mezclas de (i) y (ii) anteriores.

En una realización particular de la invención, el co-cristal de maleato comprende una asociación no iónica entre el fármaco AZD1152 y el ácido maleico (es decir donde no ha ocurrido una transferencia de protones entre el fármaco y el ácido maleico).

En una realización alternativa de la invención, el co-cristal de maleato es una sal de maleato de AZD1152.

En una realización particular, un co-cristal de maleato de AZD1152 se forma mezclando la forma libre de AZD1152 con ácido maleico en un solvente adecuado tal como metanol, dimetil sulfóxido (DMSO) o una mezcla de DMSO con metanol, acetonitrilo, y otros solventes similares. El co-cristal de maleato puede ser aislado permitiendo que ocurra la cristalización y luego aislando el material cristalino resultante. La identidad de un co-cristal de maleato de AZ1152 de la presente invención puede ser confirmada por análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) de protones.

Deberá ser también entendido que un compuesto o co-cristal de la invención puede exhibir el fenómeno de tautomerismo y que los dibujos de las fórmulas dentro de esta especificación pueden representar solamente una de las posibles formas tautoméricas. Debe ser entendido que la invención abarca cualquier forma tautomérica que tiene

actividad inhibidora Aurora quinasa y en particular actividad inhibidora Aurora-A y/o Aurora-B quinasa y no está limitado meramente a cualquier forma tautomérica utilizada dentro de los dibujos de las fórmulas.

La presente invención también se relaciona con una forma cristalina particular del co-
5 cristal de maleato de AZD1152. Esta forma cristalina es preparada cristalizando el cristal de maleato de AZD1152 a partir de un solvente orgánico tal como una mezcla de metanol y dimetil sulfóxido (DMSO). Detalles experimentales adicionales son proporcionados en los Ejemplos.

En consecuencia, la invención proporciona una forma cristalina del co-cristal de
10 maleato de AZD1152.

La forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152 está caracterizada porque proporciona un patrón de difracción de rayos-X en polvo sustancialmente como es
mostrado en la Figura 1.

Los picos más prominentes de difracción de rayos-X en polvo para la forma
15 cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152 son mostrados en la tabla 1:

Tabla 1

Ángulo 2-Theta °	Intensidad Relativa %	Ángulo 2-Theta °	Intensidad Relativa %
5.118	100	22.425	18.8
6.446	18.8	23.228	26.8
8.158	28.1	23.583	37.7
10.171	13.1	23.994	25.7
11.917	5.9	24.271	24.1
12.861	18	24.671	23.3
13.849	48.3	25.32	19.1
14.909	25.2	25.574	32.9
15.234	36	25.813	43.8
15.738	27.6	26.21	35.3
16.506	18.8	27.122	16
16.884	23	27.946	45.4
17.232	42.5	28.418	31.6
18.134	13.8	28.847	21.7
19.327	62.7	29.725	26.1
19.82	38.8	30.521	18.8
20.082	61	31.74	15.4
20.582	61.4	33.424	14.7
21.008	32	36.181	15.3
21.663	87.3	38.106	10.8

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con al menos un pico específico a alrededor de 2-theta = 15.2°.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de 2-theta = 12.9°.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de $2\text{-theta} = 15.2$ durante 10.2° .

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de $2\text{-theta} = 18.1^\circ$.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con al menos un pico específico a alrededor de $2\text{-theta} = 10.2^\circ$, 12.9° , 15.2° ó 18.1° .

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de $2\text{-theta} = 12.9^\circ$ y 15.2° y/o 10.2° .

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de $2\text{-theta} = 10.2^\circ$, 12.9° , 15.2° y 18.1° .

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de uno cualquiera de o combinación de los valores 2-theta° mostrados en la tabla 1.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo sustancialmente el mismo que el patrón de difracción de rayos-X en polvo mostrado en la Figura 1.

Cuando se establece aquí que la presente invención se relaciona con una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152, el grado de cristalinidad determinado por datos de difracción de rayos X en polvo es convenientemente mayor que alrededor de 60%, más convenientemente mayor que alrededor de 80%, preferiblemente mayor que alrededor de 90%.

En los párrafos precedentes que definen los picos de difracción de rayos X en polvo para las formas cristalinas del co-cristal de maleato de AZD1152, el término “a alrededor de” es usado en la expresión “...a alrededor de $2\text{-theta} = \dots$ ” para indicar que la posición precisa de los picos (es decir los valores de ángulo 2-theta recitados) no deben ser

interpretados como siendo valores absolutos ya que, como será apreciado por aquellos expertos en el arte, la posición precisa de los picos puede variar ligeramente entre una máquina y otra, de una muestra a otra, o como resultado de variaciones ligeras en las condiciones de medición utilizadas. Es también establecido en los párrafos precedentes
5 que las formas cristalinas del co-cristal de maleato de AZD1152 proporcionan patrones de difracción de rayos-X en polvo 'sustancialmente' iguales al patrón de difracción de rayos-X en polvos mostrados en la Figura 1, y tienen sustancialmente los picos más prominentes (valores de ángulo 2-theta) mostrados en la tabla 1 y en particular a alrededor de 2-theta = 10.2°, 12.9°, 15.2° ó 18.1°. Será apreciado que el uso del término 'sustancialmente' en
10 este contexto también pretende indicar que los valores de ángulo 2-theta de los patrones de difracción de rayos-X en polvo pueden variar ligeramente de una máquina a otra, de una muestra a otra, o como resultado de ligeras variaciones en las condiciones de medición utilizadas, de manera que las posiciones mostradas en la Figura o cotizadas en la Tabla no son otra vez construidas como valores absolutos.

15 A este respecto, es conocido en el arte que un patrón de difracción de rayos-X en polvo puede ser obtenido el cual tiene uno o más errores de medición dependiendo de las condiciones de medición (tal como el equipamiento, la preparación de la muestra o la máquina usada). En particular, es generalmente conocido que las intensidades en el patrón de difracción de rayos-X en polvo pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de
20 medición y la preparación de la muestra. Por ejemplo, las personas versadas en el arte de la difracción de rayos-X en polvo se percatarán de que la intensidad relativa de los picos puede ser afectada por, por ejemplo, granos por encima de 30 micrones en tamaño y relaciones de aspecto no-unitarios, lo que puede afectar el análisis de las muestras. La persona versada en el arte también se percatará de que la posición de las reflexiones puede
25 ser afectada por la altura precisa a la cual la muestra se sitúa en el difractómetro y la calibración cero del difractómetro. La planidad de la superficie de la muestra también puede tener un pequeño efecto. De ahí que una persona versada en el arte apreciará que la información del patrón de difracción presentado aquí no es interpretado como absoluto (para más información ver Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder
30 Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996). Por lo tanto, será entendido que la forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152 de la presente invención no está limitado a los cristales que proporcionan patrones de difracción de rayos-X en polvo idénticos a los patrones de difracción de rayos-X en polvo mostrados en la Figura 1 y cualquiera de los

cristales que proporcionan patrones de difracción de rayos-X en polvo sustancialmente iguales a aquellos mostrados en la Figura 1 caen dentro del alcance de la presente invención. Una persona versada en el arte de la difracción de rayos-X en polvo es capaz de juzgar la identidad sustancial de los patrones de difracción de rayos-X en polvo.

5 Generalmente, un error de medición de un ángulo de difracción en un difractómetro de rayos-X en polvo es alrededor de $2\text{-theta} = 0.5^\circ$ o menos (o, más adecuadamente, alrededor de $2\text{-theta} = 0.2^\circ$ o menos) y tal grado de un error de medición debe ser tomado en cuenta cuando se considera el patrón de difracción de rayos-X en polvo de la Figura 1, y cuando se interpretan las posiciones de los picos referidos en el texto anterior y en la Tabla

10 1. Por lo tanto, donde se establezca, por ejemplo, que el co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con al menos un pico específico a alrededor de $2\text{-theta} = 15.2^\circ$ (o cualquiera de los otros ángulos mencionados anteriormente) entonces esto puede ser interpretado como siendo $2\text{-theta} = 15.2^\circ$ más o menos 0.5° , o $2\text{-theta} = 15.2^\circ$ más o menos 0.2° .

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparar un co-cristal de maleato de AZD1152 como el aquí definido, dicho método comprendiendo el paso de mezclar una solución de la forma libre de AZD1152 con ácido maleico en un solvente adecuado tal como metanol, N-metil-2-pirrolidinona, dimetil sulfóxido (DMSO) o una mezcla de DMSO con metanol, acetonitrilo, y otros solventes similares. El método

20 puede comprender adicionalmente los pasos de cristalización y, opcionalmente, aislamiento del co-cristal de maleato cristalino de AZD1152 así formado.

El proceso puede adicionalmente comprender los pasos adicionales de lavar el co-cristal de maleato de AZD1152 con un solvente adecuado; y secar el co-cristal de maleato de AZD1152.

25 Adecuadamente, la forma libre de AZD1152 es disuelta en un solvente adecuado (tal como dimetilsulfóxido, metanol, una mezcla de los mismos o N-metil-2-pirrolidinona) y generalmente mezclada con una solución de ácido maleico (el cual es disuelto en el mismo solvente o en uno compatible). Alternativamente, el ácido maleico sólido puede ser añadido a la solución de la forma libre de AZD1152 (o viceversa, es decir la solución de la

30 forma libre de AZD1152 puede ser añadida al ácido maleico sólido). Adecuadamente, la solución es agitada para facilitar el mezclado de la forma libre de AZD1152 y el ácido maleico añadido. Los materiales (idealmente pero no exclusivamente en una relación 1: 1)

pueden ser mezclados a temperatura ambiente aunque el procedimiento puede también ser realizado a temperaturas más altas.

Cualquier método conocido adecuado en el arte para aislar la forma de maleato cristalina de AZD1152 puede ser usado. Adecuadamente, el co-cristal de maleato de
5 AZD1152 es recogido por filtración.

Preferiblemente el co-cristal de maleato de AZD1152 lavado es secado al vacío.

En general, una relación de la forma libre de AZD1152: ácido maleico de 1:1 es deseada. Esta relación 1:1 deseada puede ser obtenida mezclando la forma libre de AZD1152 y el ácido maleico en composiciones siempre dentro del rango de 0.6 – 1.4 de
10 forma libre de AZD1152 : 1.0 de ácido maleico. Adecuadamente, la relación de forma libre de AZD1152: ácido maleico en la mezcla está dentro del rango de 0.9 – 1.1 y particularmente 1.0 – 1.1 de la forma libre de AZD1152: 1.0 - 1.1 de ácido maleico. Generalmente un exceso de ácido maleico debe ser usado y en particular la relación de la forma libre de AZD1152: ácido maleico en la mezcla está dentro del rango de 0.6 – 1.0 y
15 particularmente 0.9 – 1.0 de la forma libre de AZD1152: 1.0 de ácido maleico.

El co-cristal de maleato AZD1152 típicamente autocristaliza, pero será apreciado por una persona versada en el arte que la siembra puede ser usada si es requerido o deseado para promover la formación del co-cristal.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una
20 composición farmacéutica que comprende un co-cristal de maleato de AZD1152, como el definido aquí en asociación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la invención pueden estar en un formato adecuado para uso oral (por ejemplo como tabletas, pastillas, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas o oleosas, emulsiones, polvos o gránulos dispersables, jarabes o elixires), para uso tópico
25 (por ejemplo como cremas, ungüentos, geles o soluciones o suspensiones acuosas u oleosas), para la administración por inhalación (por ejemplo, como polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para administración mediante insuflación (por ejemplo como un polvo finamente dividido) o para administración parenteral (por ejemplo, como solución acuosa u oleosa estéril para dosificación intravenosa, subcutánea, intramuscular o
30 intramuscular o como un supositorio para dosificación rectal).

Las composiciones de la invención se pueden obtener mediante procedimientos convencionales, utilizando excipientes farmacéuticos convencionales, bien conocidos en el arte. Así, las composiciones destinadas para el uso oral pueden contener, por ejemplo, uno o varios agentes colorantes, edulcorantes, saborizantes y/o conservantes.

Excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para una formulación en tabletas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como lactosa, carbonato de sodio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes granulantes y desintegrantes tales como almidón de maíz o ácido algénico; agentes aglutinantes tales como almidón; agentes
5 lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; conservantes tales como etil o propil *p*-hidroxibenzoato, y agentes antioxidantes tales como ácido ascórbico. Las formulaciones en tabletas pueden ser o bien recubiertas o no recubiertas, para modificar su desintegración y posterior absorción del principio activo en el tracto gastrointestinal, o para mejorar su estabilidad y/o apariencia, en ambos casos, usando
10 agentes de recubrimiento convencionales y procedimientos bien conocidos en el arte.

Las composiciones para uso oral pueden ser en forma de cápsulas de gelatina dura, en las cuales el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite, tal como el aceite de cacahuete,
15 parafina líquida, aceite de soya, aceite de coco, o preferiblemente aceite de oliva, o cualquier otro vehículo aceptable.

Las suspensiones acuosas generalmente contienen el ingrediente activo en forma de polvo finamente dividido junto con uno o más agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio,
20 polivinil-pirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia; agentes dispersantes o humectantes tales como lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos (por ejemplo estearato de polioxetileno), o productos de condensación del óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenooxicetanol, o productos de condensación del óxido de etileno con ésteres
25 parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, tales como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación del óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenooxicetanol, o productos de condensación del óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación del óxido de etileno
30 con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol anhidridos, por ejemplo monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes (tal como etil o propil *p*-hidroxibenzoato, antioxidantes (tal como ácido ascórbico), agentes colorantes, saborizantes y/o edulcorantes (tales como sacarosa, sacarina o aspartamo).

Las suspensiones oleosas se pueden formular mediante suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal (tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (tal como parafina líquida). Las suspensiones oleosas también pueden contener un agente espesante, tal como la cera de abeja, parafina dura o cetil alcohol. Agentes edulcorantes tales como los antes expuestos, y agentes
5 saborizantes pueden añadirse para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones se pueden preservar por la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

Polvos y gránulos dispersables y liofilizados adecuados para la preparación de una
10 solución o suspensión acuosa mediante la adición de agua, generalmente contienen el ingrediente activo junto con un agente dispersante o un agente humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes dispersantes y humectantes apropiados y agentes de suspensión son ejemplificados por aquellos ya mencionadas anteriormente. Excipientes adicionales tales como agentes edulcorantes, colorantes y saborizantes,
15 también pueden estar presente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como el aceite de oliva o el aceite de cacahuete, o un aceite mineral, como por ejemplo la parafina líquida o una mezcla de cualquiera de estos. Agentes emulsificantes apropiados pueden ser, por
20 ejemplo, gomas en forma natural tales como la goma de acacia o la goma de tragacanto, fosfátidos en forma natural tales como los del frijol de soya, lecitina, un éster o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol anhídridos (por ejemplo monooleato de sorbitán), y los productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones también pueden
25 contener agentes edulcorantes, saborizantes y conservantes.

Los jarabes y elíxires se pueden formular con agentes edulcorantes tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartamo o sacarosa, y también pueden contener un agente emoliente, conservante, saborizante y/o colorante.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de una suspensión
30 oleosa o acuosa inyectable estéril, soluciones, emulsiones o sistemas particulares que pueden formularse de acuerdo con los procedimientos conocidos, utilizando uno o más agentes dispersantes o humectantes apropiados y agentes de suspensión, los cuales han sido mencionados anteriormente. Una preparación inyectable estéril también puede ser una

solución inyectable estéril o suspensión en un solvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo una solución en polietileno glicol.

Las formulaciones en forma de supositorios pueden ser preparadas mezclando el ingrediente activo con un excipiente adecuado no irritante el cual es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y se derretirá por lo tanto en el recto para liberar el fármaco. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, mantequilla de cocoa y polietileno glicoles.

Las formulaciones tópicas, tal como cremas, ungüentos, geles y soluciones o suspensiones oleosas o acuosas, pueden generalmente ser obtenidas formulando un ingrediente activo con un vehículo o diluyente convencional, aceptable de manera tópica, usando el procedimiento convencional bien conocido en el arte.

Las composiciones para la administración por insuflación pueden ser en forma de un polvo finamente dividido que contienen partículas de un diámetro promedio de, por ejemplo, 30µm o mucho menos preferiblemente 5µm o menos y más preferiblemente entre 5µm y 1µm, el polvo en sí mismo comprendiendo el ingrediente activo solo o diluido con uno o más portadores fisiológicamente aceptables tal como la lactosa. El polvo para la insuflación es luego convenientemente retenido en una cápsula que contiene, por ejemplo, 1 a 50mg del ingrediente activo para su uso con un dispositivo turbo-inhalador, tal como es usado para la insuflación del agente conocido cromoglicato de sodio.

Las composiciones para la administración por inhalación pueden estar en forma de un aerosol presurizado convencional, dispuesto para dispensar el ingrediente activo ya sea como un aerosol que contiene gotitas de líquido o sólidos finamente divididos. Propelentes de aerosoles convencionales, tales como los hidrocarburos fluorados volátiles o hidrocarburos, se pueden utilizar y los dispositivos para aerosoles son convenientemente dispuestos para dispensar una cantidad dosificada del ingrediente activo.

Para más información sobre la formulación se remite al lector al Capítulo 25.2 en el Volumen 5 de Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Jefe del Consejo Editorial), Pergamon Press 1990.

Por lo tanto en un aspecto adicional de la invención se proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152 para uso en terapia. Además se proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152 para su uso como un medicamento. Otro aspecto de la invención proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152 para su uso como un medicamento para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer y en particular el cáncer

colorectal, de mama, de pulmón, de próstata, de vejiga, renal o de páncreas o leucemia o linfoma. Las leucemias y linfomas mencionados aquí pueden ser tumores de linaje mieloide tal como leucemia mieloide aguda o de linaje linfoide.

Adicionalmente un co-cristal de maleato de AZD1152 es proporcionado para su uso en un método de tratamiento de un animal de sangre caliente tal como el hombre mediante terapia. Otro aspecto de la invención proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152 para su uso en un método de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer y en particular el cáncer colorectal, de mama, de pulmón, de próstata, de vejiga, renal o de páncreas o leucemia o linfoma.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un co-cristal de maleato de AZD1152 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad donde la inhibición de una o más aurora quinasa(s) es beneficioso. En particular se prevé que la inhibición de la aurora A quinasa y/o la aurora B quinasa puede ser beneficiosa. Preferiblemente la inhibición de la aurora B quinasa es beneficiosa. En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un co-cristal de maleato de AZD1152 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer y en particular el cáncer colorectal, de mama, de pulmón, de próstata, de vejiga, renal o de páncreas o leucemia o linfoma.

De acuerdo con aún otro aspecto, se proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152 para su uso en el método de tratar un humano que sufre de una enfermedad en la cual la inhibición de una o más aurora quinasa es beneficiosa, que comprende los pasos de administrar a una persona que necesita el mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un co-cristal de maleato de AZD1152. En particular se prevé que la inhibición de la aurora A quinasa y/o la aurora B quinasa puede ser beneficiosa. Preferiblemente la inhibición de la aurora B quinasa es beneficiosa. Además se proporciona un co-cristal de maleato de AZD1152 para su uso en el método de tratar a un humano que sufre de una enfermedad hiperproliferativa tal como el cáncer y en particular el cáncer colorectal, de mama, de pulmón, de próstata, de vejiga, renal o de páncreas o leucemia o linfoma, que comprende los pasos de administrar a una persona que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un co-cristal de maleato de AZD1152. El uso de un co-cristal de maleato de AZD1152 en cualquiera de los métodos de tratar un humano descritos anteriormente también forma los aspectos de esta invención.

Para los usos terapéuticos mencionados la dosis administrada variará con el compuesto empleado, el modo de administración, el tratamiento deseado, el trastorno

indicado, la edad y el sexo del animal o el paciente. El tamaño de la dosis sería de esta manera calculado de acuerdo con principios bien conocidos de la medicina.

Al usar un co-cristal de maleato de AZD1152 para propósitos terapéuticos o profilácticos este será generalmente administrado de manera que una dosis diaria en el
5 rango de, por ejemplo, 0.05 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal sea recibida, dada si se requiere en dosis divididas. En general dosis inferiores serán administradas cuando una ruta parenteral es empleada. De esta manera, por ejemplo, para la administración intravenosa, una dosis en el rango de, por ejemplo, 0.05 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal será generalmente usada. Similarmente, para la administración por inhalación, una
10 dosis en el rango de, por ejemplo, 0.05 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal será usada.

El tratamiento definido aquí puede ser aplicado como una terapia única o puede ser involucrado, en adición al compuesto de la invención, cirugía convencional o radioterapia o quimioterapia. Tal quimioterapia puede incluir una o más de los siguientes categorías de agentes anti-tumorales:

- 15 (i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, tal como se utiliza en oncología médica, tal como agentes alquilantes (por ejemplo cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, melfalán, clorambucil, busulfan y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo antifolatos tal como fluoropirimidinas como el 5- fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina
20 arabinosida e hidroxiaurea); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicin, mitomicina C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimitóticos (por ejemplo alcaloides vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere); e inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como
25 etopósido y teniposida, amsacrina, topotecan y camptotecina);
- (ii) agentes citostáticos tal como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), reguladores hacia abajo de los receptores de estrógenos (por ejemplo fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por
30 ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de la aromatasa (por ejemplo como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) y los inhibidores de la 5 α -reductasa como finasteride;
- (iii) agentes que inhiben la invasión de las células del cáncer (por ejemplo los

inhibidores de metaloproteínasas como marimastat e inhibidores de la función del receptor activador del plasminógeno de la uroquinasa);

- (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento, por ejemplo tales inhibidores incluyen los anticuerpos del factor de crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-*erbB2* trastuzumab [Herceptin™] y el anticuerpo anti-*erbB1* cetuximab [C225]), inhibidores de la farnesil transferasa, inhibidores de la tirosina quinasa e inhibidores de serina/treonina quinasa, por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo inhibidores de la tirosina quinasa de la familia de EGFR tales como *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), *N*-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-*N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo los inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y por ejemplo los inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos;
- (v) agentes antiangiogénicos tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo el anticuerpo del factor de crecimiento de células endoteliales antivasculares bevacizumab [Avastin™], compuestos tales como aquellos divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354) y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha v \beta 3$ y angiostatina);
- (vi) agentes perjudiciales vasculares como Combretastatin A4 y compuestos divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;
- (vii) terapias antisentido, por ejemplo aquellas que son dirigidas a los objetivos listados anteriormente, tal como ISIS 2503, una antisentido anti-ras;
- (viii) aproximaciones a la terapia génica, incluyendo por ejemplo aproximaciones para reemplazar los genes aberrantes tal como p53 aberrante, BRCA1 o BRCA2 aberrantes, aproximaciones GDEPT (terapia con profármacos de enzimas dirigidas a los genes) tal como aquellas que usan citosina deaminasa, timidina quinasa o una enzima nitroreductasa bacteriana y aproximaciones para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o la radioterapia tal como la resistencia a múltiples drogas de la terapia génica;
- (ix) aproximaciones de inmunoterapia, incluyendo por ejemplo aproximaciones *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tal como

la transfección con citocinas como la interleucina 2, interleucina 4 o el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos, aproximaciones para disminuir la anergia de células T, aproximaciones usando células inmunes transfectadas como las células dendríticas transfectadas de citoquinas, aproximaciones usando líneas celulares tumorales transfectadas de citoquinas y aproximaciones usando anticuerpos antiidiotípicos;

En adición un co-cristal de maleato de AZD1152 puede ser usado en combinación con uno o más inhibidores del ciclo celular. En particular con inhibidores del ciclo celular los cuales inhiben bub1, bubR1 o CDK.

Tal tratamiento conjunto puede ser logrado por medio de dosificaciones simultáneas, secuenciales o separadas de los componentes individuales del tratamiento. Tales productos de combinación emplean los compuestos de esta invención dentro del rango de dosificación aquí descrito y el otro agente farmacéuticamente activo dentro de su rango de dosificación aprobado.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona una combinación adecuada para usar en el tratamiento de trastornos proliferativos de la célula (tal como el cáncer) que comprende un co-cristal de maleato de AZD1152 como el definido aquí antes y un agente antitumoral adicional como el definido aquí antes.

De acuerdo con este aspecto de la invención se proporciona un producto farmacéutico que comprende un co-cristal de maleato de AZD1152 como se definió aquí anteriormente y un agente antitumoral adicional como se definió aquí anteriormente para el tratamiento conjunto de los trastornos proliferativos de las células (tal como el cáncer).

En adición a su uso en la medicina terapéutica, un co-cristal de maleato de AZD1152 es también útil como una herramienta farmacológica en el desarrollo y estandarización de los sistemas de pruebas *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de los efectos de los inhibidores de la actividad del ciclo celular en animales de laboratorio tal como gatos, perros, conejos, monos, ratas y ratones, como parte de la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

En lo anterior otras características de la fabricación del medicamento, composición farmacéutica, proceso, método y uso, las realizaciones preferidas y alternativas de los compuestos de la invención aquí descritos también aplican.

El co-cristal de maleato (s) de la invención inhibe la actividad serina-treonina quinasa de las auroras quinasas, en particular aurora A quinasa y/o aurora B quinasa y de esta manera inhibe la proliferación celular y el ciclo celular. Los compuestos que inhiben la aurora B quinasa son de particular interés. Estas propiedades pueden ser valoradas por

ejemplo, usando uno o más de los procedimientos establecidos a continuación.

(a) Prueba de inhibición de aurora A quinasa *In Vitro*

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la actividad de la serina-treonina quinasa. El ADN que codifica la aurora A puede ser obtenido por síntesis de genes total o por clonación. Este ADN puede entonces ser expresado en un sistema de expresión adecuado para obtener un polipéptido con actividad de serina-treonina quinasa. En el caso de aurora A, la secuencia de codificación fue aislada a partir del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clonada en los sitios de la endonucleasa de restricción BamH1 y NotI del vector de expresión de baculovirus pFastBac HTc (GibcoBRL/Life technologies). El cebador de PCR 5' contenía una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BamH1 5' para la secuencia de codificación aurora A. Esto permitió la inserción del gen aurora A en el marco con los 6 residuos de histidina, región espaciadora y sitio de escisión de proteasa rTEV codificada por el vector pFastBac HTc. El cebador PCR 3' reemplazó el codón de parada aurora A con secuencia de codificación adicional seguido por un codón de parada y una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción NotI. Esta secuencia de codificación adicional (5' TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TCT TAA 3') codificó para la secuencia de polipéptido YPYDVDPYAS. Esta secuencia, derivada de la proteína hemaglutina de influenza, es frecuentemente usada como una secuencia epítipo tag que puede ser identificada usando anticuerpos monoclonales específicos. El vector recombinante pFastBac por lo tanto codificó para una proteína Aurora-A etiquetada del epítipo de hemaglutina de influenza C terminal, etiquetada his 6 N terminal. Detalles de los métodos para el agrupamiento de las moléculas de ADN recombinante pueden ser encontrados en los textos estándares, por ejemplo Sambrook y *otros* 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2^{da} Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press y Ausubel y *otros* 1999, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc.

La producción de virus recombinantes puede ser realizada siguiendo el protocolo de los fabricantes de GibcoBRL. En resumen, el vector pFastBac-1 que porta el gen aurora A fue transformado en células de E. coli DH10Bac que contienen el genoma del baculovirus (ADN bácido) y por medio de un evento de transposición en las células, una región del vector pFastBac que contiene el gen de resistencia a la gentamicina y el gen aurora A incluyendo el promotor polihedrin baculovirus fue transpuesto directamente en el ADN bácido. Por selección de gentamicina, canamicina, tetraciclina y X-gal, las colonias

blancas resultantes deben contener ADN bÁcrido recombinante que codifica aurora A. ADN bÁcrido fue extraído a partir de un cultivo a pequeña escala de varias colonias BH10Bac blancas y transfectadas en células de *Spodoptera frugiperda* Sf21 creciendo en medio TC100 (GibcoBRL) que contienen 10% de suero usando el reactivo CellFECTIN (GibcoBRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las partículas de virus fueron cosechadas recogiendo el medio de cultivo celular 72 horas post transfección. 0.5 ml del medio fue usado para infectar 100 ml del cultivo de Sf21s en suspensión que contienen 1×10^7 células/ml. El medio de cultivo celular fue cosechado 48 horas post infección y el título del virus determinado usando un procedimiento de ensayo de placa estándar. Stocks de virus fueron usados para infectar células Sf9 y "High 5" a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 para asegurar la expresión de la proteína aurora A recombinante.

Para la expresión a gran escala de la actividad de la aurora A quinasa, células de insectos Sf21 fueron cultivadas a 28°C en medio TC100 suplementado con 10% de suero fetal de ternero (Viralex) y 0.2% F68 Pluronic (Sigma) en un arreglo de rodillos Wheaton a 3 r.p.m. Cuando la densidad celular alcanzó 1.2×10^6 células ml^{-1} estas fueron infectadas con virus recombinante aurora A de placa puro a una multiplicidad de infección de 1 y cosechadas 48 horas después. Todos los pasos de purificación posteriores fueron realizados a 4°C. Las peloticas de células de insectos congeladas que contienen un total de 2.0×10^8 células fueron descongeladas y diluidas con buffer de lisis (25 mM HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]) pH7.4 a 4°C, 100 mM KCl, 25 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro), 2 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM imidazol, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatina, 1 µg/ml leupeptina), usando 1.0 ml por 3×10^7 células. La lisis fue alcanzada usando un homogenizador dounce, seguido de lo cual el lisato fue centrifugado a 41,000g durante 35 minutos. El sobrenadante aspirado fue bombeado a una columna de cromatografía de 5 mm de diámetro que contiene 500 µl Ni NTA (ácido nitrilo-tri-acético) agarosa (Qiagen, producto no. 30250) la cual había sido equilibrada en buffer de lisis. Un nivel de línea base de absorbancia UV para el eluyente fue alcanzado después de lavar la columna con 12 ml de buffer de lisis seguido por 7 ml de buffer de lavado (25 mM HEPES pH7.4 a 4°C, 100 mM KCl, 20 mM imidazol, 2 mM 2-mercaptoetanol). La proteína aurora A unida fue eluida de la columna usando buffer de elusión (25 mM HEPES pH7.4 a 4°C, 100 mM KCl, 400 mM imidazol, 2 mM 2-mercaptoetanol). Una fracción de elusión (2.5 ml) correspondiente al pico en absorbancia UV fue recogida. La fracción de elusión, que contiene aurora A quinasa activa, fue

dialisada exhaustivamente contra el buffer de diálisis (25 mM HEPES pH7.4 a 4°C , 45% glicerol (v/v), 100 mM KCl, 0.25% Nonidet P40 (v/v), 1 mM ditioneitol).

Cada nuevo lote de la enzima aurora A fue titulado en el ensayo mediante dilución con diluyente de enzima (25mM Tris-HCl pH7.5, 12.5mM KCl, 0.6mM DTT). Para un
5 lote típico (el cual puede ser obtenido de Upstate), el stock de enzima es diluido 1µl por ml con diluyente de enzima y 20µl de la enzima diluida es usado para cada pocillo de ensayo. Los compuestos de prueba (a 10mM en dimetilsulfóxido (DMSO) fueron diluidos con agua y 10µl del compuesto diluido fue transferido a los pocillos en las placas de ensayo. Los pocillos de control "total" y "blanco" contenían 2.5% DMSO en vez del compuesto. Veinte
10 microlitros de enzima diluida fresca fue añadida a todos los pocillos, aparte de los pocillos "blanco". Veinte microlitros de diluyente de enzima fue añadido a los pocillos "blanco". Veinte microlitros de la mezcla de reacción (25mM Tris-HCl, 12.7mM KCl, 2.5mM NaF, 0.6mM ditioneitol, 6.25mM MnCl₂, 7.5mM ATP, 6.25µM sustrato péptido [biotina-LRRWSLGLRRWSLGLRRWSLGLRRWSLG]) que contienen 0.2µCi [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP
15 (Amersham Pharmacia, actividad específica $\geq 2500\text{Ci/mmol}$) fue luego añadida a todos los pocillos de prueba para iniciar la reacción. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 60 minutos. Para detener la reacción 100µl 20% v/v de ácido ortofosfórico fue añadido a todos los pocillos. El sustrato péptido fue capturado sobre una almohadilla del filtro P30 de nitrocelulosa positivamente cargada (Whatman) usando un
20 cosechador de placas de 96 pocillos (TomTek) y luego ensayado para la incorporación de ^{33}P con un contador de placa Beta. Valores de control "blanco" (sin enzima) y "total" (sin compuesto) fueron usados para determinar el rango de dilución del compuesto de prueba que dio 50% de inhibición de la actividad de la enzima (valores IC₅₀).

25 (b) Prueba de inhibición de la aurora B quinasa *In Vitro*

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la actividad serina-treonina quinasa. El ADN que codifica la aurora B puede ser obtenido por síntesis de genes total o por clonación. Este ADN puede entonces ser expresado en un sistema de expresión adecuado para obtener el polipéptido con actividad serina-treonina
30 quinasa. En el caso de aurora B, la secuencia de codificación fue aislada a partir de cADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clonada en el sistema pFastBac en una manera similar a aquella descrita anteriormente para aurora A (es decir dirigir la expresión de una proteína aurora B etiquetada 6-histidina).

Para la expresión a gran escala de la actividad de la aurora B quinasa, células de insectos Sf21 fueron cultivadas a 28°C en medio TC100 suplementado con 10% de suero fetal de ternero (Viralex) y 0.2% F68 Pluronic (Sigma) en un arreglo de rodillos Wheaton a 3 r.p.m. Cuando la densidad celular alcanzó 1.2×10^6 células ml^{-1} estas fueron infectadas con virus recombinante aurora B de placa puro a una multiplicidad de infección de 1 y cosechadas 48 horas después. Todos los pasos de purificación posteriores fueron realizados a 4°C. Las peloticas de células de insectos congeladas que contienen un total de 2.0×10^8 células fueron descongeladas y diluidas con buffer de lisis (50 mM HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]) pH7.5 a 4°C, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluouro), 1 mM ditioneitol, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatina, 1 µg/ml leupeptina), usando 1.0 ml por 2×10^7 células. La lisis fue alcanzada usando un homogenizador de sonicación, seguido de lo cual el lisado fue centrifugado a 41,000g durante 35 minutos. El sobrenadante aspirado fue bombeado a una columna de cromatografía de 5 mm de diámetro que contiene 1.0 ml de CM sefarosa Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) que había sido equilibrada en buffer de lisis. Un nivel de línea base de absorbancia UV para el eluyente fue alcanzado después de lavar la columna con 12 ml de buffer de lisis seguido por 7 ml de buffer de lavado (50 mM HEPES pH7.4 a 4°C, 1 mM ditioneitol). La proteína aurora B unida fue eluida a partir de la columna usando un gradiente de buffer de elusión (50 mM HEPES pH7.4 a 4°C, 0.6 M NaCl, 1 mM ditioneitol, corriendo desde 0% de buffer de elusión a 100% de buffer de elusión por encima de 15 minutos a una tasa de flujo de 0.5 ml/min). Las fracciones de elusión (1.0 ml) correspondientes al pico en la absorbancia UV fueron recogidas. Las fracciones de elusión fueron dializadas exhaustivamente contra el buffer de diálisis (25 mM HEPES pH7.4 a 4°C, 45% glicerol (v/v), 100 mM KCl, 0.05% (v/v) IGEPAL CA630 (Sigma Aldrich), 1 mM ditioneitol). Las fracciones dializadas fueron ensayadas para la actividad de la aurora B quinasa.

La enzima Aurora B-INCENP (como la suministrada por Upstate) fue preparada mediante la activación de aurora B (5µM) en 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1 % 2-mercaptoetanol, 0.1 mM de vandato de sodio, 10 mM acetato de magnesio, 0.1 mM ATP con 0.1 mg/ml GST-INCENP [826 - 919] a 30 °C durante 30 minutos.

Cada nuevo lote de la enzima aurora B-INCENP fue titulado en el ensayo mediante la dilución con diluyente de enzima (25mM Tris-HCl pH7.5, 12.5mM KCl, 0.6mM DTT). Para un lote típico, el stock de enzima es diluido 15µl por ml con diluyente de enzima y

20µl de la enzima diluida es usado para pocillo de ensayo. Los compuestos de prueba (a 10mM en dimetilsulfóxido (DMSO) fueron diluidos con agua y 10µl del compuesto diluido fueron transferidos a los pocillos en las placas de ensayo. "Los pocillos de control "total" y "blanco" contenían 2.5% DMSO en vez del compuesto. Veinte microlitros de enzima diluida fresca fue añadida a todos los pocillos, aparte de los pocillos "blanco". Veinte microlitros de diluyente de enzima fue añadido a los pocillos "blanco". Veinte microlitros de la mezcla de reacción (25mM Tris-HCl, 12.7mM KCl, 2.5mM NaF, 0.6mM ditioneitol, 6.25mM MnCl₂, 15mM ATP, 6.25µM sustrato péptido [biotina-LRRWSLGLRRWSLGLRRWSLGLRRWSLG]) que contienen 0.2µCi [γ^{33} P]ATP (Amersham Pharmacia, actividad específica ≥ 2500 Ci/mmol) fue luego añadida a todos los pocillos de prueba para iniciar la reacción. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 60 minutos. Para detener la reacción 100µl 20% v/v de ácido ortofosfórico fue añadido a todos los pocillos. El sustrato péptido fue capturado sobre una almohadilla del filtro P30 de nitrocelulosa positivamente cargada (Whatman) usando un cosechador de placas de 96 pocillos (TomTek) y luego ensayado para la incorporación de 33 P con un contador de placa Beta. Valores de control "blanco" (sin enzima) y "total" (sin compuesto) fueron usados para determinar el rango de dilución del compuesto de prueba que dio 50% de inhibición de la actividad de la enzima (valores IC₅₀).

20 (c) Ensayo de fosforilación del sustrato y el fenotipo de la célula *In Vitro*

Este ensayo es usado para determinar los efectos celulares de los compuestos sobre las células tumorales SW620 del colon humano *in vitro*. Los compuestos típicamente causan inhibición de los niveles de fosfohistona H3 y un incremento en el área nuclear de las células.

25 10^4 células SW620 por pocillo fueron colocadas en 100µl del medio DMEM (que contiene 10 % FCS y 1% glutamina) (DMEM es el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (Sigma D6546)) en placas costar de 96 pocillos y se dejan toda la noche a 37°C y 5% CO₂ para adherirse. Las células fueron luego dosificadas con el compuesto diluido en el medio (50 µl es añadido a cada pocillo para dar concentraciones del compuesto de 0.00015µ - 1 µM) y después de 24 horas de tratamiento con el compuesto, las células fueron fijadas.

30 Las células fueron primero examinadas usando un microscopio de luz y cualquiera de los cambios celulares en morfología fueron notados. 100 µl de formaldehído 3.7 % fue luego añadido a cada pocillo, y la placa se dejó durante al menos 30 minutos a temperatura

ambiente. Decantar y golpear la placa en una toalla de papel eliminó el fijador y las placas fueron luego lavadas una vez en PBS (Solución Salina con Buffer de Fosfato de Dulbecco (Sigma D8537)) usando un lavador de placas automatizado. 100 µl de PBS y 0.5 % de triton X-100 fue añadido y las placas fueron puestas en un agitador durante 5 minutos. Las
5 placas fueron lavadas en 100 µl de PBS y la solución balanceada. 50 µl del anticuerpo primario, 1:500 anti-fosfohistona H3 de conejo en PBS 1% BSA (albúmina de suero bovino) y 0.5 % de tween, fue añadido. Anti-fosfohistona H3 de conejo policlonal 06-750 fue comprada a Upstate Biotechnology. Las placas se dejaron 1 hora a temperatura ambiente en un agitador.

10 El día siguiente, el anticuerpo fue vertido y las placas fueron lavadas dos veces con PBS. En un área sin luz, 50 µl del anticuerpo secundario, 1:10,000 Hoechst y 1:200 Alexa Fluor 488 IgGA de cabra anti-conejo (cat no. 11008 sondas moleculares) en PBS 1 % de BSA, 0.5 % de tween fue añadido. Las placas fueron enrolladas en papel de aluminio y agitadas durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo fue vertido y las placas
15 fueron lavadas dos veces con PBS. 200 µl de PBS fueron añadidos a cada pocillo, y las placas fueron agitadas durante 10 minutos, el PBS fue eliminado. 100 µl de PBS fueron añadidos a cada pocillo y las placas fueron selladas rápidamente para el análisis. El análisis fue llevado a cabo usando un algoritmo Arrayscan Target Activation para medir los niveles celulares de fosfohistona H3 y los cambios en el área nuclear. Los resultados fueron
20 reportados como la concentración efectiva requerida para dar 50% de inhibición de los niveles de fosfohistona H3 y de manera similar para un 50% de incremento en el área nuclear de las células (valores EC50).

La invención es ilustrada aquí por medio de Ejemplos no limitativos, datos y Figuras en los cuales, a menos que otra cosa sea declarada:-

- 25 (i) los rendimientos son dados para la ilustración solamente y no son necesariamente el máximo alcanzable;
- (ii) cuando el producto es usado para la siembra puede ser obtenido por procesos conocidos previamente tal como aquellos descritos en WO 2004/058781;
- 30 (iii) la identidad del co-cristal de maleato AZD1152 preparado como se describió aquí fue confirmada por ¹H NMR a 400 MHz en dimetilsulfóxido hexadeuterado con tetrametilsilano (TMS) añadido como referencia (TMS = 0.00 ppm).

Como se describió aquí AZD1152 y AZD1152 HQPA son divulgados en WO 2004/058781. Los detalles del proceso proporcionado en WO2004/058781 con relación a AZD1152, AZD1152 HQPA y todos los productos intermedios en la ruta a dichos compuestos son incorporados aquí como referencia en su totalidad.

5

Método de Preparación 1

Paso 1 - Preparación de 7-(3-hidroxipropoxi)quinazolin-4(3H)-ona

Ácido 2-amino-4-fluorobenzoico y 1,3-propanodiol fueron agitados juntos y calentados hasta 120°C. Acetato de formamidina fue añadido y la mezcla agitada durante 3.5 horas para producir 7-fluoroquinazolina-4-ona. Una solución de hidróxido de potasio en 1,3-propanodiol fue luego añadida a la mezcla durante un período de 2 horas y 50 minutos, la cual fue luego enfriada a 15°C. A continuación de esto, la mezcla fue calentada hasta 125°C durante 5 horas antes de enfriar hasta 75°C. Ácido clorhídrico diluido (alrededor de 6% p/p) fue gradualmente añadido a la mezcla de reacción hasta que el pH 4.5 fue alcanzado. La mezcla fue enfriada hasta 0°C durante 6 horas y mantenida a esa temperatura durante una hora adicional antes del aislamiento del producto crudo por centrifugación. El material crudo fue lavado con agua y secado al vacío antes de disolverse en metanol a reflujo moderado y parcialmente concentrarse a presión reducida a una temperatura de 42°C. Esta solución fue luego enfriada hasta 0°C durante un período de 3 horas y el producto resultante fue aislado por filtración, antes del secado al vacío. 7-(3-Hidroxipropoxi)quinazolin-4(3H)-ona fue recuperada en un rendimiento de 73%.

¹H-NMR (DMSO d₆) : 11.90 (br s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.10 (m, 2H), 4.17 (t, 2H), 3.58 (t, 2H), 1.92 (m, 2H) :

MS (+ve ESI) : 221 (M+H)⁺

25

Paso 2 - Preparación de 4-cloro-7-(3-cloropropoxi)quinazolina

7-(3-Hidroxipropoxi)quinazolin-4(3H)-ona, tolueno y *N,N*-diisopropil-formamida (DIPF) fueron mezclados juntos y calentados hasta 76°C, antes que el cloruro de tionil fuera añadido durante un período de 1 hora a 76°C. Cloruro de tionil adicional fue luego añadido durante un período de 1 hora después de lo cual la temperatura fue mantenida a 76°C durante 1 hora. La mezcla fue refluida durante 11 horas para efectuar una solución clara la cual fue enfriada hasta 38°C y sometida a destilación al vacío para eliminar el tolueno y el cloruro de tionil. Tolueno fue luego añadido y la solución mantenida a 35°C mientras fue aclarada con la ayuda de un filtro (celita o harborlita y carbón activado). La solución

30

resultante fue parcialmente concentrada antes que el heptano fuera añadido y la mezcla enfriada hasta 0°C y agitada durante 23 horas. La suspensión marrón clara que se formó fue aislada por filtración, lavada con heptano frío y luego secada al vacío a 30°C para producir 4-cloro-7-(3-cloropropoxi)quinazolina (63.6%)

- 5 ¹H-NMR (DMSO d₆) : 13.25 (br s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.17 (m, 2H), 4.21 (t, 2H), 3.83 (t, 2H), 2.23 (m, 2H) :
MS (+ve ESI) : 257, 259 (M+H)⁺.

Paso 3 - Preparación de ácido (3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)acético

- 10 4-Cloro-7-(3-cloropropoxi)quinazolina fue añadido a 1 equivalente molar de una solución de ácido (3-amino-1H-pirazol-5-il)acético en N-metilpirrolidinona (NMP) y luego se dejó por un período de 12 horas. La cristalización del producto fue observada que ocurrió con y sin siembra y con y sin la adición de acetonitrilo como un antisolvente. El sólido resultante
15 fue aislado por filtración, lavado con N-metilpirrolidinona y acetonitrilo y luego secado al vacío para producir ácido (3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)acético hidrocloreuro como un sólido blanco hueso:

- ¹H-NMR (DMSO d₆; contiene NMP como un solvato) : 8.92 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.46 (pr de d, 1H), 7.38 (d, 1H), 6.7 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.85 (t, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.3 (t, 2H), 2.7
20 (s, 3H), 2.51 (m, 6H), 2.27 (m, 2H), 2.18 (t, 2H), 1.93 (m, 2H).
MS (+ve ESI) : 362.1015 (M+H)⁺.

Paso 4 - Preparación de 2-(3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida

- 25 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), N-metilmorfolina y 3-fluoroanilina (en gran exceso) fueron añadidos a una suspensión de ácido (3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)acético hidrocloreuro en N,N-dimetilacetamida (DMA) y la lechada resultante fue agitada a o por debajo de la temperatura ambiente. Una solución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreuro (EDCI.HCl) previamente disuelta en
30 agua fue luego añadida de una manera controlada durante un período de 8 horas de forma de mantener la reacción a temperatura ambiente. La mezcla fue sembrada con una pequeña cantidad del producto y se dejó agitar por varias horas. Acetonitrilo antisolvente seguido por agua fueron también añadidos para precipitar más producto. El material fue aislado por filtración y la torta lavada con una mezcla de N,N-dimetilacetamida : agua : acetonitrilo,

acetonitrilo caliente y luego secado (al vacío o bajo una corriente de nitrógeno) para producir 2-(3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida.

¹H-NMR (DMSO d₆; contiene DMA residual): 10.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.59 (pr de m, 1H), 7.46 (pr de d, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.95 (s), 2.83 (s), 2.56 (s), 2.25 (m, 2H), 1.95 (s) :

MS (+ve ESI) : 455 (M+H)⁺.

Paso 5 - Preparación de 2-{3-[(7-{3-[etil(2-hidroxietil)amino]propoxi}-quinazolin-4-il)amino]-1H-pirazol-5-il]-N-(3-fluorofenil)acetamida (AZD1152 HOPA)}

2-(3-{[7-(3-Cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida y 2-(etilamino)etanol (12 equivalentes molares) fueron añadidos a *N,N*-dimetilacetamida bajo una atmósfera inerte (tal como proporcionada por nitrógeno) y la mezcla calentada hasta 90°C con agitación. Después de 12 horas, fue añadida agua de una manera controlada y el lote sembrado con el producto mientras estaba caliente. La mezcla fue enfriada hasta 20°C de una manera cuidadosamente controlada para cristalizar el producto en la forma requerida. El producto fue luego filtrado y lavado con una mezcla de agua/ *N,N*-dimetilacetamida y acetonitrilo. A continuación de esto, la torta fue hecha una lechada durante un período con acetonitrilo caliente (40°C), filtrada, lavada con más acetonitrilo y luego secada (al vacío o bajo una corriente de nitrógeno) para proporcionar la 2-{3-[(7-{3-[etil(2-hidroxietil)amino]propoxi}-quinazolin-4-il)amino]-1H-pirazol-5-il]-N-(3-fluorofenil)acetamida anhidra como un sólido blanco hueso en un rendimiento de ~90%. ¹H-NMR (DMSO d₆): 10.55 (s, 1H), 9.45 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.63 (pr de m, 1H), 7.47 (pr de d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.76 (t, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.25 (m, 4H), 2.25 (m, 2H), 1.25 (t, 3H): MS (+ve ESI) : 508.4 (M+H)⁺.

Paso 6 - Preparación de mono(tert-butil) 2-[[3-[(4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil})-1H-pirazol-3-il)amino]-quinazolin-7-il]oxi]propil](etil)amino]etil fosfato [AZD1152 t-Bu P(5)éster]

2-{3-[(7-{3-[Etil(2-hidroxietil)amino]propoxi}-quinazolin-4-il)amino]-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida y piridina.hidrocloruro fueron mezclados en *N,N*-dimetilacetamida y la solución enfriada hasta -15°C. Di-tert-butil dietilfosforamidita (1.5 – 2.1 equivalentes molares) fue luego añadido mientras la temperatura fue mantenida. La

mezcla de reacción fue tratada *in situ* con 30% p/p de peróxido de hidrógeno (alrededor de 4.2 equivalentes molares) mientras la temperatura fue mantenida por debajo de la temperatura ambiente. El peróxido de hidrógeno remanente fue destruido por la adición de metabisulfito de sodio (como una solución acuosa 10% p/v) mientras se mantiene la temperatura por debajo de 40°C. La solución resultante de di-tert-butil 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil})-1H-pirazol-3-il]amino]quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato fue luego calentada hasta 40°C y la solución de hidróxido de sodio (2M) fue añadida para ajustar hasta pH 5 – 6.5. La temperatura y el pH fueron mantenidos durante un período de alrededor de 90 minutos con siembra. Luego fue cargada agua y el pH ajustado adicionalmente hasta dentro del rango de pH 8 – 9 para optimizar la recuperación. La mezcla de reacción caliente fue filtrada directamente para proporcionar mono-tert-butil 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil})-1H-pirazol-3-il]amino]quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato el cual fue lavado con una mezcla de N,N-dimetilacetamida/agua y agua y finalmente secado (al vacío o una corriente de un gas inerte adecuado) para proporcionar mono(tert-butil) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil})-1H-pirazol-3-il]amino]-quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato como un sólido blanco hueso a un rendimiento de entre 86 – 93%.

¹H-NMR (DMSO d₆): 10.48 (s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.67 (pr de m, 1H), 7.48 (pr de d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.34 (t, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (t, 3H):

MS (+ve ESI): (M+H)⁺ 644.2761 fragmento (menos butil) 588.2147.

Paso 7 - Preparación de 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil})-1H-pirazol-3-il]amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato (AZD1152)

Mono(tert-butil) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil})-1H-pirazol-3-il]amino]-quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato fue suspendido en una mezcla 1:1 de agua/tetrahidrofurano (THF) y tratada a elevadas temperaturas (preferiblemente 50-60°C) con un exceso de entre 1.5 y 3.0 equivalentes molares de ácido clorhídrico durante un período de alrededor de 1 hora. La solución caliente fue luego basificada usando 2.0M hidróxido de sodio hasta dentro del rango de pH 4.5-5.5, enfriada hasta 60°C y sembrada. Fue añadida agua a la lechada de una manera controlada con enfriamiento controlado de la

mezcla de cristalización hasta la temperatura ambiente y el producto fue aislado por filtración. La torta del filtro fue lavada con agua y secada al vacío. Después de secarse, el sólido 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato fue equilibrado bajo

5 condiciones ambiente hasta el peso constante para dar una forma hidratada como un material en forma de aguja amarillo pálido.

¹H-NMR (DMSO d₆):

MS (+ve ESI): 587.8 (M+H)⁺

¹H-NMR (DMSO d₆) : 10.53 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.37 (m, 2H),

10 7.27 (s, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.13 (q, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.24 (t, 3H) :

MS (+ve ESI): 588 (M+H)⁺.

C₂₆H₃₁FN₇O₆P + 3.0 H₂O requiere C, 48.7%; H, 5.8%; N, 15.3%; Encontrado C, 48.8%; H, 5.35%; N, 15.15%.

15

Paso 8 - Preparación de 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato.maleato [AZD1152 maleato]

Ácido 2-butenodioico (Z) (1.57 equivalentes molares; 449.80 µmoles; 52.21 mg) fue

20 disuelto en metanol (123.54 mmoles; 5.00 ml; 3.96 g) y a esta solución fue añadida una solución metanólica de AZD1152 previamente preparada (como el trihidrato en forma libre - 1.00 equivalentes molares, 286.14 µmoles; 40.00 mL; 31.87 g) seguido por más metanol (123.54 mmoles; 5.00 mL; 3.96 g). La mezcla se dejó agitar toda la noche a temperatura ambiente. Una suspensión blanca fue producida y el sólido recuperado por filtración luego

25 secado al vacío. El análisis por NMR confirmó que el co-cristal era el maleato.

Paso Alternativo 8:

AZD1152 crudo (estimado a 7.44g @ 100%, 11.61 milimoles) fue añadido a dimetilsulfóxido (36ml) y dejado al ambiente para producir una solución marrón pálido. A

30 esta solución fue añadida una solución de ácido maleico (1.76g, 15.16 milimoles, 1.31 equivalentes molares) en metanol (36ml) y la mezcla se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente una alícuota de la solución clara fue transferida a un frasco, rayado y se dejó sellado por varias horas. Un depósito de sólido blanco se formó y esto fue transferido al frasco y se agitó. Gradualmente la solución se tornó turbia y el

sólido fue depositado. La lechada se dejó asentar por varias días y finalmente fue filtrada. La torta fue lavada con una mezcla 1:1 de dimetilsulfóxido/metanol (15ml en total), hecha una lechada *in situ* con metanol (3 x 25ml) y luego secada al vacío. La NMR confirmó que el sólido era el co-cristal de maleato de AZD1152 (con un rendimiento de alrededor de 78.7%).

Método de Preparación 2

Paso 1 - Preparación de 2-(3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida

10

A una suspensión de ácido (3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)acético.hidrocloruro (preparada como es descrito en el Método de Preparación 1 anterior) en *N,N*-dimetilacetamida (DMA) es añadida 4-dimetilaminopiridina (DMAP) mientras se mantiene a temperatura de 15 - 25°C (idealmente 15°C) seguido por *N*-metilmorfolina mientras también se mantiene la temperatura. 3-Fluoroanilina (en un gran exceso el cual idealmente está entre 10 – 15 equivalentes molares) es añadida a una velocidad tal de manera que se mantenga la temperatura por debajo de 25°C. Mientras tanto 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloruro (EDCI.HCl) es disuelto en agua para proporcionar una solución de alrededor de 42% p/v (la cantidad de agua presente es importante para el resultado de la cristalización posteriormente en el proceso). Esta solución es añadida de una manera controlada a la lechada durante un período de 8 horas de manera que se mantenga la reacción entre 20 - 25°C; luego la mezcla es sembrada con cristales de la forma preferida del producto (idealmente una cantidad de alrededor de 1% del rendimiento esperado). La mezcla es agitada durante alrededor de 16 horas mientras se mantiene la temperatura (idealmente 20 - 25°C) luego acetonitrilo antisolvente seguido por agua son añadidos en una manera controlada y para mantener la temperatura entre 20 - 25°C seguido por una agitación extendida de alrededor de 21 horas; esto es para optimizar la recuperación y formar el producto. El material es aislado por filtración y la torta lavada con una mezcla de *N,N*-dimetilacetamida : agua : acetonitrilo (relaciones en volumen de 5 : 3 : 2), acetonitrilo y luego secado (al vacío o bajo una corriente de nitrógeno) para proporcionar 2-(3-{[7-(3-cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida que contiene algo de DMA con rendimiento de alrededor de 76 - 78% .

¹H-NMR (DMSO d₆; contiene DMA residual): 10.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.59 (pr de m, 1H), 7.46 (pr de d, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.95 (s), 2.83 (s), 2.56 (s), 2.25 (m, 2H), 1.95 (s) :
MS (+ve ESI): 455 (M+H)⁺.

5

Paso 2 - (Preparación de 2-{3-[(7-{3-[etil(2-hidroxietil)amino]propoxi}-quinazolin-4-il)amino]-1H-pirazol-5-il}-N-(3-fluorofenil)acetamida (AZD1152 HOPA)

2-(3-{[7-(3-Cloropropoxi)quinazolin-4-il]amino}-1H-pirazol-5-il)-N-(3-fluorofenil)acetamida y 2-(etilamino)etanol (idealmente 12 equivalentes molares) fueron
10 añadidos a N,N-dimetilacetamida bajo una atmósfera inerte (tal como proporcionado por nitrógeno) y la mezcla calentada hasta 90°C con agitación. Después de un período de 12 - 16 horas (idealmente 12 horas) la reacción es enfriada de nuevo hasta alrededor de 85°C y es añadida agua de una manera controlada para mantener la temperatura entre 80 - 85°C. El
15 lote es ajustado hasta 80°C y sembrado con cristales de la forma preferida del producto (idealmente una cantidad de alrededor de 1% del rendimiento esperado). La mezcla fue enfriada hasta 20°C de una manera cuidadosamente controlada durante un período de alrededor de 20 horas para cristalizar el producto en la forma requerida y de un tamaño suficiente para proporcionar una buena velocidad de la filtración. El producto es luego
20 filtrado y lavado con una mezcla de agua / N,N-dimetilacetamida y acetonitrilo y extraído el licor adecuadamente para proporcionar una forma hidratada del producto. A continuación de esto, la torta es hecha una lechada *in situ* durante un período (idealmente 2 horas) con acetonitrilo caliente (idealmente a una temperatura de 40°C) luego filtrada, lavada con más acetonitrilo y luego secada (al vacío o bajo una corriente de nitrógeno)
25 para proporcionar la 2-{3-[(7-{3-[etil(2-hidroxietil)amino]propoxi}-quinazolin-4-il)amino]-1H-pirazol-5-il}-N-(3-fluorofenil)acetamida casi anhidra como un sólido blanco hueso con un rendimiento de 85 - 90%.

¹H-NMR (DMSO d₆): 10.55 (s, 1H), 9.45 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.63 (pr de m, 1H), 7.47 (pr de d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.76 (t, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.25 (m, 4H), 2.25 (m, 2H), 1.25 (t, 3H):
30 MS (+ve ESI): 508.4 (M+H)⁺.

Paso 3 - Preparación de mono(tert-butil) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]-quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato [AZD1152 t-Bu P(5)éster]

5 A una lechada de piridina.hidrocloruro en *N,N*-dimetilacetamida fue cargada una solución de 2-{3-[(7-{3-[Etil(2-hidroxietil)amino]propoxi}-quinazolin-4-il)amino]-1H-pirazol-5-il}-*N*-(3-fluorofenil)acetamida y di-tert-butil dietilfosforamidita (idealmente 1 equivalente molar) en *N,N*-dimetilacetamida durante un período extendido (idealmente 3 horas) y se mantiene la temperatura entre -20 a -10°C (idealmente -15°C). Esto es seguido por la
10 adición posterior de di-tert-butil dietilfosforamidita (idealmente 0.5 equivalentes molares) durante un período de 1 hora también para mantener la temperatura entre -20 a -10°C (idealmente -15°C).

La mezcla de reacción es tratada *in situ* con 30% p/p de peróxido de hidrógeno (alrededor
15 de 4.2 equivalentes molares) mientras la temperatura fue mantenida por debajo de -10°C (idealmente -12 a -8°C) y mantenida durante un período a esta temperatura (idealmente 16 horas). El peróxido de hidrógeno remanente es destruido por la adición de metabisulfito de sodio (como una solución acuosa 10% p/v) mientras se mantiene la temperatura por debajo de 40°C.

20 La solución resultante de di-tert-butil 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato fue luego calentada hasta 40°C y la solución de hidróxido de sodio (idealmente 2M) fue añadida para ajustar hasta pH 5.5 - 6.5 (idealmente pH 6) con siembra con material adecuadamente
25 cristalino. La temperatura es mantenida y un rango de pH 5-6 es mantenido por la adición de una solución de hidróxido de sodio extra durante un período de al menos 2 horas. Luego es cargada agua y el pH ajustado adicionalmente hasta dentro del rango de pH 8 - 9 (idealmente pH 8.8) mientras se mantiene la temperatura (idealmente 40°C pero dentro del rango de 35 - 45°C) durante un período de 16 horas para optimizar la recuperación. La
30 mezcla de reacción caliente es filtrada directamente para proporcionar mono-tert-butil 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etil fosfato el cual fue lavado varias veces con agua y finalmente secado (ya sea al vacío o una corriente de un gas inerte adecuado) para proporcionar el mono(tert-butil) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-

il)amino]-quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino}etil fosfato como un sólido blanco hueso a un rendimiento de entre 86 - 93%.

¹H-NMR (DMSO d₆): 10.48 (s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.67 (pr de m, 1H), 7.48 (pr de d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.34 (t, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (t, 3H):

MS (+ve ESI): (M+H)⁺ 644.2761 fragmento (menos butil) 588.2147.

Paso 4 - Preparación de 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato (AZD1152)

Mono(tert-butil) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]-quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino}etil fosfato fue suspendido en una mezcla de agua/tetrahidrofurano (THF) y tratado con un exceso de entre 1.5 y 3.0 equivalentes molares de ácido clorhídrico (idealmente de una concentración de 2M y conteniendo 1.5 equivalentes molares). La mezcla es calentada hasta 55 - 65°C (idealmente 60°C) y mantenida a 60°C durante alrededor de 1 hora. La solución caliente es luego basificada usando hidróxido de sodio (preferiblemente de 2M de concentración y conteniendo 1.7 equivalentes molares) para proporcionar un pH dentro del rango de pH 5.0 - 5.5 y luego sembrada a 55 - 65°C (idealmente 60°C) con cristales de la forma preferida del producto (idealmente una cantidad de alrededor de 0.05% p/p del rendimiento esperado). La mezcla es agitada a esta temperatura durante al menos una hora antes que el agua sea añadida y la lechada agitada y enfriada de una manera controlada durante un período de alrededor de 12 horas antes de agitar a temperatura ambiente durante al menos 4 horas y luego aislar el producto por filtración. La torta del filtro es lavada sucesivamente con agua luego THF y secada ya sea al vacío o usando un procedimiento de humidificación mediante el cual un gas inerte humedecido con vapor de agua es pasado sobre el sólido hasta que un peso constante es obtenido. Después del secado al vacío el sólido 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato es equilibrado bajo condiciones ambiente hasta el peso constante para dar una forma hidratada como un material en forma de aguja amarillo pálido. El producto es obtenido con un rendimiento de alrededor de 81%.

¹H-NMR (DMSO d₆):

MS (+ve ESI): 587.8 (M+H)⁺

¹H-NMR (DMSO d₆) : 10.53 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.13 (q, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.24 (t, 3H) :

5 MS (+ve ESI) : 588 (M+H)⁺.

C₂₆H₃₁FN₇O₆P + 3.0 H₂O requiere C, 48.7%; H, 5.8%; N, 15.3%; Encontrado C, 48.8%; H, 5.35%; N, 15.15%.

Paso 5 - Preparación de 2-{etil[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1H-pirazol-3-il)amino]quinazolin-7-il}oxi)propil]amino}etil dihidrógeno fosfato.maleato [AZD1152 maleato]

Ácido 2-Butenodioico (Z) (1.57 equivalentes molares; 449.80 µmoles; 52.21 mg) fue disuelto en metanol (123.54 mmoles; 5.00 ml; 3.96 g) y a esta solución fue añadida una solución metanólica previamente preparada de AZD1152 (como el trihidrato en forma libre - 1.00 equivalentes molares, 286.14 µmoles; 40.00 mL; 31.87 g) seguido por más metanol (123.54 mmoles; 5.00 mL; 3.96 g). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Una suspensión blanca fue producida y el sólido recuperado por filtración y luego secado al vacío. El análisis por NMR confirmó que el co-cristal era el maleato de AZD1152.

Alternativa al Paso 5 anterior:

AZD1152 crudo (estimado a 7.44g @ 100%, 11.61 milimoles) fue añadido a dimetilsulfóxido (36ml) y dejado al ambiente para producir una solución marrón pálido. A esta solución fue añadida una solución de ácido maleico (1.76g, 15.16 milimoles, 1.31 equivalentes molares) en metanol (36ml) y la mezcla se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente una alícuota de la solución clara fue transferida a un frasco, rayado y se dejó sellado por varias horas. Un depósito de sólido blanco se formó y esto fue transferido al frasco y se agitó. Gradualmente la solución se tornó turbia y el sólido fue depositado. La lechada se dejó asentar por varios días y finalmente se filtró. La torta fue lavada con una mezcla 1:1 de dimetilsulfóxido/metanol (15ml en total), hecha una lechada *in situ* con metanol (3 x 25ml) y luego secada al vacío. El análisis por NMR confirmó que el co-cristal era el maleato de AZD1152 (con un rendimiento de alrededor de 78.7%).

Alternativa adicional al Paso 5 anterior:

AZD1152 (como el trihidrato en forma libre - 1.00 equivalente molar, 8.51 mmoles; 5.74 g) y ácido 2-butenodioico (Z) (1.20 equivalentes molares; 10.2 mmoles; 1.19 g) son
5 disueltos en dimetilsulfóxido (35ml) y calentados hasta 60°C. El acetonitrilo antisolvente (20 ml) fue añadido a la mezcla caliente luego la mezcla es sembrada con cristales de la forma preferida del producto AZD1152 Maleato (0.005 equivalentes molares; 42.6 micromoles; 30.7 mg - idealmente una cantidad de alrededor de 0.5% p/p del rendimiento esperado). La mezcla de reacción es mantenida a 60°C durante 4 horas antes que un carga
10 adicional de acetonitrilo (40 ml) sea añadida durante un período de 3 horas. La mezcla se deja agitando a 60°C durante 12 – 20 horas (idealmente 16 horas). La reacción es enfriada hasta 20°C de una manera controlada y el producto es aislado por filtración. La torta es lavada con una mezcla de dimetilsulfóxido/acetonitrilo (relación en volumen 1 : 2) seguido por acetonitrilo. El sólido es secado al vacío o bajo una corriente de gas inerte caliente
15 (idealmente 40°C) para proporcionar el AZD1152 Maleato como un sólido blanco con un rendimiento alrededor de 88%.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1: Patrón de difracción de rayos-X en polvo para el co-cristal de maleato de AZD1152 (preparado por el Método 1 anterior) - con los valores 2θ trazados en el eje
20 horizontal y la intensidad lineal relativa (conteo) trazada en el eje vertical.

Figura 2: Un Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido para el co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método 1 anterior.

Figura 3: Un Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido para el co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método 2 anterior.

25 Figura 4: Trazo de la Isoterma de Sorción de Vapor Dinámico para un lote del co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método 1 anterior.

Figura 5: Trazo de la Isoterma de Sorción de Vapor Dinámico para un lote del co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método 2 anterior.

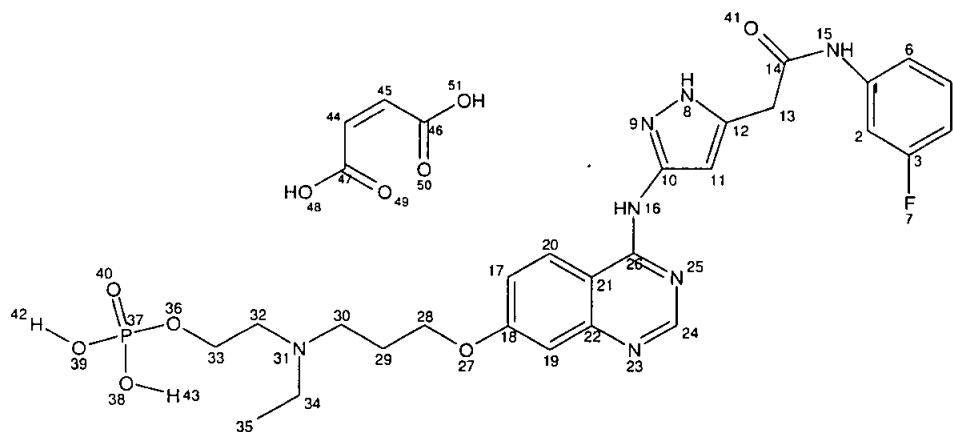
Figura 6: Trazo de la Isoterma de Sorción de Vapor Dinámico para la forma libre de
30 AZD1152.

Figura 7: Patrón de difracción de rayos-X en polvo para el co-cristal de maleato de AZD1152 (preparado por el Método 2 anterior) - con los valores 2θ trazados en el eje horizontal y la intensidad lineal relativa (cuenta) trazada en el eje vertical.

5 Datos de Caracterización

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

La estructura y la relación aproximada de componentes en el co-cristal pueden ser confirmadas con la espectroscopia NMR del protón. Los datos típicos son mostrados a continuación.



10

Desviación química / ppm		Desviación química / ppm	
Átomo	¹ H	Átomo	¹ H
1	NR	27	NR
2	7.63 (m)	28	4.32 (2H t, 5.8)
3	NR	29	2.25 (m)
4	6.89 (m)	30	3.37 (m)
5	7.33 (m)	31	NR
6	7.37 (m)	32	3.48 (m)
7	NR	33	4.22 (m)
8	9.76* (s, amplio)	34	3.30 (2H q, 7.1)
9	NR	35	1.28 (3H t, 7.1)
10	NR	36	NR
11	6.77 (s)	37	NR

Desviación química / ppm		Desviación química / ppm	
Átomo	¹ H	Átomo	¹ H
12	NR	38	NR
13	3.85 (s)	39	NR
14	NR	40	NR
15	10.51 (s)	41	NR
16	11.99* (s, amplio)	42	14.0 (s, amplio)
17	7.48 (dd, 9.1, 2.4)	43	14.0 (s, amplio)
18	NR	44	6.28 (s)
19	7.29 (d, 2.4)	45	6.28 (s)
20	8.81(d, 9.3)	46	NR
21	NR	47	NR
22	NR	48	14.0 (s, amplio)
23	NR	49	NR
24	8.98 (s)	50	NR
25	NR	51	14.0 (s, amplio)
26	NR		

NR = No Resonancia

La integración NMR ajusta aproximadamente con una relaciona 1: 1.04 ácido maleico a AZD1152.

5 **Calorimetría Diferencial de Barrido**

El análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) fue conducido en el co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con los Métodos de Preparación 1 y 2 usando un Mettler DSC820e. Muestras de típicamente menos de 5mg de material contenidas en una cacerola de 40µl aluminio ajustada con una tapa perforada fueron
 10 calentadas por encima del rango de temperatura 25°C a 325°C a una tasa de calentamiento constante de 10°C por minuto. Un gas de purga usando nitrógeno fue usado - tasa de flujo 100 ml por minuto.

Los resultados para un lote del co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método 1 anterior (ver figura 2) indica que el co-cristal de maleato muestra
 15 una endoterma puntiaguda, grande con una temperatura de inicio de 180°C debido a la

107
fusión. A continuación de la fusión un gran evento endotérmico es observado debido a la degradación del ácido maleico seguido de la fusión. Se entenderá que los valores de temperatura pico y/o de inicio de la DSC pueden variar ligeramente desde una máquina a otra, un método a otro o de una muestra a otra, y por lo tanto los valores cotizados no son
5 interpretados como absolutos.

Los resultados para el co-cristal de maleato de AZD1152 preparado por el Método 2 anterior (ver figura 3) indican que el co-cristal de maleato muestra una endoterma puntiaguda, grande con una temperatura de inicio de 183°C debido a la fusión. A continuación de la fusión un gran evento endotérmico es observado debido a la
10 degradación del ácido maleico seguido de la fusión. Se entenderá que los valores de temperatura pico y/o de inicio de la DSC pueden variar ligeramente desde una máquina a otra, un método a otro o de una muestra a otra, y por lo tanto los valores cotizados no son interpretados como absolutos.

15 **Sorción de Vapor Dinámico**

Instrumento Analítico: Analizador de Sorción de Vapor Dinámico de Sistemas de Mediciones de Superficie.

Alrededor de 5 mg de material contenido en un sujetador de cuarzo a una temperatura especificada fue sometido a nitrógeno humidificado a una tasa de flujo de 200 ml/minuto
20 de nitrógeno a 25°C a las siguientes humedades relativas (HR): 0, 20, 40, 60, 80, 95, 80, 60, 40, 20, 0% HR en duplicado.

El peso del material a una humedad relativa particular fue monitoreado hasta que fue estable de acuerdo con un criterio de peso de 0.002% de cambio de peso por minuto promediado en 10 minutos. Si el peso siguió cambiando entonces este se quedó a una
25 humedad relativa particular hasta que el peso fue estable (hasta un tiempo máximo de 12 horas).

Los resultados para un lote del co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método 1 son mostrados en la Figura 4. Los resultados para un lote del co-cristal de maleato de AZD1152 preparado de acuerdo con el Método anterior 2 son
30 mostrados en la Figura 5.

Los resultados de la Sorción de Vapor Dinámico mostrados en las Figuras 4 y 5 indican que la muestra no es higroscópica y la ganancia de peso es atribuida a la adsorción superficial. La pérdida de peso observada en la Figura 5 durante el Ciclo 1 es atribuida a una pequeña cantidad de solvente presente en la muestra de fabricación. Esto se confirmó

por el peso reducido a 0%HR. Una vez que este solvente se ha evaporado el material mantiene su peso a 0%HR. Esta observación será completamente entendida por la persona versada en el arte.

La Sorción de Vapor Dinámico de la forma libre de AZD1152 es mostrada en la
5 Figura 6.

La Sorción de Vapor Dinámico de la forma libre de AZD1152 indica que el nivel de agua es casi variable dependiendo de la humedad relativa de almacenamiento. Este cambio en el nivel de agua se debe a los diferentes estados de hidratación que pueden oscilar desde un estado deshidratado a un estado tetrahidratado y superior.

10

Difracción de Rayos X en Polvo

Se declaró anteriormente que el patrón de difracción de rayos-X en polvo para el co-cristal de maleato de AZD1152 es mostrado en la Figura 1.

Un método de fabricación adicional para el maleato de AZD1152 ha sido
15 presentado en el método 2 anterior. El patrón de difracción de rayos-X en polvo para el co-cristal de maleato de AZD1152 producido por el Método 2 es mostrado en la Figura 7. Los picos son mostrados en la tabla 2 a continuación.

20

Tabla 2

Ángulo (2-theta)	Intensidad relativa (%)	Ángulo (2-theta)	Intensidad relativa (%)
5.13	80.3	22.45	13.5
6.45	57.9	23.22	21.8
8.14	40.5	23.58	33.8
10.18	9.1	23.98	20.8
11.96	7.8	24.30	14.8
12.85	58.4	24.65	16.1
13.85	14.3	25.56	27.8
14.96	12.5	25.83	52.5
15.27	25.7	26.37	35.6
15.75	13	27.98	38.4
16.53	19.7	28.44	34.3
17.29	23.6	28.91	16.9
19.31	100	29.72	29.6
19.78	55.1	30.34	13
20.10	99.5	32.72	14.5
20.60	40.5	36.21	22.3

21.01	20.5	38.18	11.9
21.68	82.3		

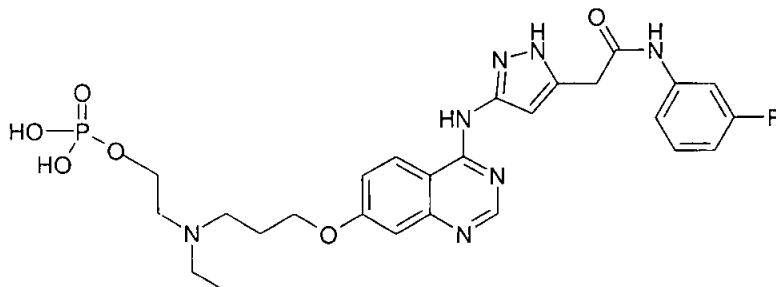
Como se declaró anteriormente, es conocido en el arte que el patrón de difracción de rayos-X en polvo puede ser obtenido el cual tiene uno o más errores de medición dependiendo de las condiciones de medición (tal como el equipamiento, preparación de la muestra o máquina usada). En particular, es generalmente conocido que las intensidades en el patrón de difracción de rayos-X en polvo pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de medición y la preparación de la muestra. Por ejemplo, las personas versadas en el arte de la difracción de rayos-X en polvo se percatará de que la intensidad relativa de los picos puede ser afectada por, por ejemplo, granos por encima de 30 micrones de tamaño y relaciones de aspecto no unitarios, los cuales pueden afectar el análisis de las muestras. La persona versada también se percatará de que la posición de las reflexiones puede ser afectada por la altura precisa a la cual la muestra se sitúa en el difractómetro y la calibración cero del difractómetro. La planidad de la superficie de la muestra también puede tener un pequeño efecto. De ahí que una persona versada en el arte apreciará que la información del patrón de difracción presentada aquí no es interpretada como absoluta (para más información ver Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996).

Es también declarado anteriormente que, en general, un error de medición de un ángulo de difracción en un difractograma de rayos-X en polvo es alrededor de $2\text{-theta} = 0.5^\circ$ o menos (o, más adecuadamente, alrededor de $2\text{-theta} = 0.2^\circ$ o menos) y tal grado de un error de medición debe ser tomado en cuenta cuando se considera el patrón de difracción de rayos-X en polvo en la Figura 1, y cuando se interpretan las posiciones de los picos con referencia al texto anterior y en la Tabla 1.

Con esto en mente, una persona versada en el arte apreciará que la información presentada en la Figura 7 y la Tabla 2 anterior indican que el co-cristal de maleato de AZD1152 producido por el Método 2 es la misma forma cristalina que el co-cristal de maleato de AZD1152 producido por el Método 1 (y mostrados en las Figura 1 y Tabla 1).

REIVINDICACIONES

1. Un co-cristal de maleato de AZD1152, donde AZD1152 es



5

2. Una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152 como se define en la reivindicación 1.

- 10 3. Una forma cristalina del co-cristal de maleato de AZD1152 de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho co-cristal tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con picos específicos a alrededor de 2-theta = 12.9° y 15.2° y/o 10.2°.

4. Un método de preparar un co-cristal de maleato de AZD1152 como se define en la
15 reivindicación 1, dicho método comprendiendo el paso de mezclar una solución de la forma libre de AZD1152 con ácido maleico en un solvente adecuado tal como metanol, dimetil sulfóxido (DMSO) o una mezcla de los mismos.

5. Una composición farmacéutica que comprende un co-cristal de maleato de
20 AZD1152, como se define en la reivindicación 1 en asociación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

6. Un co-cristal de maleato de AZD1152 como se define en la reivindicación 1 para
uso en terapia.

25

7. El uso de un co-cristal de maleato de AZD1152 como se define en la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad donde la inhibición de una o más aurora quinasa(s) es beneficioso.

8. El uso de un co-cristal de maleato de AZD1152 como se define en la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer.

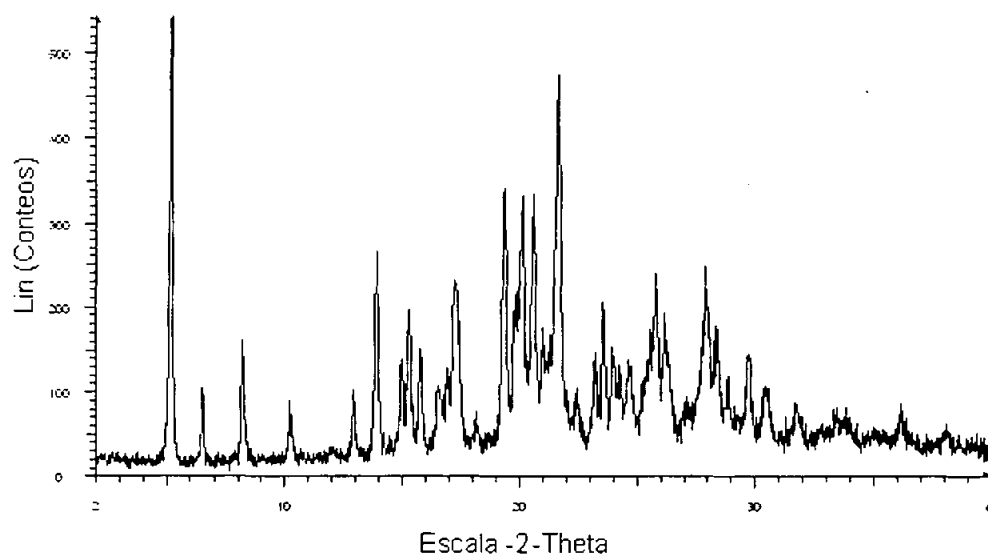
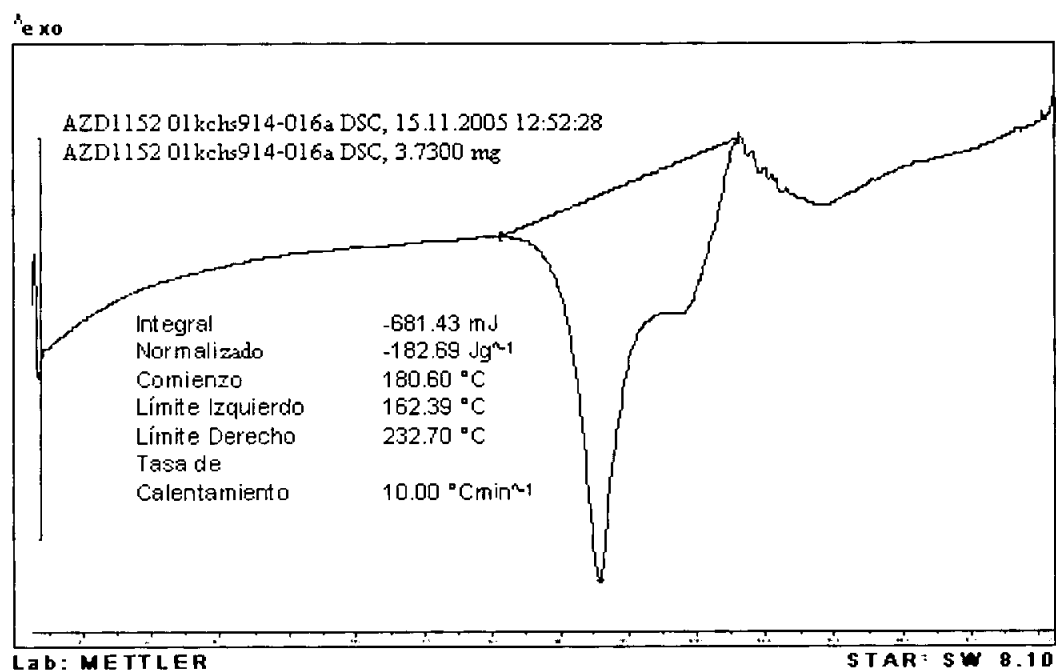
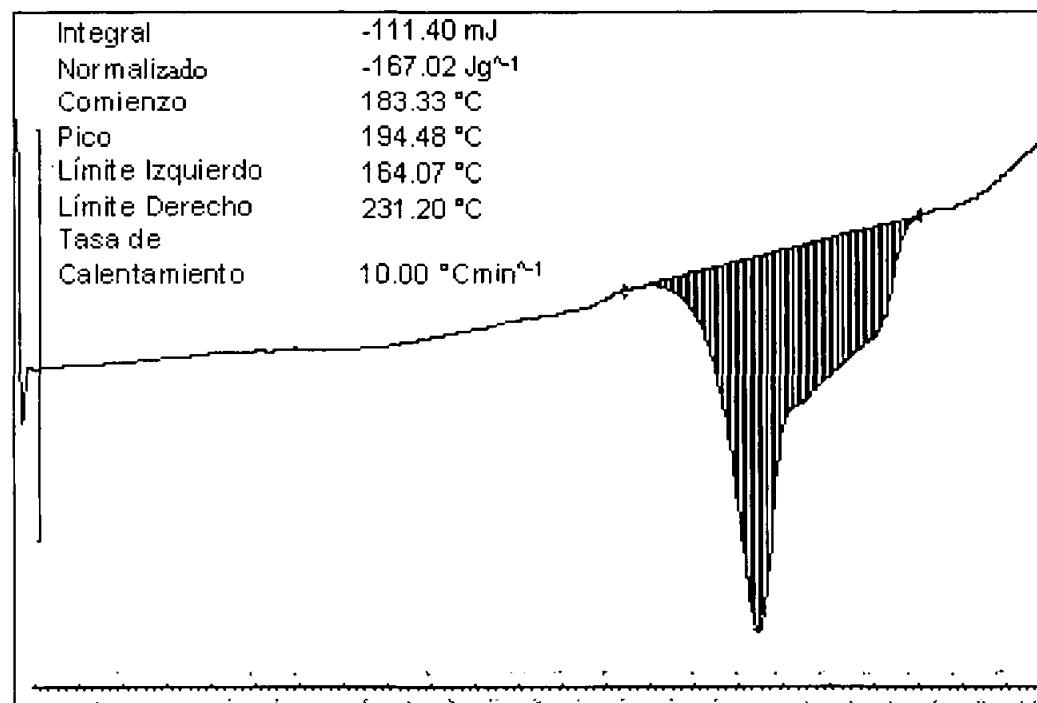


Figura 1

Figura 2

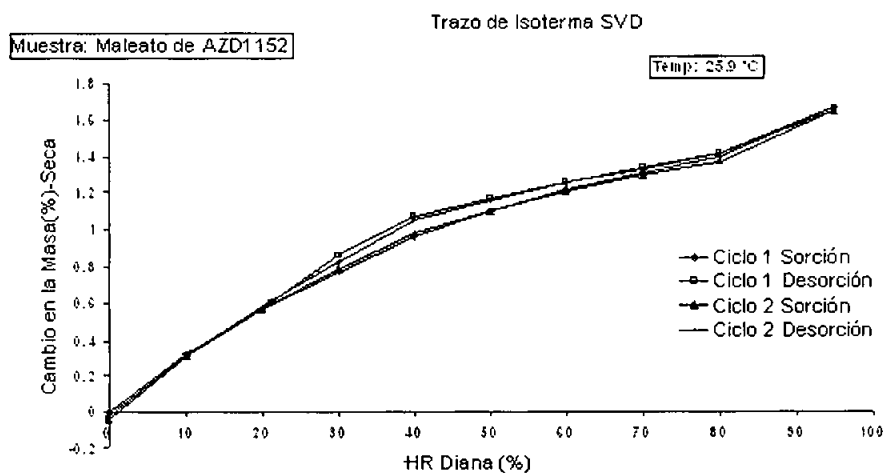
10



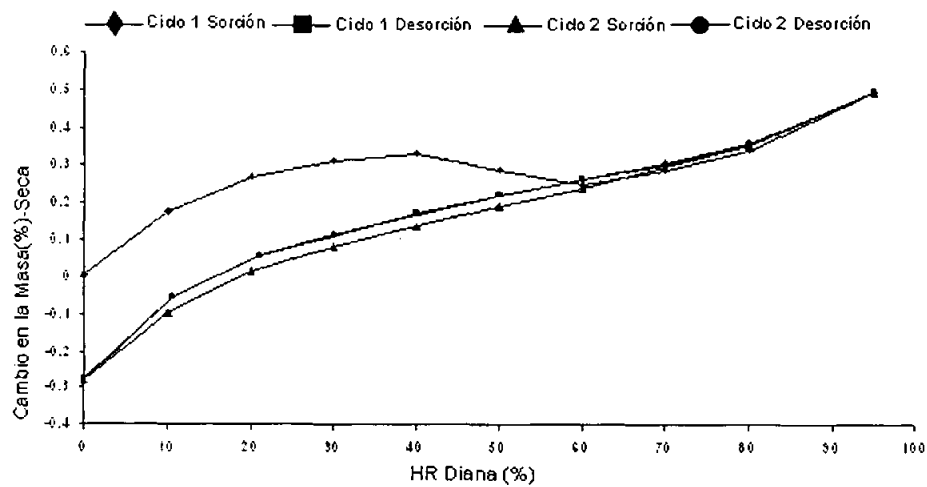
Lab: ■ ETTLER

STAR[®] SW 8.10

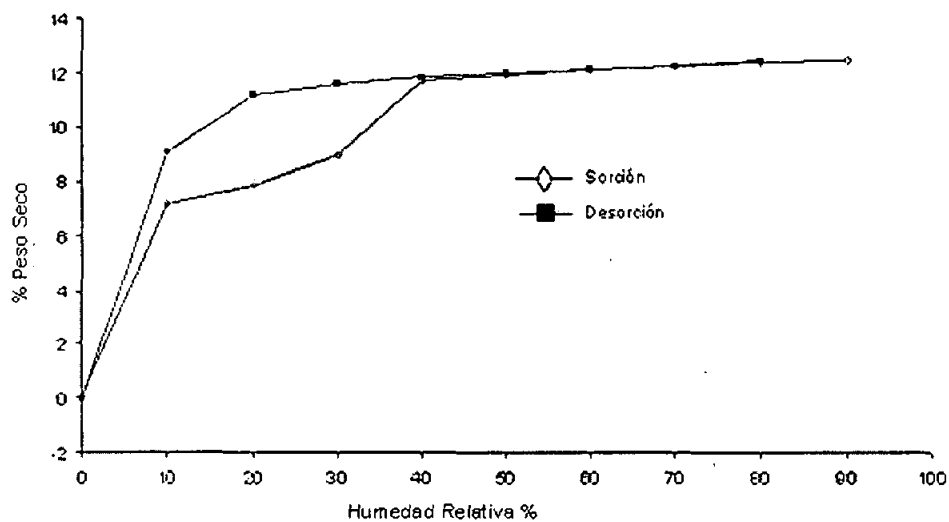
Figura 3

**Figura 4**

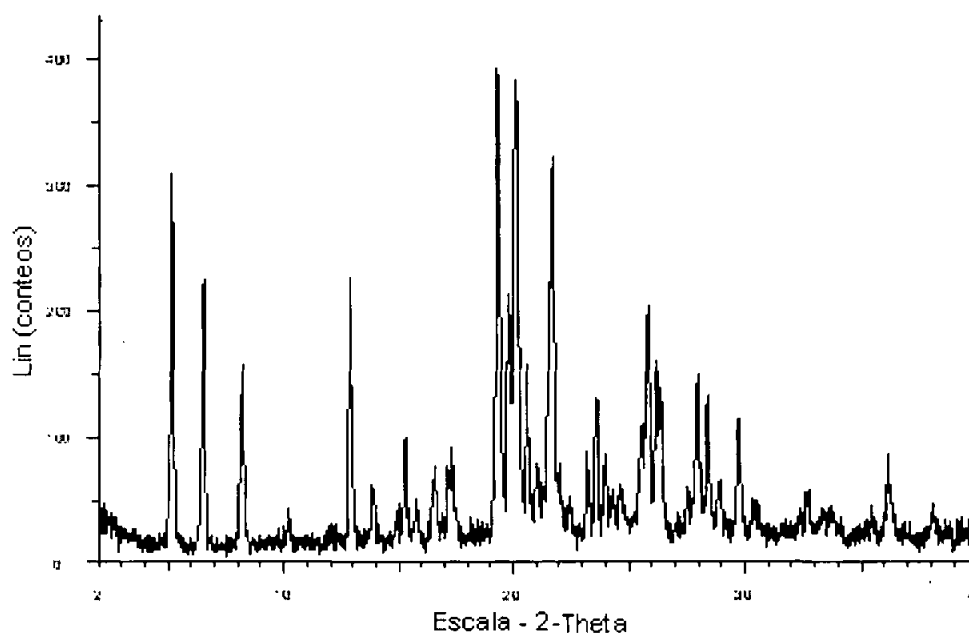
5 de 7

**Figura 5**

6 de 7

**Figura 6**

7 de 7

**Figure 7**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 102291-1 WO	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/GB2007/001771	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14 May 2007 (14.05.2007)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 16 May 2006 (16.05.2006)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant ASTRAZENECA AB			

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 *bis*.1(a).
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application
4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Date of issuance of this report 17 November 2008 (17.11.2008)
	Authorized officer Dorothee Mülhausen e-mail: pt01.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2007/001771

International filing date (day/month/year)
14.05.2007

Priority date (day/month/year)
16.05.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07D403/12 C07F9/09 A61K31/661 A61P35/00

Applicant
ASTRAZENECA AB

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

KOLLMANNSSBERGER, M

Telephone No. +49 89 2399-7364



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2007/001771

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☐ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☐ on paper
- ☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☐ contained in the international application as filed.
- ☐ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2007/001771

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-8</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-8</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-8</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

V-1. Prior art

The following document is considered relevant:

D1: WO 2004/058781 A (ASTRAZENECA AB [SE]; ASTRAZENECA UK LTD [GB];
HERON NICOLA MURDOCH [GB] 15 July 2004 (2004-07-15) cited in the
application

V-2. Novelty

D1 discloses the free base as well as a hydrochloride form of the compound AZD1152 (see example 39). Furthermore D1 discloses generically pharmaceutical salts of the disclosed compounds (see page 6 first paragraph). However, the maleate salt/co-crystal of AZD1152 is not disclosed in an individualized form. The claims are thus seen as a novel selection from D1.

V-3. Inventive step

Closest prior art is D1. Starting from D1 the applicant proposes to solve the problem of finding a form of AZD1152 having various advantages (hygroscopicity, reproducible stoichiometry etc., see page 5 of the description). The proposed solution is the maleate salt/co-crystal.

This solution is obvious for a man skilled in the art. D1 describes (see page 6 first paragraph) that various salts of the compounds described therein may be prepared, i. a. the maleate. If a particular form of a compound turns out to have disadvantageous properties it is a routine measure to look for different forms avoiding/improving these properties and D1 proposes a list of pharmaceutically acceptable salts. In this list the maleate is explicitly mentioned as one of the possible alternatives. A man skilled in the art would have arrived at the claimed solution without any inventive activity. It is furthermore noted that the claimed advantages

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2007/001771

have not even been substantiated compared to the trihydrate and the hydrochloride disclosed in D1.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- VIII-1. Claim 1 is directed at a "maleate co-crystal". Claim 2, dependent on claim 1, is directed at a "crystalline form of the maleate co-crystal". It would appear that a "co-crystal" is crystalline by definition. It is not clear whether there is any difference between claims 1 and 2 (Art. 6 PCT).
- VIII-2. The description states that the definition "co-crystal" in the claims should be read as "salt or co-crystal" (see page 5 last paragraph). This definition should be introduced in the claims since it does not appear to be generally accepted nomenclature that salts and co-crystals are the same (Art. 6 PCT).
- VIII-3. Claim 8 should be dependent on claim 7 (Rule 6.4(a) PCT).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N^o
PCT/GB2007/001771

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. C07D403/12 C07F9/09 A61K31/661 A61P35/00 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CPI														
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación) C07D C07F A61K A61P Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, CHEM ABS Data														
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES														
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N ^o												
X	WO 2004/058781 A (ASTRAZENECA AB [SE]; ASTRAZENECA UK LTD [GB]; HERON NICOLA MURDOCH [GB] 15 de Julio de 2004 (2004-07-15) citada en la solicitud página 119 - página 120; ejemplo 39 página 6, línea 1 - línea 14 -----	1-8												
☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos. ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo.														
<table border="0"> <tr> <td>* Categorías especiales de documentos citados:</td> <td>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención</td> </tr> <tr> <td>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante</td> <td>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado</td> </tr> <tr> <td>"E" documento anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior</td> <td>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia</td> </tr> <tr> <td>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)</td> <td>"G" documento que forma parte de la misma familia de patentes</td> </tr> <tr> <td>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</td> <td></td> </tr> </table>			* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención	"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado	"E" documento anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia	"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)	"G" documento que forma parte de la misma familia de patentes	"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio		"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada	
* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención													
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado													
"E" documento anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia													
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)	"G" documento que forma parte de la misma familia de patentes													
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio														
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada														
Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional 7 de Agosto de 2007		Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional 14/08/2007												
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31 70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31 70) 340-3016		Funcionario autorizado KOLLMANNBERGER, M												

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/GB2007/001771

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004058781 A	15-07-2004	AU 2003290313 A1	22-07-2004
		BR 0317717 A	22-11-2005
		CA 2511613 A1	15-07-2004
		IS 7948 A	20-07-2005
		JP 2006512418 T	13-04-2006
		KR 20050088333 A	05-09-2005
		MX PA05006918 A	18-08-2005
		US 2006116357 A1	01-06-2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2007/001771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D403/12 C07F9/09 A61K31/661 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D C07F A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/058781 A (ASTRAZENECA AB [SE]; ASTRAZENECA UK LTD [GB]; HERON NICOLA MURDOCH [GB] 15 July 2004 (2004-07-15) cited in the application page 119 - page 120; example 39 page 6, line 1 - line 14 -----	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 August 2007

Date of mailing of the international search report

14/08/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

KOLLMANNBERGER, M

128

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/001771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD 2004058781 A	15-07-2004	AU 2003290313 A1	22-07-2004
		BR 0317717 A	22-11-2005
		CA 2511613 A1	15-07-2004
		IS 7948 A	20-07-2005
		JP 2006512418 T	13-04-2006
		KR 20050088333 A	05-09-2005
		MX PA05006918 A	18-08-2005
		US 2006116357 A1	01-06-2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129814- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:15:23 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- ◆ Descripción de la invención [✓]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [✓]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia Marlen Nava Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia