

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 929**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2011 PCT/CN2011/074637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12000356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11800101 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2590966**

54 Título: **Compuestos de quinazolina**

30 Prioridad:

30.06.2010 WO PCT/CN2010/074792

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

10.03.2017

73 Titular/es:

**HUTCHISON MEDIPHARMA LIMITED (100.0%)
Building 4, 720 Cailun Road Hi-tech Park
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, WEIHAN;
SU, WEI-GUO;
YANG, HAIBIN;
CUI, YUMIN;
REN, YONGXIN y
YAN, XIAOQIANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 604 929 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de quinazolina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo farmacéutico y, en particular, a determinados compuestos de quinazolina, una composición que contiene dichos compuestos y a su uso. Estos compuestos de quinazolina pueden inhibir de forma eficaz la sobreexpresión y/o sobreactividad del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Antecedentes técnicos

10 La unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) puede activar la actividad de tirosina quinasa y, de este modo, puede desencadenar reacciones que conducen a la proliferación celular. La sobreexpresión y/o sobreactividad de EGFR puede tener como resultado una división celular descontrolada que puede ser una predisposición para el cáncer. Los compuestos que pueden inhibir la sobreexpresión y la sobreactividad de EGFR son por tanto posibles candidatos para el tratamiento del cáncer. Dichos compuestos se divulgan en el documento CN 101619034 y el documento WO 201002845.

Sumario de la invención

15 Se proporciona el compuesto (3aR,6aR)-N-(4-(3-etilnilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidropirrol [3,4-b]bipirrol-5-(1H)-carboxamida; o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y el compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descritos en la presente memoria.

20 También se proporciona el compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso del tratamiento de cáncer. En una realización preferida, el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de faringe, cáncer epidermoide y cáncer de páncreas.

25 Además se proporciona un procedimiento para la inhibición *in vivo* de la sobreexpresión y/o sobreactividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico que comprende poner en contacto el receptor del factor de crecimiento epidérmico con una cantidad eficaz del compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción detallada de la invención

30 Según se usa en la presente memoria descriptiva, se pretende generalmente que las siguientes palabras, frases y símbolos tengan los significados que se explican a continuación, excepto hasta el alcance en el que el contexto en el que se usan indique lo contrario. Las siguientes abreviaturas y términos tienen en todo caso los significados indicados.

35 Los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitarse a, isómeros ópticos, racematos y otras de sus mezclas. En esas situaciones, los enantiómeros o diastereómeros individuales, es decir, las formas ópticamente activas, pueden obtenerse por medio de síntesis asimétrica o por medio de resolución de los racematos o mezclas de diastereómeros. La resolución de los racematos o mezclas de diastereómeros se puede lograr, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales tales como cristalización en presencia del agente de resolución, o cromatografía, usando, por ejemplo una columna de cromatografía de líquidos de alta presión quiral (HPLC).

40 Cuando los componentes descritos en la presente memoria existen en diversas formas tautómeras, se pretende que el término "compuesto" incluya todas las formas tautoméricas del compuesto. Dichos compuestos también incluyen formas de cristal que incluyen polimorfos y clatratos. Similarmente, se pretende que el término "sal" incluya todos los isómeros, racematos, otras mezclas, formas Z- y E-, formas tautoméricas y formas de cristal de la sal del compuesto.

45 "Sales farmacéuticamente aceptables" incluyen, pero sin limitarse a sales con ácidos inorgánicos, tales como hidrocloreto, fosfato, difosfato, hidrobromato, sulfato, sulfinato, nitrato, y sales similares; así como también sales con un ácido orgánico, tal como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, 2-hidroxiethylsulfonato, benzoato, salicilato, estearato y alcanato tal como acetato, HOOC-(CH₂)_n-COOH en la que n es 0-4, y sales similares. Similarmente, los cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio.

50 Además, si se obtiene un compuesto descrito en la presente memoria como sal de adición de ácido, la fase libre se puede obtener por medio de basificación de una solución de la sal de ácido. Por el contrario, si el producto es una base libre, una sal de adición, en particular una sal de adición farmacéuticamente aceptable, se puede producir por medio de disolución de la base libre en un disolvente apropiado y tratar la solución con un ácido, de acuerdo con procedimientos convencionales para preparar sales de adición de ácido a partir de compuestos de base. Los expertos en la técnica reconocerán diversas metodologías sintéticas que se pueden usar para preparar sales de

adición farmacéuticamente aceptables y no tóxicas.

Un “solvato”, tal como un “hidrato”, se forma por medio de la interacción de un disolvente con un compuesto. Se pretende que el término “compuesto” incluya solvatos, incluyendo hidratos, de compuestos. Similarmente, “sales” incluyen solvatos, tales como hidratos de sales. Los solvatos apropiados son solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, incluyendo monohidratos y hemi-hidratos.

Un “quelato” se forma por medio de la coordinación de un compuesto a un ión metálico en dos puntos (o más). Se pretende que el término “compuesto” incluya quelatos de compuestos. Similarmente, las “sales” incluyen quelatos de sales.

Un “complejo no covalente” se forma por medio de interacción de un compuesto y otra molécula en la que no se forma un enlace covalente entre el compuesto y la molécula. Por ejemplo, la formación de complejos puede ocurrir a través de interacciones de van der Waals, enlace de hidrógeno e interacciones electrostáticas (también denominadas enlace iónico). Dichos complejos no covalentes se incluyen en el término “compuesto”.

La expresión “agente activo” se usa para indicar una sustancia química que tiene actividad biológica. En algunas realizaciones, un “agente activo” es una sustancia química que tiene utilidad farmacéutica.

El “tratamiento” o “alivio” se refiere a la administración del compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, o tiene un síntoma de enfermedad o trastorno, o tiene predisposición a una enfermedad o trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, disipar, modificar, remediar, mejorar o afectar a la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno, o la predisposición a la enfermedad o trastorno. La enfermedad o trastorno puede ser, por ejemplo, cáncer.

El término “inhibición” indica una disminución en la actividad de la línea base de una actividad biológica o procedimiento. “Inhibición de la sobreexpresión y/o sobreactividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico” se refiere a una disminución de la expresión y/o actividad de EGFR como respuesta directa o indirecta a la presencia de al menos un compuesto y/o al menos un de sus sales farmacéuticamente aceptables descritas en la presente memoria, con respecto a la actividad de EGFR en ausencia de al menos un compuesto y/o al menos una de sus sales farmacéuticamente aceptable. La disminución de la actividad puede deberse a la interacción directa de al menos un compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, con uno o más de otros factores que, a su vez, afectan a la actividad de EGFR. Por ejemplo, la presencia de al menos un compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, puede disminuir la actividad de EGFR por medio de unión directa al EGFR, provocando (directa o indirectamente) otro factor para disminuir la actividad de EGFR, o mediante disminución (directa o indirecta) de la cantidad de EGFR presente en la célula u organismo.

La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad del compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descrito en la presente memoria, eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso de cáncer, la cantidad eficaz puede provocar cualquier cambio observable o medible en un sujeto como se describe en la definición de “tratamiento” o “alivio” anterior. Por ejemplo, la cantidad eficaz puede reducir el número de células tumorales o cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración celular en los órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la dispersión del tumor en los tejidos blandos o huesos; inhibir y detener las metástasis tumorales; inhibir o detener la proliferación tumoral; disipar en cierto modo uno o más síntomas asociados al cáncer, reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de dichos efectos. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para disminuir los síntomas de una enfermedad en respuesta a la inhibición de la sobreexpresión y/o sobreactividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Para la terapia de cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse por medio de evaluación de la duración de la supervivencia, tiempo de terapia de avance de la enfermedad (TTP), tasas de respuesta (RR), duración de la respuesta y/o calidad de vida. Las cantidades eficaces pueden variar, tal y como se reconoce por parte de los expertos en la técnica, dependiendo de la ruta de administración, uso de excipientes, y co-utilización de otros agentes.

La expresión “cantidad eficaz” también puede hacer referencia a la cantidad del compuesto de la invención y/o al menos una de sus sales farmacéuticamente aceptable descritas en la presente memoria eficaz para inhibir la sobreexpresión y/o sobreactividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se explican a continuación.

Se proporciona el compuesto (3aR, 6aR)-N-(4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidropirrol [3,4-b]pirrol-5(1H)-carboxamida; y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto de quinazolina de la invención y/o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, descritas en la presente memoria, se puede sintetizar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos detallados se ilustran en la sección de Ejemplos de

la presente solicitud.

5 Las transformación de química sintética útil en la síntesis de compuestos de quinazolina deseables también se describe, por ejemplo, en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1005) y sus ediciones posteriores.

El compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, se pueden purificar por medio de cromatografía en columna, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cristalización u otros procedimientos apropiados.

10 El compuesto de quinazolina de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, pueden interaccionar con EGFR quinasa y/o inhibir la actividad de EGFR.

También se proporciona una composición que comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y el compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable descrita en la presente memoria.

15 La composición que comprende el compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, se puede administrar de diversas formas, tales como oral, parenteral, pulverización para inhalación o por medio de un recipiente implantado. El término "parenteral", tal y como se usa en la presente memoria, incluye técnicas subcutáneas, intracutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intraarteriales, intrasinoviales, intrasternales, intratecales, intralesionales e inyección intracraneal o de infusión.

20 Una composición oral puede ser una forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, emulsiones o suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. Los vehículos comúnmente usados para los comprimidos incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se pueden añadir comúnmente a los comprimidos. Cuando se administran suspensiones acuosas o emulsiones por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con los agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

25 Se puede formular una composición inyectable estéril (por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosa) de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes humectantes o de dispersión apropiados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo, en forma de solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes farmacéuticamente aceptables que se pueden emplear están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónico. Además, los aceites fijos y estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o di-glicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de diglicérido son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, tal como en sus versiones polioxietoxiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un dispersante o diluyente de alcohol de cadena larga, o carboximetil celulosa o agentes de dispersión similares.

30 Se puede preparar una composición para inhalación de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones salinas, empleando alcohol bencílico u otros conservantes apropiados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión conocidos en la técnica.

35 Se puede formular una composición tópica en forma de aceite, crema, loción, pomada y similares. Los vehículos apropiados para la composición incluyen aceites vegetales o minerales, petrolato blanco (parafina blanda de color blanco), aceites o grasas de cadena ramificada, grasas animales y alcoholes de peso molecular elevado (mayor de C12). En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es uno en el que el principio activo es soluble. También pueden incluirse emulsionantes, estabilizantes, humectantes y antioxidantes, así como agentes que confieren color o aroma, si se desea. Adicionalmente, en estas formulaciones tópicas pueden emplearse mejoradores de penetración transdérmica. Pueden encontrarse ejemplos de dichos mejoradores en las patentes de Estados Unidos 3.989.816 y 4.444.762.

40 A partir de una mezcla de aceite mineral, cera de abeja autoemulsionante y agua, se pueden formular cremas en las que el principio activo se mezcla y se disuelve en una pequeña cantidad de aceite, tal como aceite de almendra. Un ejemplo de dicha crema es uno que incluye aproximadamente 40 partes de agua, aproximadamente 20 partes de cera de abeja, aproximadamente 40 partes de aceite y aproximadamente 1 parte de aceite de almendra. Las pomadas se pueden formular mezclando una solución del principio activo en un aceite vegetal, tal como aceite de almendra, con parafina suave caliente y dejando enfriar la mezcla. Un ejemplo de dicha pomada es uno que incluye aproximadamente 30 % en peso de almendra y aproximadamente 70 % en peso de parafina blanda de color blanco.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere al que es compatible con los principios activos de la composición (y en algunas realizaciones, capaz de estabilizar los principios activos) y no perjudicial para el sujeto objeto de tratamiento. Por ejemplo, los agentes solubilizantes, tales como ciclodextrinas (que forman complejos específicos más solubles con al menos un compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable descrita en la presente memoria) se puede utilizar como excipientes farmacéuticos para la administración de los principios activos. Los ejemplos de otros vehículos incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, lauril sulfato de sodio y Amarillo D&C N°. 10. Los excipientes hidrófilos tales como polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo, albúmina y sus derivados), también son ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Se pueden usar ensayos *in vitro* apropiados para evaluar de forma preliminar la eficacia del compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable descrita en la presente memoria, en la inhibición de la actividad de EGFR. El compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, se pueden examinar de forma adicional en cuanto a su eficacia en el tratamiento de cáncer por medio de ensayos *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos descritos en la presente memoria, y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden administrar a un animal (por ejemplo, un modelo de ratón) que tiene cáncer y se pueden evaluar sus efectos terapéuticos. Basándose en los resultados, también se puede determinar el intervalo de dosificación apropiado y la ruta de administración para los animales, tales como humanos.

El compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descritos en la presente memoria, se pueden usar para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico, por ejemplo, en sujetos con cáncer. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a un trastorno celular caracterizado por una proliferación celular descontrolada o no regulada, menor diferenciación celular, capacidad inapropiada de invadir el tejido circundante, y/o capacidad para establecer nueva proliferación en sitios ectópicos. El término "cáncer" incluye, pero no de forma limitativa, tumores sólidos y tumores de tipo sanguíneo. El término "cáncer" engloba enfermedades de la piel, tejidos, órganos, hueso, cartílago, sangre y vasos. El término "cáncer" además engloba tipos de cáncer primarios y en fase de metástasis.

Los ejemplos no limitantes de los tumores sólidos incluyen cáncer de páncreas; cáncer de vejiga; cáncer colorrectal; cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama con metástasis; cáncer de próstata, incluyendo cáncer de próstata dependiente de andrógenos e independiente de andrógenos; cáncer renal, incluyendo, por ejemplo carcinoma de células renales con metástasis; cáncer hepatocelular; cáncer de pulmón, incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma bronquioalveolar (BAC) y adenocarcinoma de pulmón; cáncer de ovarios, incluyendo, por ejemplo, cáncer peritoneal primario o epitelial progresivo; cáncer del cuello uterino; cáncer gástrico; cáncer de esófago; cáncer de cabeza y cuello; incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello; cáncer de piel, incluyendo, por ejemplo, melanoma maligno; cáncer neuroendocrino, incluyendo tumores neuroendocrinos con metástasis; tumores cerebrales incluyendo, por ejemplo, glioma, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma de adultos multiforme y astrocitoma anaplásico en adultos; cáncer de huesos; sarcoma de tejido blanco y carcinoma de tiroides.

Los ejemplos no limitantes de cáncer hematológico incluyen leucemia mieloide aguda (AML); leucemia no mielógena crónica (CML), incluyendo CML acelerada y CML en fase de blasto (CML-BP), leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL); enfermedad de Hodgkin (HD); linfoma no Hodgkin (NHL), incluyendo linfoma folicular y linfoma de células de la corteza cerebral; linfoma de células-B; linfoma de células-T; mieloma múltiple (MM); macroglobulemia de Waldenstrom; síndromes mielodisplásicos (MDS), incluyendo anemia resistente a tratamiento (RA), anemia resistente a tratamiento con siderblastos con anillo (RARS), (anemia resistente a tratamiento con blastos en exceso (RAEB) y RAEB en transformación (RAEB-T); y síndromes mielo-proliferativos.

En algunas realizaciones, los ejemplos de cáncer a tratar incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer de hueso y leucemia. En algunas realizaciones, los ejemplos de cáncer a tratar se seleccionan entre cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y de cuello, cáncer colorrectal, cáncer de faringe, cáncer epidermoide y cáncer de páncreas.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable descrita en la presente memoria, se administran junto con una cantidad eficaz de otro agente terapéutico que es diferente de dicho compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico es un agente anti-cáncer. En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico es uno que normalmente se administra a pacientes con la enfermedad o trastorno objeto de tratamiento. El compuesto de la invención y/o al menos una las sales farmacéuticamente aceptables descritas en la presente memoria, se pueden administrar con el otro agente terapéutico en una forma de dosificación individual o una forma de dosificación por separado. Cuando se administra como forma de dosificación por separado, el otro agente terapéutico se puede administrar antes de, al mismo tiempo que, o tras la administración del compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria, se administran junto con un agente anti-cáncer. Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "agente anti-cáncer" se refiere a cualquier agente que se administre a un sujeto con

cáncer con fines de tratamiento de cáncer. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-cáncer incluyen: radioterapia; inmunoterapia; agentes quimioterapéuticos que provocan daño sobre el ADN; y agentes quimioterapéuticos que perturban la replicación celular.

- 5 Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos que provocan daño sobre el ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecán, topotecán, canfotecina y sus análogos o metabolitos, y doxorubicina); inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etoposido, teniposido y daunorubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercaladores de ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercaladores de ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y miméticos de nucleosido (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxixurea).

- 10 Los agentes quimioterapéuticos que perturban la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida y análogos relacionados (por ejemplo, CC-5013 y CC-4047); inhibidores de tirosina quinasa de proteína (por ejemplo, mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores de proteasoma (por ejemplo, bortezomib); inhibidores de NF-kappa B, incluyendo inhibidores de I kappa B quinasa; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en tipos de cáncer y, de este modo, producen sub-regulación de la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o cuya sobreexpresión, sobreexpresión o sobreexpresión se conoce en distintos tipos de cáncer, cuya inhibición sub-regula la replicación celular.

- 15 También se proporciona un procedimiento de inhibición *in vitro* de la sobreexpresión y/o sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico que comprende poner en contacto un factor de receptor epidérmico con una cantidad eficaz del compuesto de la invención y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo descritas en la presente memoria.

Ejemplos

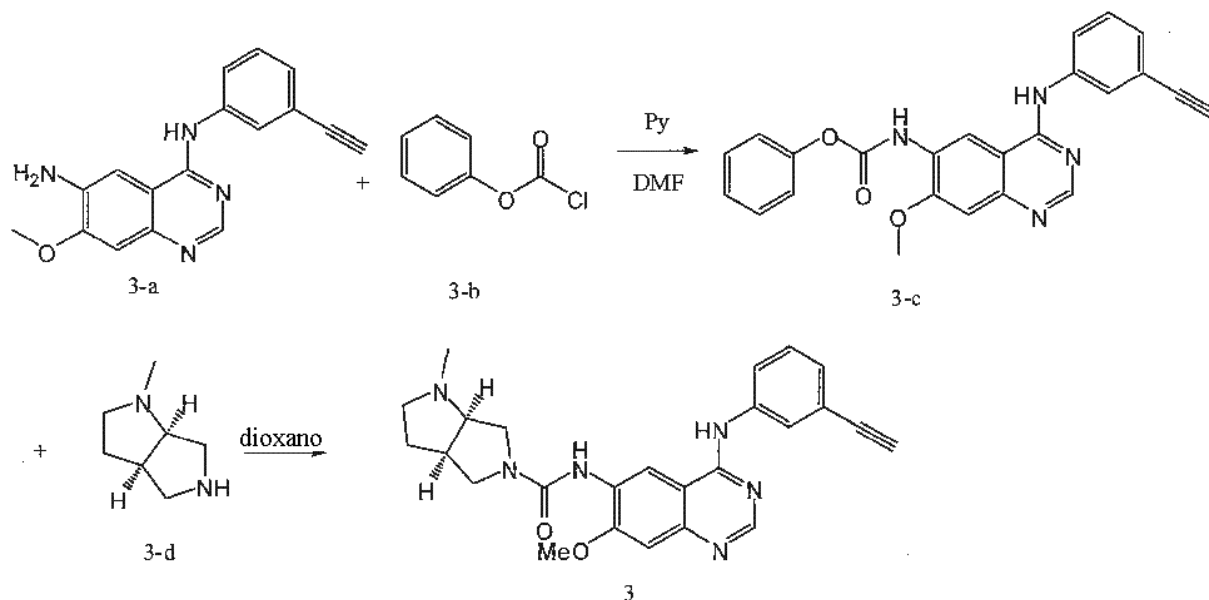
- 25 Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la divulgación sin limitar no obstante su alcance.

En los siguientes ejemplos, se usan las abreviaturas siguientes:

CMC-Na	Carboximetil celulosa de sodio
DELFI	Inmunoensayo Fluorescente de Lantánido con Disociación Mejorada
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EtOAc	Acetato de etilo
FBS	Suero bovino fetal
h	Hora(s)
ml	Mililitro(s)
min	Minuto(s)
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro
Py	Piridina
THF	Tetrahidrofurano
Tris-Cl	Hidrocloreto de hidroximetilaminometano

Ejemplo 1:

(3aR, 6aR)-N-(4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidropirrol [3,4-b]pirrol 5 (1H)-carboxamida



5 A una solución del Compuesto **3-a** (40 g, 0,138 mol, preparado de acuerdo con los procedimientos divulgados en el documento WO 2010002845), piridina (40 ml, 0,495 mol) y DMF (anhidro, 22 ml) en THF anhidro (500 ml), se añadió carbonocloridato de fenilo **3-b** (22 ml, 0,175 mol) gota a gota a -10 °C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Los precipitados se filtraron y después se suspendieron en una solución de NaHCO₃ saturada (500 ml). Se filtró el sólido, se lavó con H₂O y EtOAc, y se secó a vacío para proporcionar un compuesto **3-c** (46 g).
 10 Se agitó una mezcla del compuesto **3-c** (1 g, 2,44 mol) y compuesto **3-d** (369 mg, 2,92 mmol) en dioxano (30 ml) a 70 °C durante 5 horas, y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Los precipitados se filtraron, se lavaron con EtOAc, y se secaron a vacío para proporcionar el compuesto 3 (0,8 g). MS (*m/e*): 443,4 (M+1)⁺.

Ensayos Farmacológicos*Ensayo de inhibición-activación de EGFR*

15 Siembra y subalimentación celular: se sembraron células A431 (carcinoma epidermoide humano) diluidas en FBS al 10 % que contenía DMEM a $1,3 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Después, se sustituye el medio de cultivo celular por DMEM libre de suero de 90 µl/pocillo. Se incuban las placas durante la noche para inanición.

20 Tratamiento y dilución de compuesto: se diluye el compuesto de ensayo en series de 3 veces en medio libre de FBS que contenía DMSO al 5 %. Se añaden 10 µl/pocillo del compuesto diluido a las células, y se añaden 10 µl/pocillo de DMSO al 5 % sin el compuesto de ensayo en los pocillos de control. Se lleva a cabo el estudio de duplicación para cada punto de ensayo. Después, se incuban las placas a 37 °C durante 60 minutos en un incubador con CO₂ al 5 %. Se añaden 10 µl/pocillo de EGF de 200 ng/ml (Biosource, PHG0064) y se incuban las placas a 37 °C durante 45 minutos en el incubador de CO₂ al 5 %.

25 Preparación de lisato: se retira el medio, y se añaden 100 µl/pocillo de tampón de lisis celular a pH 8,0 Tris-Cl 50 mM (que contiene NaCl 0,5 M, EDTA 0,2 mM, Tritón X-100 al 0,1 %, aprotinina de 1 µg/ml, leupeptina de 0,75 µg/ml, pepstatina de 1 µg/ml, DTT 1 mM, vanadato de sodio 500 µM y PMSF 1 mM) a cada pocillo para provocar la lisis celular. Se añaden inhibidores de proteasa justo antes de ser usados. El lisato celular se congela a -80 °C durante la noche.

30 Revestimiento de placa y bloqueo: se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo anti-EGFR 0,5 µg/ml (Perkin Elmer, AF231) diluido en PBS a una placa DELFIA de 96 pocillos (Perkin Elmer, AAAND-0001) y se incuban a 25 °C durante la noche con agitación suave. Se descartó la solución. La placa se lavó 3 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado DELFIA (tampón de PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %). Se añadieron 200 µl/pocillo (PBS que contenía 0,137 M de NaCl, 0,0027 M de KCl, 0,01 M de Na₂PO₄ · 12 H₂O, 0,0015 M de KH₂PO₄, pH 7,4 y BSA al 1 %) a cada pocillo y se incubó la placa a 25 °C durante 2 horas con agitación suave.

35 Unión: se descarta el tampón de bloqueo y se lava la placa con 200 µl/pocillo de tampón de lavado DELFIA 3 veces. Después se añaden 80 µl/pocillo del diluyente de muestra (Tris-Cl 20 mM/pH 7,3, NaCl 150 mM, 0,1 % de BSA y

0,05 % de Tween-20) y 20 µl/pocillo de lisato celular a cada pocillo. Se incubó la placa a 25 °C durante 1 h adicional con agitación suave.

5 Detección: se lava la placa de nuevo con 200 µl/pocillo de tampón de lavado DELFIA durante 3 veces. Se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo Eu-PT66 de 0,5 µl/ml (Perkin Elmer, AD0040) diluido en tampón de ensayo DELFIA (Perkin Elmer, 1244-106) y se incubó la placa a 25 °C durante 1 h con agitación suave. Tras el lavado con 200 µg/pocillo de tampón de lavado DELFIA 3 veces, se añaden 100 µl/pocillo de tampón mejorador DELFIA (Perkin Elmer, 4001-0010). Se incubó la placa a 25 °C durante 30 minutos con agitación suave.

Lectura: se mide la señal de fluorescencia a 340 nm de excitación y 620 nm de emisión en un Victor³ (Perkin Elmer).

Se calculan las tasas de inhibición como se muestra a continuación:

$$10 \quad \text{Inhibición (\%)} = 100 - \frac{[\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{Tratado}} - [\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{No tratado}}}{[\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{EGF}} - [\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{No tratado}}} \times 100$$

En la que,

15 $[\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{Tratado}}$ es la lectura de los pocillos tratados con el compuesto de ensayo tras estimulación con EGF
 $[\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{No Tratado}}$ es la lectura de los pocillos sin el tratamiento del compuesto ni estimulación con EGF, que se usa como señal de fondo celular
 $[\text{Lectura de Fluorescencia}]_{\text{EGF}}$ es la lectura de los pocillos con estimulación con EGF, pero sin tratamiento con el compuesto, que se usa como señal máxima

El IC₅₀ se calcula usando un software XL-Fit 2,0.

Los valores de IC₅₀ del compuesto **3** son 0,006 µM.

20 *Ensayos anti-tumorales in vivo en modelos de xenoinjerto humano*

1. Materiales y procedimientos:

25 Estirpes celulares de tumor en humanos: se adquirieron estirpes celulares Fadu (carcinoma de faringe, cuello y cabeza humanos, HTB-43), HCC827 (cáncer de pulmón humano de células no pequeñas, NSCLC; CRL-2868), A431 (carcinoma epidérmico humano, CRL-2592) en ATCC; se sometieron a proliferación células Fadu, HTC827 y A431 en EMEM, RPMI 1640 y medio DMEM más FBS al 10 %, respectivamente. Estas células se incubaron en un incubador con humidificador a 37 °C bajo CO₂ al 5 %.

30 Animales: se adquirieron ratones atómicos (6-8 semanas) en laboratorio de animales Shangai SLAC CO. LTD. Los animales se alojaron en un entorno SPF, 4 animales/jaula en condiciones convencionales (12:12 h luz/oscuridad, 40-50 % de humedad relativa a 20-25 °C) y se les proporcionó acceso libre a dieta esterilizada con radiación de Co⁶⁰ y agua estéril.

Agentes: Se formuló el compuesto de ensayo en CMC-Na al 0,5 % estéril en diferentes concentraciones (0,05-1,0 mg/ml) y después se almacenó a 4 °C.

35 Implante subcutáneo de células tumorales y estudio de eficacia anti-tumoral: se incubaron las células tumorales a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 % hasta que alcanzaron aproximadamente un 80 % de confluencia. Se desligaron las células con Tripsina-EDTA al 0,05 %, se centrifugaron a 800 rpm, y se suspendieron en medio libre de suero. Se ajustó la concentración para el implante en ratones atómicos. Se sometieron los ratones atómicos a tratamiento sanitario durante varios días antes del implante, y se inyectaron subcutáneamente 3x10⁶ células FaDu o A431 en 0,1 ml de medio, o 5x10⁶ células HCC827 en 0,2 ml de medio en el flanco lateral derecho de los ratones atómicos.

40 En una a tres semanas tras el inóculo, cuando el volumen medio tumoral hubo alcanzado 100-300 mm³, los animales se sometieron a aleatorización y se dividieron en grupos tratados con compuesto y con vehículo. Se administró oralmente cualquier vehículo, CMC-Na al 0,5 % o el compuesto de ensayo a los ratones, en diferentes niveles de dosis una vez al día. El volumen de dosificación fue de 10 ml/kg de peso corporal (régimen de dosificación se muestra en la Tabla 1 y en la Tabla 2). Se midió el volumen tumoral 2-3 veces por semana por medio de un calibre para longitud y anchura, y se calculó usando la fórmula: Volumen tumoral (TV, mm³) = anchura² x altura/2. Se observaron el peso corporal y el comportamiento de los animales durante el experimento. Se calculó la inhibición de la proliferación tumoral como se muestra a continuación: TGI (%) = 100 - (T-T₀)/(C-C₀)x100 %, en la que T representa el volumen medio tumoral de un grupo tratado en un día específico durante el experimento, T₀

45

representa el volumen medio tumoral del mismo grupo tratado en el primer día del tratamiento, C representa el volumen medio tumoral de un grupo de control en el día específico durante el experimento, y C_0 representa el volumen medio tumoral del mismo grupo de control el primer día del tratamiento.

Tabla 1. Régimen de dosificación del compuesto de ensayo en xenoinjertos Fadu y A431

Grupo	Regímenes de Dosificación	Número de animales (n)
Vehículo	CMC-Na al 0,5 %, p.o. qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 2 mg/kg	2 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 5 mg/kg	5 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 10 mg/kg	10 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8

5

Tabla 2. Régimen de dosificación del compuesto de ensayo en xenoinjertos HCC827

Grupo	Regímenes de Dosificación	Número de animales (n)
Vehículo	CMC-Na al 0,5 %, p.o. qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 0,5 mg/kg	0,5 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 1 mg/kg	1 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 2 mg/kg	2 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8
Compuesto de ensayo, 5 mg/kg	5 mg/kg, p.o., qd x 21 días	8

2. Análisis estadístico:

Se expresaron los datos de volumen tumoral como Media \pm Desviación Típica. Se usó ANOVA de una vía para las comparaciones múltiples y ensayo de t de Student para la comparación con el vehículo de control. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas a $P < 0,05$.

10

3. Resultados:

15

El compuesto de ensayo mostró una inhibición tumoral significativa en los tres modelos tumorales de forma dependiente de la dosis. Además, ninguno de los ratones tratados con el compuesto de ensayo exhibió una pérdida de peso significativa durante los experimentos.

Los valores de TGI (%) producidos por medio del compuesto de ensayo representativo, en el Ejemplo 1 se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 3. % de TGI del compuesto 3 en modelos de xenoinjerto humano subcutáneo

	HCC827	FaDu	A431
0,5 mpk	59,2	-	-
1 mpk	114,7	-	-
2 mpk	127,8	46,1	21,3
5 mpk	140,8	66,9	62,8
10 mpk	-	95,2	85,3

20 Ensayo hERG

1. Cultivo celular

Se usó una estirpe celular CHO sometida a transfección con ADNc hERG y que expresaba canales de hERG para el estudio. Se cultivaron las células en medio que contenía:

25

- Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM/F12)
- 10 % (v/v) de Suero Bovino Fetal inactivado térmicamente (FBS)
- 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina
- 500 μ g/ml de reactivo de Geneticin® (G418)

Antes del ensayo, se recolectaron las células usando un Accumax (Innovative Cell Technologies).

2. Soluciones

30

Para los registros electrofisiológicos se usaron las siguientes soluciones

Tabla 4. Composición de las soluciones interna y externa usadas en los estudios de fijación con parche hERG

Reactivo	Solución Externa (mM)	Solución Interna (mM)
CaCl ₂	1,8	-
MgCl ₂	1,0	1
KCl	4	130
NaCl	137	-
Glucosa	10	-
HEPES	10	10
EGTA	-	5
ATP	-	5
pH	7,4 (ajustado con NaOH), osmolaridad ≈ 280 mOsm	7,25 (ajustado con KOH), osmolaridad ≈ 280 mOsm

3. Sistema de Registro

- 5 Se llevaron a cabo registros de células completas usando un EPC10 USB (HEKA). Se fijaron las células con una tensión con un potencial de sujeción de -80 mV. Se activó la corriente hERG por medio de despolarización a + 20 mV durante 2 segundos, después de lo cual se invirtió la corriente hasta -50 mV durante 2 segundos para retirar la inactivación y observar la corriente de cola de desactivación. La primera etapa a -50 mV se usó como línea base para medir la amplitud de pico de la corriente de cola.

4. Entrega de compuesto y diluciones

- 10 Se preparó el compuesto como reserva de DMSO 10 mM en un vial de vidrio. Se mezcló intensamente la solución de reserva durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para el ensayo, se diluyó el compuesto en un vial de vidrio usando la solución; se preparó la dilución durante no más de 30 minutos antes de uso. Estuvieron presentes cantidades iguales de DMSO (0,1 %) en la dilución final.

5. Procedimientos de electrofisiología

- 15 Tras lograr la configuración de células completas, se inspeccionaron las células durante 90 segundos para evaluar la estabilidad y se lavó con una solución externa durante 66 segundos. Después se aplicó el protocolo de tensión descrito anteriormente a las células cada 20 segundos durante todo el procedimiento completo. Únicamente se permitió que las células estables con registro de parámetros por encima del valor umbral entraran en el procedimiento de adición de fármaco.
- 20 Se aplicó una solución externa que contenía un 0,1 % de DMSO (vehículo) a las células para establecer la línea base. Tras permitir que la corriente se estabilizara durante 3 minutos, se aplicó el compuesto. Se añadió la solución de compuesto en 4 etapas y se mantuvieron las células en la solución de ensayo hasta que el efecto del compuesto alcanzó un estado estacionario o durante un máximo de 6 minutos. Posteriormente, se añadió el control positivo (Cisapride 100 nM). Se llevó a cabo el lavado con solución externa hasta que la recuperación de la corriente alcanzó un estado estacionario.
- 25

6. Análisis de datos

Se analizaron los datos usando Pulsefit y Origin 7 (Originlab Corporation).

7. Resultado

- 30 El Compuesto 3 inhibió las corrientes de cola de hERG con IC₅₀ de 9,3 ± 1,2 μM (cinco concentraciones, 5 x 2) usando un ensayo de fijación con parche de células completas.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto (3aR, 6aR)-N-(4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidro pirrolo[3,4-b]bipirrol-5(1H)-carboxamida;
o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y el compuesto (3aR, 6aR)-N-(4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidro pirrolo[3,4-b]bipirrol-5(1H)-carboxamida;
y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 3. El compuesto (3aR, 6aR)-N-(4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidro pirrolo[3,4-b]bipirrol-5(1H)-carboxamida;
y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer.
4. El compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de cuello y cabeza, cáncer colorrectal, cáncer de faringe, cáncer epidermoide y cáncer de páncreas.
- 15 5. El compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
6. El compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en combinación con un agente anti-cáncer diferente de (3aR, 6aR)-N-(4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il)-1-metil-hexahidro pirrolo[3,4-b]bipirrol-5(1H)-carboxamida y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 7. Procedimiento para la inhibición *in vitro* de la sobreexpresión y/o sobreactividad del receptor de factor de proliferación epidérmico mediante la puesta en contacto del compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 con el receptor de factor de proliferación epidérmico.
8. Uso del compuesto y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- 25 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de cuello y cabeza, cáncer colorrectal, cáncer de faringe, cáncer epidermoide y cáncer de páncreas.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.