

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 564**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/14** (2006.01)

**A61K 31/4709** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2012 PCT/CN2012/071015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12122865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12757831 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2684877**

54 Título: **Sal farmacéuticamente aceptable de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, método de preparación para la misma, y uso médico de la misma**

30 Prioridad:

**11.03.2011 CN 201110062359**

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

**15.03.2017**

73 Titular/es:

**SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO. LTD. (50.0%)**

**279 Wenjing Road Minhang District  
Shanghai 200245, CN y**

**JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO. LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, XIN y  
WANG, BIN**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**Observaciones :**

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

**ES 2 605 564 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

Sal farmacéuticamente aceptable de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, método de preparación para la misma, y uso médico de la misma.

5

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, un método de preparación para la misma, y dicha sal para su uso como un agente terapéutico, especialmente como un inhibidor de proteína cinasa.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La transducción de señales es un mecanismo fundamental mediante el cual los estímulos extracelulares se retransmiten al interior de las células, regulando las respuestas fisiológicas correspondientes, incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La mayor parte de estos procesos de transducción de señales utilizan el proceso de fosforilación reversible de proteínas que implican proteína cinasas y fosfatasaes específicas.

20 Hay dos clases de proteínas cinasas (PK): las proteínas tirosina cinasas (PTK) y las serina-treonina cinasas (STK). Las PTK pueden fosforilar residuos de tirosina en una proteína. Las STK pueden fosforilar residuos de serina y/o treonina. Las tirosina cinasas se pueden dividir en el tipo receptor (receptor tirosina cinasa, RTK) o el tipo no receptor (no receptor tirosina cinasa). Ahora, se han identificado aproximadamente 90 tirosina cinasas en el genoma humano, de las cuales aproximadamente 60 pertenecen al tipo receptor y aproximadamente 30 pertenecen al tipo no receptor.

25

La familia de receptores tirosina cinasas (RTK) incluye muchas subfamilias, tales como (1) la familia del receptor EGF que incluye EGFR, HER-2, HER-3 y HER-4; (2) la familia del receptor de insulina que incluye el receptor de insulina (IR), el receptor del factor de crecimiento I tipo insulina (IGF-IR) y el receptor relacionado con la insulina (IRR); (3) la familia de Clase III tal como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de células madre (SCF) (c-Kit)RTK, el receptor de tirosina cinasa 3 relacionado con fms (Flt3) y el receptor del factor 1 de estimulación de colonias (CSF-1R), y similares. De otro modo, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos c-Met, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y similares, también pertenecen a una familia de TAK. Tienen una función principal en el control del crecimiento celular y la diferenciación

30

35

y son mediadores clave de las señales celulares que conducen a la producción de citocinas, tales como los factores de crecimiento (Schlessinger y Ullrich, Neuron 1992, 9, 383).

La subfamilia de EGFR (ErbB, HER) tiene una función crítica en el control de la proliferación celular y la supervivencia. Estos RTK consisten en un dominio de unión a ligando glicosilado extracelular, un dominio transmembrana y un dominio catalítico citoplásmico intracelular. La actividad enzimática del receptor de tirosina cinasa puede estimularse por la homodimerización o heterodimerización mediada por ligando. La dimerización da como resultado la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores en el dominio catalítico, y produce otro sitio de unión. Esto va seguido de la activación de rutas de señalización intracelulares tales como las que implican la proteína cinasa asociada a microtúbulos (MAP cinasa) y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3 cinasa). La activación de estas rutas está relacionada con la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Se ha identificado que tales formas mutadas y sobreexpresadas de tirosina cinasas, como EGFR, HER-2, están presentes en una gran proporción de los cánceres humanos comunes, tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de esófago, cáncer de ovario y cáncer de páncreas y similares. La prevalencia y relevancia de las tirosina cinasas se confirma en la oncogénesis y el crecimiento del cáncer.

40

45

50

Se espera sintetizar compuestos novedosos que tengan actividades proliferativas de células antitumorales. Se espera que estos compuestos inhiban uno o más RTK o STK, y son útiles para tratar o mejorar los trastornos fisiológicos mediados por RTK o STK, y mediados por la angiogénesis con la sobreproliferación celular. Una clase de inhibidores de proteína cinasas son derivados de 6-aminoquinazolina o 3-cianoquinolina que se desvelan, por ejemplo, en la solicitud de patente China CN 101824029 A y la publicación de patente internacional WO 2011/029265 A1.

55

La presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, como se especifica

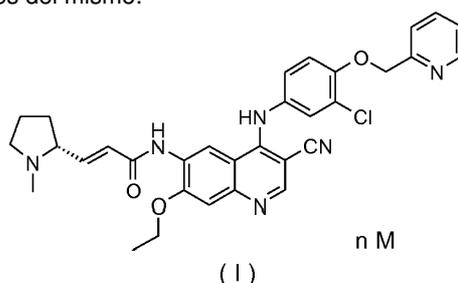
en la reivindicación 1, y sus usos, especialmente como inhibidores de proteína cinasa.

Los inventores han descubierto que la base libre de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida es muy poco soluble en disolventes convencionales y, por lo tanto, desventajosa para prepararse en una forma de dosificación médica, limitando su biodisponibilidad *in vivo*. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar su solubilidad y absorción farmacocinética con el fin de ajustar el proceso de preparación convencional de las formas de dosificación. En comparación con la base libre (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, la solubilidad y farmacocinética de las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto han mejorado significativamente, y el proceso sintético se ha simplificado.

La presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1, que tienen mejores propiedades físico/químicas y características farmacocinéticas.

## 15 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable de fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1, y el método de preparación de la misma. Una realización preferida se refiere a la sal dimaleato de fórmula (I), que tiene ventajas en la solubilidad, biodisponibilidad y farmacocinética en comparación con el propio compuesto de fórmula (I) y otras sales del mismo.



en la que:

n es 1, 2 o 3; y

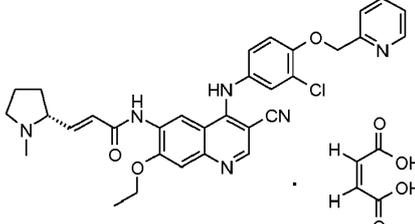
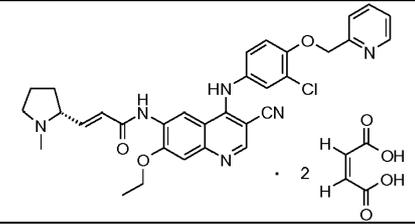
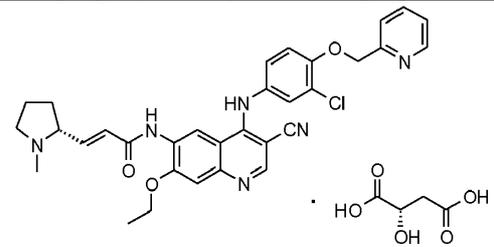
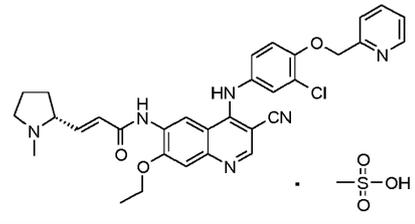
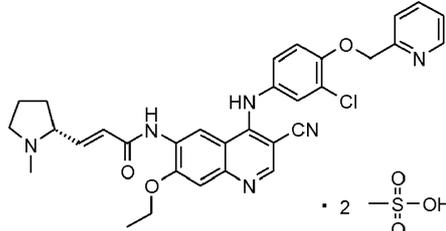
M es una molécula de ácido como se define en la reivindicación 1.

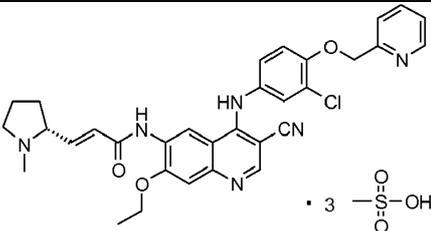
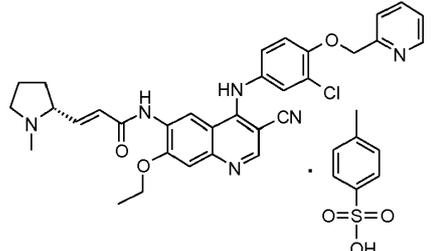
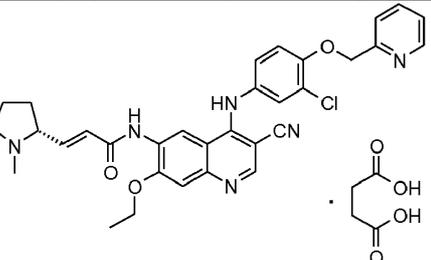
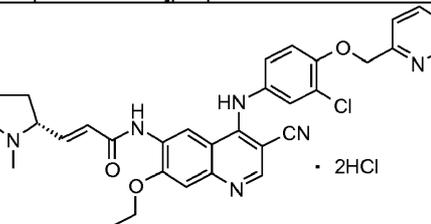
En el primer aspecto de la presente invención, se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida de fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1, en la que dicha sal es una sal orgánica seleccionada entre el grupo que consiste en p-toluenosulfonato, metanosulfonato, maleato, succinato y L-malato, preferiblemente maleato. Especialmente, la sal maleato del compuesto de fórmula (I) tiene ventajas en solubilidad, biodisponibilidad y farmacocinética en comparación con el propio compuesto de fórmula (I) y otras sales del mismo.

En el segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un proceso de preparación de la sal farmacéuticamente aceptable de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, como se especifica en la reivindicación 1, y este compuesto puede prepararse de acuerdo con el proceso salificado convencional en la técnica. Específicamente, dicho proceso comprende la etapa de hacer reaccionar (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida con un ácido correspondiente para formar la sal, en la que dicho ácido es un ácido orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, ácido succínico y ácido L-málico.

Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 incluyen los siguientes Ejemplos 1-8:

Ejemplo n.º	Estructura y Nombre
-------------	---------------------

<p>1</p>	 <p>Maleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>
<p>2</p>	 <p>Dimaleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>
<p>3</p>	 <p>L-maleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>
<p>4</p>	 <p>Metanosulfonato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>
<p>5</p>	 <p>Dimetanosulfonato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>

<p>6</p>	 <p>Trimetanosulfonato de (<i>E</i>)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2<i>R</i>)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>
<p>7</p>	 <p>p-toluenosulfonato de (<i>E</i>)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2<i>R</i>)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>
<p>8</p>	 <p>(<i>E</i>)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2<i>R</i>)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida succinato</p>
<p>9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la invención)</p>	 <p>Diclorhidrato de (<i>E</i>)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2<i>R</i>)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida</p>

En el tercer aspecto de la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal farmacéuticamente aceptable de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, como se especifica en la reivindicación 1, y vehículos farmacéuticamente aceptables. La presente invención también se refiere al proceso para preparar dicha composición que comprende una etapa de combinar la sal farmacéuticamente aceptable con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En el cuarto aspecto de la presente invención, se refiere a un uso de la sal farmacéuticamente aceptable de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, como se especifica en la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con proteína cinasas, en el que dichas proteína cinasas se seleccionan entre el grupo que consiste en tirosina cinasas del receptor EGFR y tirosina cinasas del receptor HER-2.

En el quinto aspecto de la presente invención, se refiere a un uso de la sal farmacéuticamente aceptable de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida, como se especifica en la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con proteína cinasas, en la que dichas enfermedades son cánceres seleccionados entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, carcinoma de célula escamosas y cáncer de estómago.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes Ejemplos.

### Ejemplos

15 Las estructuras de todos los compuestos se identifican por resonancia magnética nuclear (RMN) y/o espectrometría de masas (MS). El desplazamiento químico de RMN ( $\delta$ ) se registra como ppm ( $10^{-6}$ ). La RMN se realiza en un espectrómetro Bruker AVANCE-400. El disolvente de detección es dimetilsulfóxido deuterado (d-DMSO) con tetrametilsilano (TMS) como patrón interno, y el desplazamiento químico se registra como ppm ( $10^{-6}$ ).

20 La MS se determina en un espectrómetro de masas FINNIGAN LCQAd (ESI) (Thermo, Modelo: Finnigan LCQ advantage MAX).

El análisis por HPLC se determina en un espectrómetro de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200DAD (columna cromatográfica Sunfire C18 150 x 4,6 mm) y un espectrómetro de cromatografía líquida de alto rendimiento Waters 2695-2996 (columna cromatográfica Gemini C18 150 x 4,6 mm).

La cromatografía en columna usa generalmente gel de sílice Yantai Huanghai de malla 200-300 como vehículo.

Los materiales de partida de la presente invención se conocen y pueden adquirirse en ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, etc., o pueden prepararse mediante los métodos de síntesis convencionales conocidos en la técnica.

A menos que se indique otra cosa, las siguientes reacciones se ponen en una atmósfera de argón o una atmósfera de nitrógeno.

35

La expresión "atmósfera de argón" o "atmósfera de nitrógeno" se refiere a que un matraz de reacción está equipado con un globo cargado con aproximadamente 1 l de argón o nitrógeno.

La expresión "atmósfera de hidrógeno" se refiere a que un matraz de reacción está equipado con un globo cargado con aproximadamente 1 l de hidrógeno.

40

A menos que se indique otra cosa, la solución usada en los Ejemplos se refiere a una solución acuosa.

A menos que se indique otra cosa, la temperatura de reacción es la temperatura ambiente. La temperatura ambiente es la temperatura de reacción más apropiada, que es 20 °C-30 °C.

45

Los procesos de reacción en los Ejemplos se controlan por cromatografía de capa fina (TLC). Los sistemas de disolvente de desarrollo comprenden sistema de diclorometano y metanol, sistema de n-hexano y acetato de etilo, sistema de éter de petróleo y acetato de etilo, y acetona. La relación en volumen del disolvente se ajusta de acuerdo con la polaridad de los compuestos.

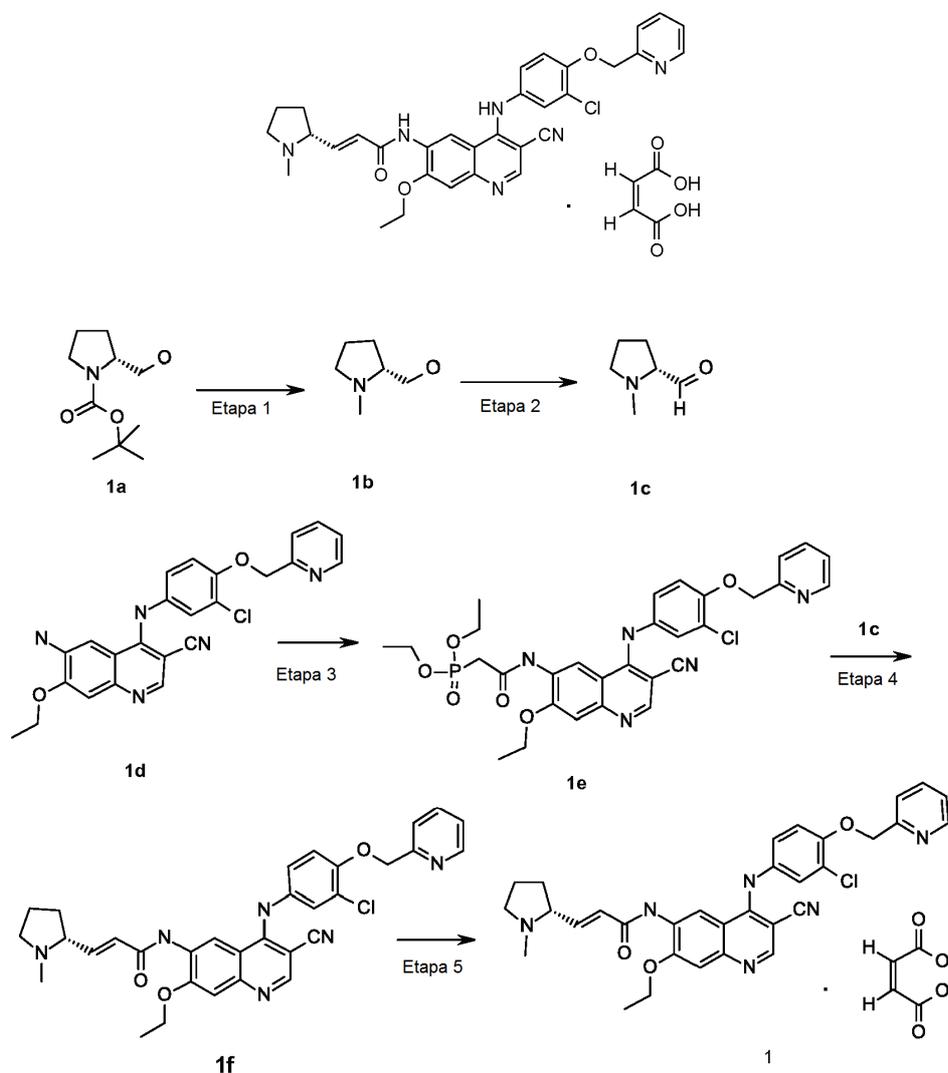
50

Los sistemas de elución de la cromatografía en columna comprenden A: el sistema de diclorometano, metanol y acetona; B: el sistema de hexano y acetato de etilo. La relación en volumen del disolvente se ajusta de acuerdo con la polaridad de los compuestos, y a veces también puede añadirse algo de amoníaco y ácido acético.

55

### Ejemplo 1

Maleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



## Etapa 1

5 Se disolvieron [(2R)-1-Metilpirrolidin-2-il]metanol-hidruro de litio y aluminio (230 mg, 6 mmol) y N-terc-butoxicarbonil-R-prolinol 1a (400 mg, 2 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano seco en un baño de hielo-agua en lotes. Después de no desprenderse obviamente ninguna cantidad de gas, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota con 5 ml de metanol en un baño de hielo-agua seguido de la adición de 10 compuesto del título [(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]metanol 1b (221 mg, rendimiento del 77,0 %) en forma de un aceite incoloro.

MS m/z (ESI): 116 [M+1]

## Etapa 2

15

(2R)-1-Metilpirrolidina-2- formaldehído

Se disolvió dimetilsulfóxido (820  $\mu$ l, 11,46 mmol) en 5 ml de diclorometano en un baño de hielo seco seguido de la adición gota a gota lentamente de cloruro de oxalilo (968 mg, 7,64 mmol). Después de agitar durante 45 minutos, a 20 la solución se le añadió una solución de [(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]metanol 1b (220 mg, 1,91 mmol) en 2 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos más, y se añadió trietilamina (1,9 ml,

13,37 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se lavó con agua (20 ml) y salmuera saturada (10 ml) sucesivamente. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, y los residuos resultantes se purificaron por cromatografía en columna con alúmina alcalina con sistema de elución A para dar el compuesto del título (2*R*)-1-metilpirrolidina-2-formaldehído 1c (300 mg) en forma de un sólido de color amarillo, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación.

## Etapa 3

10 N-[4-[[3-Cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-2-dietoxifosforil-acetamida

Se disolvió N,N'-carbonildiimidazol (487 mg, 3 mmol) en 4 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se calentó a 40 °C en un baño de aceite, a la mezcla se le añadió gota a gota una solución de ácido dietilfosfonoacético (588 mg, 3 mmol) en tetrahidrofurano (4 ml), y se agitó durante 30 minutos hasta la siguiente etapa.

15

Se disolvió 6-amino-4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-7-etoxi-quinolina-3-carbonitrilo 1d (446 mg, 1 mmol, preparado por el método ya conocido: solicitud de patente WO2005028443) en 4 ml de tetrahidrofurano a 40 °C seguido de la adición gota a gota de la solución de reacción anterior. Después de agitar durante 12 horas, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se extrajo con diclorometano (50 ml x 3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera saturada (30 ml x 2), se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, y los residuos resultantes se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice con el sistema de elución A para dar el compuesto del título N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-2-dietoxifosforil-acetamida 1e (624 mg, rendimiento del 99,9 %) en forma de un sólido de color amarillo claro.

25 MS m/z (ESI): 624 [M+1]

## Etapa 4

(*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

30

Se disolvió N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-2-dietoxifosforil-acetamida 1e (250 mg, 0,40 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano seco en un baño de hielo seco seguido de la adición gota a gota de una solución de bis(trimetilsilil)amida de litio (1 M) en tolueno (440 µl, 0,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, se añadió gota a gota con una solución de (2*R*)-1-metilpirrolidina-2-formaldehído 1c (90 mg, 0,80 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml), y se agitó durante 30 minutos, después se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y los residuos resultantes se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice con el sistema de elución A para dar el compuesto del título (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (46 mg, rendimiento del 19,7 %) en forma de un sólido de color amarillo.

40 MS m/z (ESI): 583,4 [M+1]

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9,16 (s, 1H), 8,63 (d, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,83-7,80 (dd, 1H), 7,76-7,50 (m, 2H), 7,57-7,56 (m, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,19 (d, 1H), 7,06-7,03 (m, 2H), 6,34-6,31 (d, 1H), 5,35 (s, 2H), 4,39 (m, 2H), 4,27-4,26 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,10 (m, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,37-2,36 (m, 2H), 2,07-2,01 (m, 2H), 1,64 (t, 3H)

45

## Etapa 5

Maleato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

50

Se disolvieron (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (500 mg, 0,86 mmol) y ácido maleico (109 mg, 0,94 mmol) en 5 ml de diclorometano en agitación. Después de agitar durante 1 hora a t.a., la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar maleato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1 (609 mg, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color amarillo.

55

MS m/z (ESI): 584,4 [M+1-116]

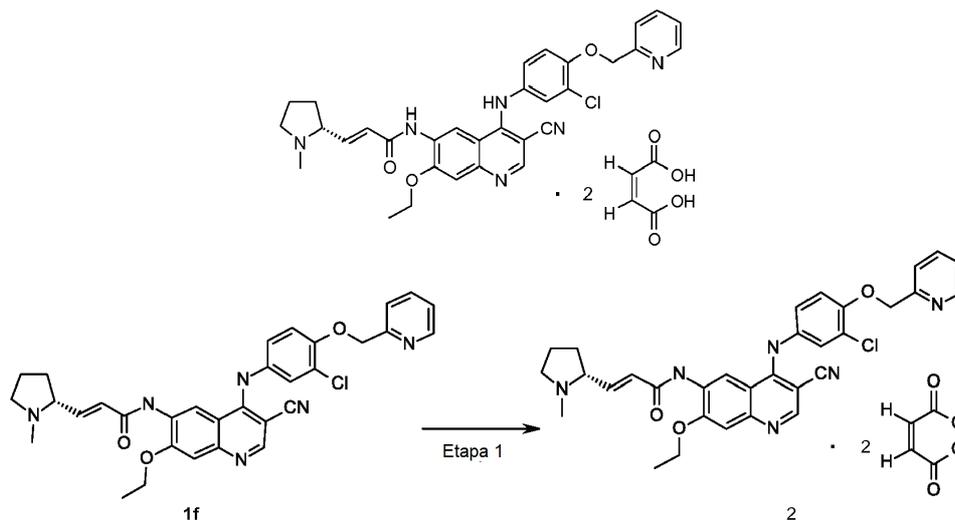
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,22 (s, 1H), 8,63 (m, 1H), 8,52 (m, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,74 (m, 1H), 7,69

(m, 1H), 7,58 (m, 1H), 7,26 (m, 1H), 7,02 (m, 2H), 6,92 (m, 1H), 6,72 (m, 1H), 6,25 (s, 2H), 5,27 (s, 2H), 4,27 (m, 2H), 3,90 (m, 2H), 3,00 (m, 1H), 2,87 (m, 2H), 2,21 (m, 4H), 2,09 (m, 1H), 1,56 (t, 3H, J = 8 Hz)

### Ejemplo 2

5

Dimaleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



10

Dimaleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

15 Se disolvió (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (200 mg, 0,34 mmol) en 6 ml de etanol en agitación seguido de la adición de ácido maleico (80 mg, 0,68 mmol). Después de agitar durante 0,5 horas y reposar durante 12 horas a t.a., la mezcla de reacción se añadió con 10 ml de éter dietílico y se filtró. El sólido se lavó con éter dietílico (20 ml) y se secó al vacío para dar el producto del título dimaleato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-

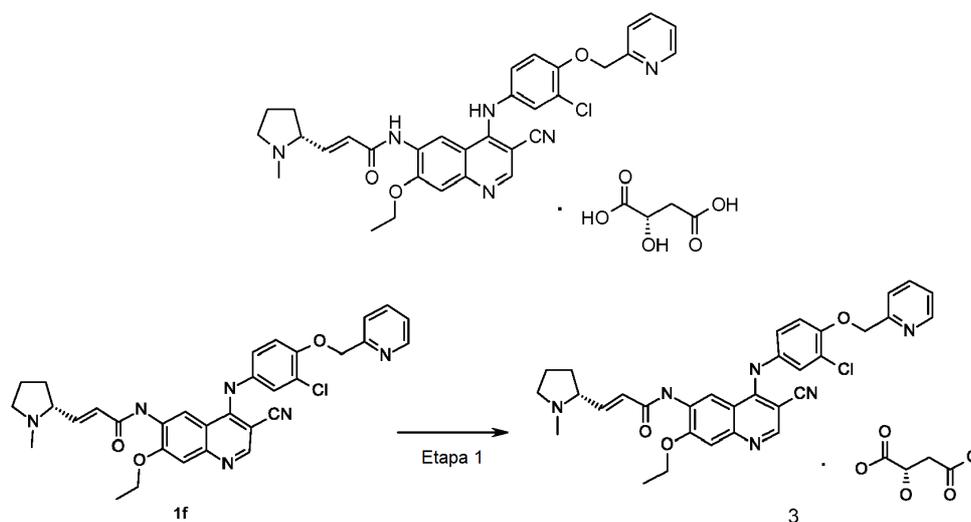
20 metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 2 (220 mg, rendimiento del 78,6 %) en forma de un sólido de color amarillo.

MS m/z (ESI): 583,4 [M+1-232]

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 9,12 (s, 1H), 8,57 (m, 1H), 8,51 (m, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,79 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,63 (m, 1H), 7,52 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 7,00 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,57 (m, 1H), 6,25 (s, 4H), 5,23 (s, 2H), 4,21 (m, 2H), 25 3,91 (m, 2H), 3,11 (m, 1H), 2,85 (m, 2H), 2,22 (m, 4H), 2,01 (m, 1H), 1,54 (t, 3H, J = 8 Hz)

### Ejemplo 3

30 L-malato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



## Etapa 1

5 L-malato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

Se disolvió (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (300 mg, 0,51 mmol) en 5 ml de diclorometano en agitación, seguido de la adición de ácido L-málico (75,9 mg, 0,56 mmol). Después de agitar durante 4 horas a t.a., la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se secó al vacío para dar L-malato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 3 (375 mg, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color amarillo.

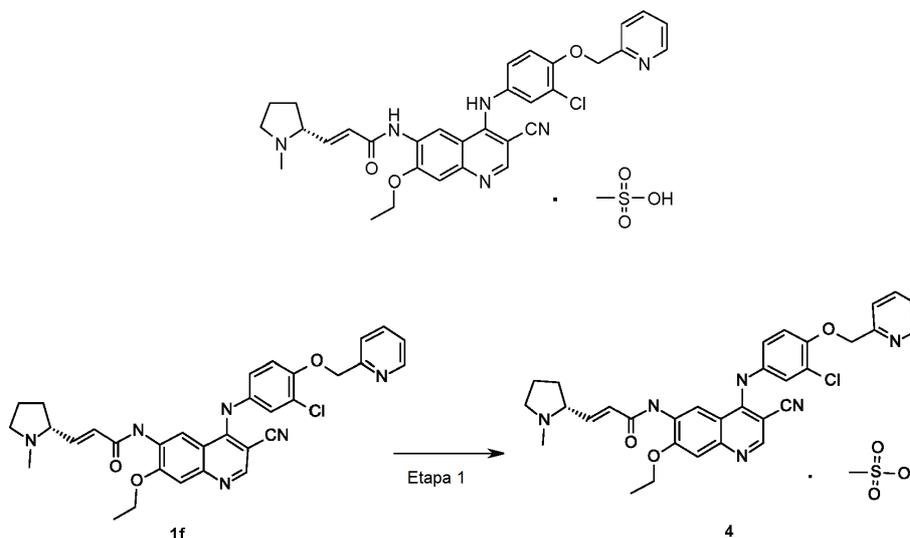
MS m/z (ESI): 583,4 [M+1-134]

15

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, MeOD) :  $\delta$  8,96 (s, 1H), 8,58 (m, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,94 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,42 (m, 2H), 7,24 (s, 1H), 7,19 (m, 2H), 6,98 (m, 1H), 6,71 (m, 1H), 5,51 (s, 1H), 5,28 (m, 2H), 4,34 (m, 2H), 3,64 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,67 (m, 3H), 2,58 (m, 1H), 2,31 (m, 1H), 2,17 (m, 1H), 2,09 (m, 2H), 1,98 (m, 1H), 1,58 (t, 3H, J = 8 Hz)

## 20 Ejemplo 4

Metanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



## Etapa 1

5 Metanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

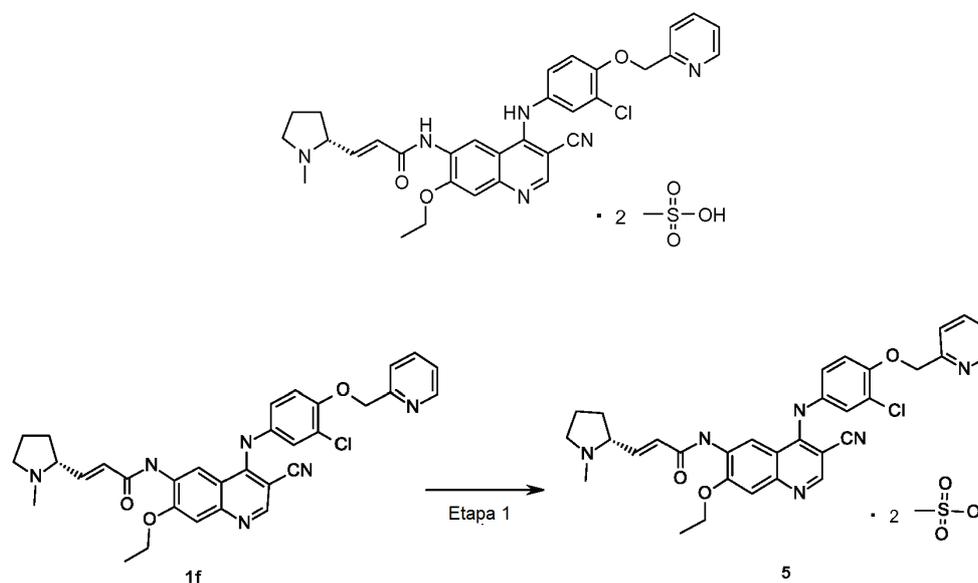
Se disolvió (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (150 mg, 0,26 mmol) en 2 ml de etanol en agitación seguido de la adición de ácido metanosulfónico (1,67 ml, 0,26 mmol). Después de agitar durante 12 horas a t.a., la mezcla de reacción se añadió con 2 ml de éter dietílico y se filtró. El sólido se lavó con éter dietílico (10 ml) y se secó al vacío para dar el producto del título metanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 4 (120 mg, rendimiento del 69,0 %) en forma de un sólido de color amarillo.  
MS m/z (ESI): 583,4 [M+1-96]

15

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,10 (m, 1H), 10,00 (s, 1H), 9,91 (m, 1H), 9,11 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,60 (d, 1H, J = 4 Hz), 8,03 (m, 1H), 7,57 (m, 2H), 7,47 (m, 4H), 6,92 (m, 2H), 5,31 (s, 2H), 4,43 (m, 2H), 4,01 (m, 2H), 3,73 (m, 3H), 3,14 (s, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,32 (m, 1H), 2,27 (m, 3H), 1,51 (t, 3H, J = 8 Hz)

## 20 Ejemplo 5

Dimetanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



## Etapa 1

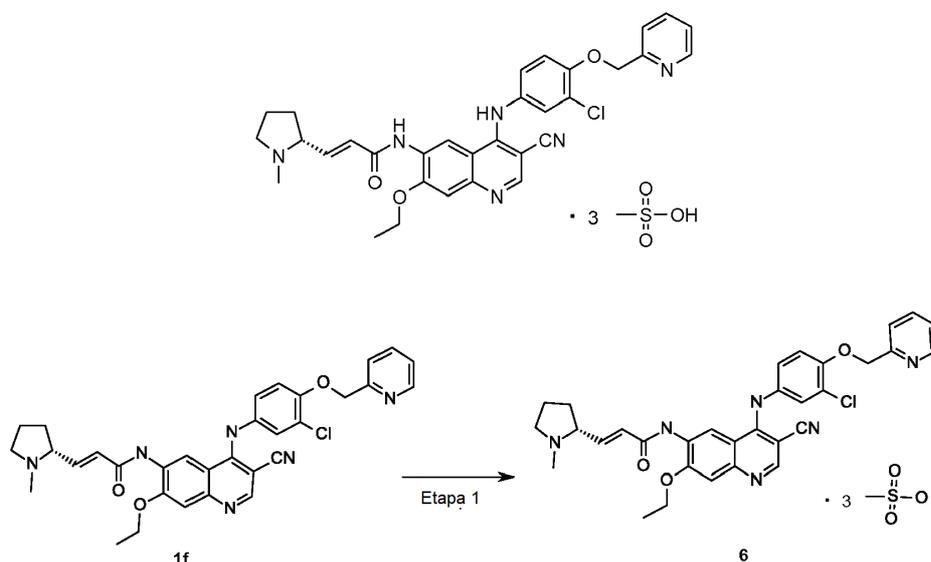
5 Dimetanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

Se disolvió (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (200 mg, 0,34 mmol) en 2 ml de etanol en agitación seguido de la adición de ácido metanosulfónico (4,45 ml, 0,68 mmol). Después de agitar durante 12 horas a t.a., la mezcla de reacción se añadió con 2 ml de éter dietílico y se filtró, el sólido se lavó con éter dietílico (10 ml) y se secó al vacío para dar el producto del título dimetanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 5 (180 mg, rendimiento del 67,7 %) en forma de un sólido de color amarillo.  
MS m/z (ESI): 583,4 [M+1-192]

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 11,17 (m, 1H), 10,04 (s, 1H), 9,98 (m, 1H), 9,18 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,67 (d, 1H, J = 4 Hz), 8,01 (m, 1H), 7,68 (m, 2H), 7,50 (m, 4H), 6,91 (m, 2H), 5,39 (s, 2H), 4,40 (m, 2H), 4,14 (m, 2H), 3,71 (m, 6H), 3,22 (s, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,36 (m, 1H), 2,32 (m, 3H), 1,52 (t, 3H, J = 8 Hz)

## 20 Ejemplo 6

Trimetanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



## Etapa 1

5 Trimetanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

Se disolvió (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (150 mg, 0,26 mmol) en 1 ml de etanol en agitación seguido de la adición de ácido

10 metanosulfónico (5,00 ml, 0,78 mmol). Después de agitar durante 12 horas, la mezcla de reacción se añadió con 2 ml de éter dietílico y se filtró, el sólido se lavó con éter dietílico (10 ml) y se secó al vacío para dar el producto del título trimetanosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 6 (140 mg, rendimiento del 62,5 %) en forma de un sólido de color amarillo.

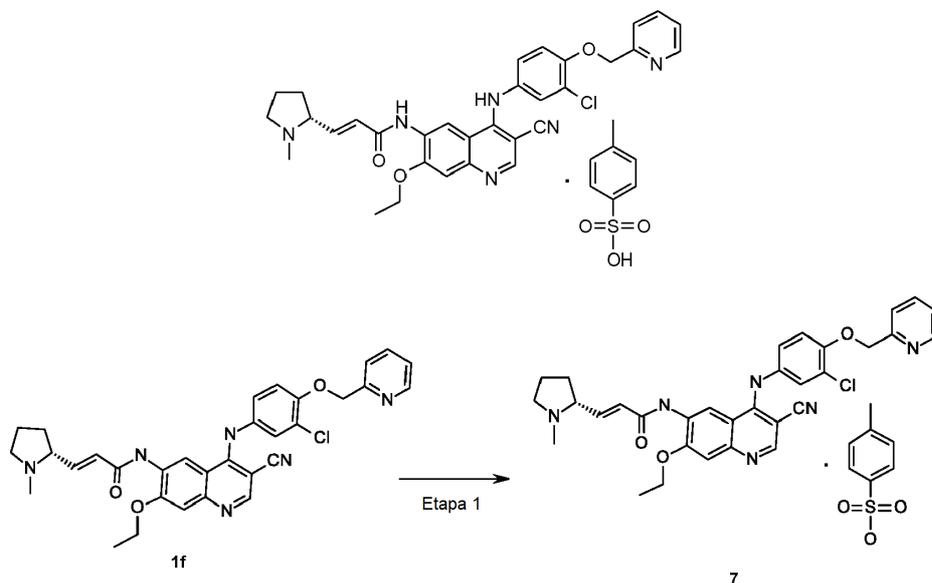
MS m/z (ESI): 583,4 [M+1-288]

15

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10,97 (m, 1H), 9,99 (s, 1H), 9,89 (m, 1H), 9,27 (s, 1H), 9,08 (s, 1H), 8,71 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,93m, 1H), 7,62 (m, 2H), 7,51 (m, 4H), 6,94 (m, 2H), 5,27 (s, 2H), 4,37 (m, 2H), 4,09 (m, 2H), 3,67 (m, 9H), 3,19 (s, 2H), 2,78 (m, 2H), 2,31 (m, 1H), 2,27 (m, 3H), 1,52 (t, 3H, J = 8 Hz)

## 20 Ejemplo 7

p-Toluenosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



## Etapa 1

5 p-Toluenosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

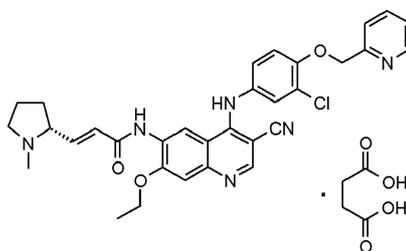
Se disolvió (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (300 mg, 0,514 mmol) en 3 ml de disolvente mixto de n-propanol/agua (3/1) en agitación  
 10 seguido de la adición de ácido p-toluenosulfónico monohidrato (117 mg, 0,0,617 mmol). Después de agitar durante 0,5 horas a t.a., la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se secó al vacío para dar el producto del título p-toluenosulfonato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 7 (410 mg, rendimiento del 98,0 %) en forma de un sólido de color amarillo.  
 MS m/z (ESI): 584,2 [M+1-172]

15

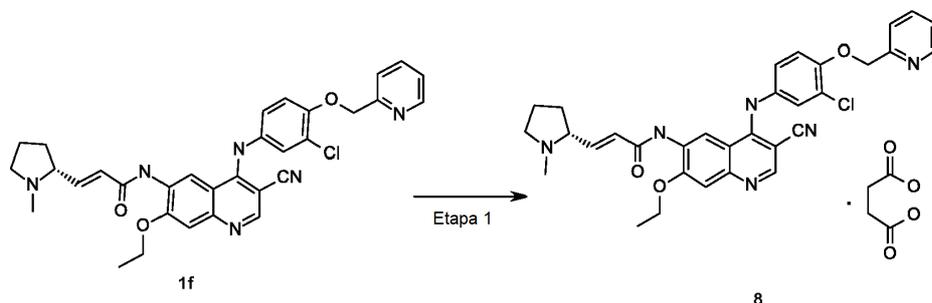
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, MeOD) : δ 8,56 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,85 (m, 1H), 7,65 (m, 4H), 7,40 (m, 5H), 7,12 (m, 1H), 7,00 (m, 2H), 6,81 (m, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,14 (m, 4H), 3,54 (m, 7H), 2,83 (m, 3H), 2,33 (m, 6H), 1,56 (t, 3H, J = 7,2 Hz)

## 20 Ejemplo 8

Succinato de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



25



Etapa 1

5 Succinato de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

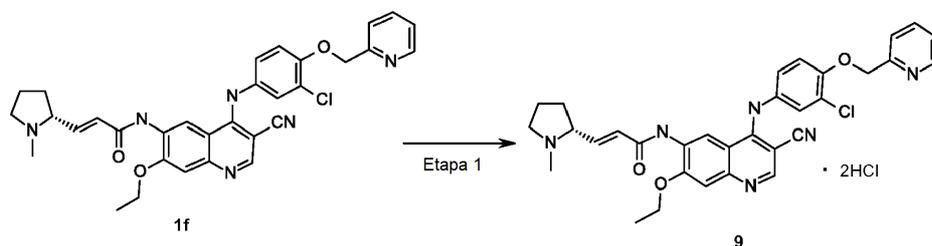
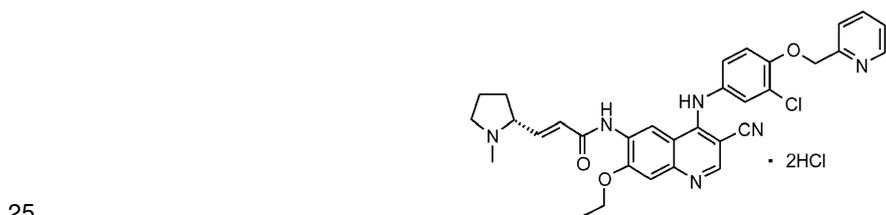
Se disolvió (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 1f (400 mg, 0,69 mmol) en 5 ml de diclorometano en agitación seguido de la adición de ácido succínico (89,0 mg, 0,75 mmol). Después de agitar durante 0,5 horas a t.a., la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se secó al vacío para dar el producto del título succinato de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 8 (442 mg, rendimiento del 90,4 %) en forma de un sólido de color amarillo.

MS m/z (ESI): 583,4 [M+1-118]

15 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, MeOD): δ 12,21 (s, 2H), 9,62 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,47 (m, 1H), 7,87 (m, 1H), 7,59 (m, 1H), 7,39 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 6,66 (m, 1H), 5,76 (m, 1H), 5,29 (s, 2H), 4,31 (m, 2H), 4,03 (m, 1H), 3,32 (m, 2H), 2,50 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 1,48 (t, 3H, J = 7,2 Hz)

20 **Ejemplo 9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la invención)**

Diclorhidrato de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida



Etapa 1

30 Diclorhidrato de (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida

Se disolvió (*E*)-*N*-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2*R*)-1-metilpirrolidin-2-

il]prop-2-enamida 1f (1000 mg, 1,71 mmol) en 5 ml de diclorometano en agitación seguido de la adición de una solución de ácido clorhídrico en éter dietílico (1 M, 3,42 ml, 3,42 mmol). Después de agitar durante 0,5 horas en un baño de hielo, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se secó al vacío para dar el producto del título diclorhidrato de (E)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida 9 (1500 mg, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color amarillo.  
MS m/z (ESI): 583,2 [M+1-72]

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 9,16 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,79 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,33 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,25 (m, 1H), 7,13 (m, 1H), 7,01 (m, 1H), 6,98 (m, 1H), 6,19 (m, 1H), 5,31 (s, 2H), 4,35 (dd, 2H, J = 8 Hz, J = 16 Hz), 4,24 (m, 1H), 3,19 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,33 (m, 4H), 2,09 (m, 1H), 1,60 (t, 3H, J = 8 Hz)

## EJEMPLOS DE ENSAYO

### 15 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

#### EJEMPLO 1: Ensayo de inhibición de proliferación celular de EGFR

El siguiente ensayo *in vitro* sirve para determinar la actividad de los compuestos de la presente invención para inhibir la proliferación de células A431 de carcinoma epidermoide humano, que tiene alta expresión de EGFR.

El siguiente ensayo *in vitro* sirve para determinar la actividad de los compuestos de ensayo para inhibir la proliferación de células cancerosas, que tiene alta expresión de EGFR. La actividad se representa por el valor de Cl<sub>50</sub>. Los procedimientos generales del ensayo se dan como se indica a continuación: las células cancerosas A431 que expresan altamente EGFR se escogen y se siembran en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad adecuada (por ejemplo, 5000 células/ml de medio). Después, las células se incubaron en una incubadora de dióxido de carbono hasta que alcanzaron una confluencia del 85 %. Después, el medio de cultivo celular se reemplazó por medio recién preparado que contenía los compuestos de ensayo con diluciones seriadas (en general de 6 a 7 concentraciones). Las células se pusieron de nuevo en la incubadora y se cultivaron continuamente durante 72 horas. La actividad de los compuestos de ensayo para inhibir la proliferación celular se determinó usando el método de Sulforodamina B (SRB). Los valores de Cl<sub>50</sub> se calcularon por la tasa de inhibición a diversas concentraciones de los compuestos de ensayo.

#### La actividad de los compuestos de la presente invención:

La actividad biológica de los compuestos de la presente invención se ensayó usando el ensayo que se ha descrito anteriormente. Los valores de Cl<sub>50</sub> se calcularon y se mostraron en la tabla que se indica a continuación:

Ejemplo n.º	Cl <sub>50</sub> (EGFR/A431) (µM)
1f	0,045
2	0,031
3	0,029
7	0,038
8	0,015
9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la presente invención)	0,049
Conclusión: El maleato y otras sales y la base libre de los compuestos de fórmula (I) tienen una actividad obvia en la inhibición de la proliferación de células A431 que tiene una alta expresión de EGFR.	

#### 40 EJEMPLO 2: Ensayo de actividad cinasa de EGFR

La actividad cinasa de EGFR *in vitro* se ensayó mediante el siguiente ensayo.

El siguiente ensayo puede usarse para determinar la actividad de los compuestos de la presente invención para inhibir la actividad cinasa de EGFR. La concentración inhibitoria máxima media Cl<sub>50</sub> (la concentración del compuesto de ensayo que muestra una inhibición del 50 % de la actividad enzimática) de cada compuesto se determinó incubando varias concentraciones diferentes de los compuestos de ensayo con una enzima y sustrato específicos. La cinasa de EGFR usada en este ensayo es una proteína recombinante derivada de humano, que se incubó con un sustrato peptídico a diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo en una solución de tampón que contenía HEPES 60 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 3 µM, DTT 1,25 M (1000x) y ATP 20 µM a

25 °C, durante 45 minutos. La actividad cinasa de EGFR se determinó cuantitativamente usando un método de fluorescencia en tiempo resuelto.

**La actividad de los compuestos de la presente invención:**

5

La actividad biológica de los compuestos de la presente invención se ensayó usando el ensayo que se ha descrito anteriormente. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon y se mostraron en la tabla que se indica a continuación:

Ejemplo n.º	$CI_{50}$ (EGFR/BIO) ( $\mu$ M)
1f	0,013
1	0,025
2	0,009
3	0,031
7	0,026
8	0,028
9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la presente invención)	0,035
Conclusión: El maleato y otras sales y la base libre de los compuestos de fórmula (I) tienen una actividad obvia de la inhibición de la actividad cinasa de EGFR.	

**10 EJEMPLO 3: Ensayo de la actividad celular de Her-2**

El siguiente ensayo *in vitro* sirve para determinar la actividad de los compuestos de la presente invención para inhibir la proliferación de las células SK-BR-3 de carcinoma humano, que tienen una alta expresión de HER-2.

- 15 El siguiente ensayo *in vitro* sirve para determinar la actividad de los compuestos de ensayo para inhibir la angiogénesis y la proliferación de células cancerosas, que tienen alta expresión de HER-2. La actividad se representa por el valor de  $CI_{50}$ . El procedimiento general del ensayo es como se indica a continuación: La línea de células cancerosas SK-BR-3 que expresan altamente HER-2 se escogió y las células se sembraron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad adecuada. Después, las células se incubaron en una incubadora de dióxido de carbono hasta que alcanzaron una confluencia del 60 %. Después, el medio de cultivo celular se reemplazó por uno recién preparado con los compuestos de ensayo a diversas concentraciones (de 6 a 7 concentraciones). Las células se pusieron de nuevo en la incubadora y se cultivaron continuamente durante 96 horas. La actividad de los compuestos de ensayo para inhibir la proliferación celular se determinó usando el método de Sulforodamina B (SRB). Los valores de  $CI_{50}$  de las células de ensayo se calcularon mediante la tasa de inhibición a diversas concentraciones de los compuestos de ensayo.
- 20
- 25

**La actividad de los compuestos de la presente invención:**

- La actividad biológica de los compuestos de la presente invención se ensayó usando el ensayo que se ha descrito anteriormente. Los valores de  $CI_{50}$  se midieron y se mostraron en la tabla que se indica a continuación:
- 30

Ejemplo n.º	$CI_{50}$ (Her-2/SK-BR-3) ( $\mu$ M)
1f	0,059
1	0,064
2	0,049
3	0,056
7	0,045
8	0,078
9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la presente invención)	0,069
Conclusión: El maleato y otras sales y la base libre de los compuestos de fórmula (I) tienen una actividad obvia en la inhibición de la proliferación de células SK-BR-3 que expresan altamente Her-2.	

**EJEMPLO 4: Ensayo de actividad cinasa de Her-2**

- 35 La actividad cinasa de Her-2 *in vitro* se ensayó mediante el siguiente ensayo.

El siguiente ensayo puede usarse para determinar la actividad de los compuestos de la presente invención para inhibir la cinasa de Her-2. La concentración inhibitoria máxima media  $CI_{50}$  (la concentración del compuesto de

ensayo que muestra una inhibición del 50 % de la actividad enzimática) de cada compuesto se determinó incubando varias concentraciones diferentes de los compuestos de ensayo con una enzima y sustrato específicos. La cinasa de Her-2 usada en este ensayo es una proteína recombinante derivada de humano, que se incubó con un sustrato peptídico a diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo en una solución de tampón que contenía 5 HEPES 60 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 3 μM, 1, DTT 1,25 M (1000x) y ATP 20 μM a 25 °C, durante 45 minutos. La actividad cinasa de Her-2 se determinó usando un método de fluorescencia en tiempo resuelto.

**La actividad de los compuestos de la presente invención:**

10

La actividad biológica de los compuestos de la presente invención se ensayó usando el ensayo que se ha descrito anteriormente. Los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon y se mostraron en la tabla que se indica a continuación:

Ejemplo n.º	CI <sub>50</sub> (Her-2/SK-BR-3) (μM)
1f	0,065
1	0,053
2	0,028
3	0,071
7	0,064
8	0,053
9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la presente invención)	0,046

Conclusión: El maleato y otras sales y la base libre de los compuestos de fórmula (I) tienen una actividad obvia para inhibir la actividad cinasa de Her-2.

15 **ENSAYO DE SOLUBILIDAD**

De acuerdo con la medición de la solubilidad convencional, la solubilidad del compuesto de fórmula (I) y sales del mismo se determinaron en tres sistemas diferentes: agua, solución salina fisiológica y ácido clorhídrico. Los resultados se mostraron en la tabla 1:

20

Tabla 1:

Ejemplo	Valor de solubilidad (mg/ml)		
	Solución salina fisiológica	Ácido clorhídrico 0,1 M	Agua
Ejemplo 1f	0,0026	1,43	0,008
Ejemplo 1	0,19	23,33	12,49
Ejemplo 2	0,36	54,88	1,52
Ejemplo 3	0,08	12,65	17,25
Ejemplo 7	0,10	31,93	5,39
Ejemplo 8	3,32	32,4	22,41
Ejemplo 9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la presente invención)	0,2	16,59	0,15

Conclusión: En comparación con la base libre y otras sales del compuesto de fórmula (I), la solubilidad del maleato del compuesto de fórmula (I) se ha mejorado significativamente.

**ENSAYO DE FARMACOCINÉTICA**

25 Ejemplo de ensayo 1 Ensayo de farmacocinética de los compuestos de la presente invención

1. Fin del ensayo

Se usaron ratas como animales de ensayo. El compuesto de fórmula (I) y otras sales del mismo, se administraron por vía intragástrica, la maleato del compuesto de fórmula (I) se inyectó en la vena de la cola para determinar la concentración del fármaco en el plasma en diferentes puntos de tiempo por el método de LC/MS/MS. La conducta farmacocinética, las características y la biodisponibilidad oral absoluta de los presentes compuestos se estudiaron y se evaluaron en ratas.

35 2. Protocolo

## 2.1 Muestras de ensayo

Compuesto ejemplar If, compuesto ejemplar 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 9. (El ejemplo 9 es un ejemplo de referencia, que no representa una parte de la invención).

## 2.2 Animales de ensayo

Se adquirieron 28 ratas SD adultas sanas, macho y hembra por igual, en SINO-BRITISH SIPPR/BK LAB. ANIMAL LTD., CO, Número de licencia: SCXK (Shangai) 2008-0016 y se dividieron en 7 grupos (4 ratas en cada grupo).

## 2.3 Equipos

Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum Ultra AM, Thermo Finnigan (Estados Unidos); sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200, Agilent (Estados Unidos).

## 2.4 Preparación de los compuestos de ensayo

El grupo de inyección intravenosa: La cantidad adecuada de compuestos se pesaron, se disolvieron en DMSO y se diluyeron con una solución salina normal hasta el volumen final. La concentración de muestra fue 2,5 mg/ml.

El grupo de administración intragástrica: La cantidad adecuada de compuestos se pesaron y se añadieron en CMC-Na al 0,5 % para preparar 2,5 mg/ml de suspensión.

## 2.5 Administración

32 ratas SD adultas sanas, macho y hembra por igual, se dividieron en 7 grupos (4 ratas en cada grupo). Después de un ayuno durante una noche, el compuesto ejemplar If, el compuesto ejemplar 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 9 a una dosis de 25 mg/kg (calculada por la parte base) y un volumen de 10 ml/kg se administran por vía intragástrica o se inyectaron en la vena de la cola.

## 2.6 Recogida de muestras

Para el grupo de inyección intravenosa, se tomaron muestras sanguíneas (0,2 ml) del seno orbital antes de la administración y 2 min, 15 min, 30 min, 1,0 h, 2,0 h, 4,0 h, 6,0 h, 8,0 h, 12,0 h, 24,0 h y 36,0 h después de la administración, se almacenaron en tubos heparinizados y se centrifugaron durante 10 minutos a 3.500 rpm para separar el plasma sanguíneo. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C.

Para el grupo de administración intragástrica, se tomaron muestras sanguíneas antes de la administración y 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0, 24,0 y 36,0 horas después de la administración. El método para tratar las muestras fue el mismo con el grupo de inyección intravenosa. Las ratas se alimentaron 2 horas después de la administración.

## 3. Proceso

Se añadieron 50 µl de plasma de rata en 50 µl de una serie de soluciones estándares respectivamente para obtener una concentración plasmática de 50,0, 100, 200, 500, 1000, 2000 y 5000 ng/ml, después los plasmas a diversas concentraciones se mezclaron con 50 µl de metanol durante 3 min usando un agitador vorticial y la mezcla se centrifugó durante 10 minutos (13500 rpm/min). Se analizaron 10 µl del sobrenadante por LC-MS/MS.

## 2.9 Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

### 4. Resultados de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de los compuestos de la presente invención se mostraron en la tabla 2.

55

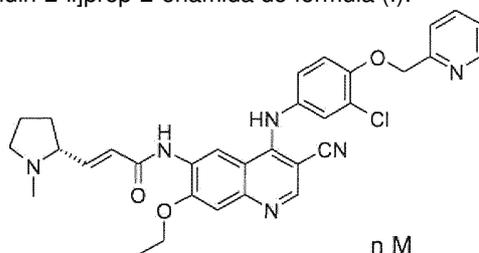
Tabla 2:

Compuesto	F (%)	C <sub>máx</sub> (µg/ml)	AUC <sub>0-t</sub> (µg·h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	MRT (h)	CL/F (ml/min/kg)	Vz/F (1/kg)
Ejemplo 1f	42,2	Sonda nasogástrica 6,47 ± 1,81	52,81 ± 23,59	3,4 ± 0,45	7,66 ± 0,75	0,53 ± 0,18	2,6 ± 0,94
		Vena	125,4 ± 38,95	5,25 ± 2,01	4,22 ± 0,71	0,21 ± 0,07	1,72 ± 1,1
Ejemplo 1	47,1	Sonda nasogástrica 8,99 ± 4,87	104,58 ± 56,54	4,4 ± 1,3	8,93 ± 1,39	0,31 ± 0,16	1,91 ± 1,24
		Vena	221,86 ± 76,99	4,92 ± 0,6	5,5 ± 0,99	0,12 ± 0,043	0,89 ± 0,39
Ejemplo 2	48,3	Sonda nasogástrica 10,19 ± 4,41	116,48 ± 67,23	4,45 ± 1,63	8,03 ± 0,99	0,29 ± 0,19	1,84 ± 1,19
		Vena	241,16 ± 92,12	3,74 ± 1,20	2,96 ± 0,47	0,48 ± 0,2	2,84 ± 1,88
Ejemplo 4	63,2	Sonda nasogástrica 6,92 ± 1,82	92,27 ± 36,97	3,67 ± 0,83	8,4 ± 0,65	0,32 ± 0,16	1,6 ± 0,54
		Vena	145,75 ± 40,35	3,77 ± 0,22	5,46 ± 0,48	0,18 ± 0,04	0,99 ± 0,26
Ejemplo 5	72,1	Sonda nasogástrica 7,88 ± 2,51	81,53 ± 40,46	3,46 ± 0,56	7,95 ± 0,61	0,38 ± 0,19	1,81 ± 0,84
		Vena	112,84 ± 62,1	3,12 ± 0,37	4,2 ± 0,99	0,3 ± 0,22	1,33 ± 0,88
Ejemplo 6	50,5	Sonda nasogástrica 6,27 ± 1,58	81,72 ± 22,16	4,15 ± 0,09	8,59 ± 0,22	0,32 ± 0,09	1,95 ± 0,57
		Vena	162,28 ± 55,65	5,27 ± 0,29	4,94 ± 0,58	0,17 ± 0,04	1,25 ± 0,31
Ejemplo 7	39,2	Sonda nasogástrica 5,16 ± 1,64	44,34 ± 16,01	3,52 ± 0,69	7,9 ± 0,74	0,63 ± 0,27	3,23 ± 1,65
		Vena	112,84 ± 62,1	3,12 ± 0,37	4,2 ± 0,99	0,3 ± 0,22	1,33 ± 0,88
Ejemplo 9 (Ejemplo de Referencia, no forma parte de la presente invención)	57,6	Sonda nasogástrica 5,87 ± 1,61	66,12 ± 17,17	3,47 ± 0,18	7,96 ± 0,7	0,4 ± 0,12	1,99 ± 0,49
		Vena	115,15 ± 33,06	4,75 ± 0,32	5,54 ± 0,58	0,23 ± 0,06	1,58 ± 0,46

Conclusión: En comparación con la base libre y otras sales del compuesto de fórmula (I), el maleato del compuesto de fórmula (I) tiene una mejora significativa en las características farmacocinéticas y la biodisponibilidad, y tiene una ventaja farmacocinética obvia.

## REIVINDICACIONES

1. Una sal farmacéuticamente aceptable de (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida de fórmula (I):



5

(I)

en la que: n es 1, 2 o 3; y

M es una molécula de ácido; y

10 en la que dicha sal es una sal orgánica seleccionada entre el grupo que consiste en p-toluenosulfonato, metanosulfonato, maleato, succinato y L-malato.

2. La sal de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha sal es maleato.

3. La sal de acuerdo con la reivindicación 2, en la que n es 2.

15

4. Un proceso de preparación de la sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de hacer reaccionar (*E*)-N-[4-[[3-cloro-4-(2-piridilmetoxi)fenil]amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolil]-3-[(2R)-1-metilpirrolidin-2-il]prop-2-enamida con un ácido correspondiente para formar la sal.

20 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho ácido es un ácido orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, ácido succínico y ácido L-málico.

6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Un proceso de preparación de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una etapa de combinar la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las

30

8. Un uso de la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con proteína cinasas, en el que dichas proteína cinasas se seleccionan

35

9. Un uso de la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón,

40

cáncer de mama, carcinoma de célula escamosas y cáncer de estómago.