

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 159**

51 Int. Cl.:

C07D 239/94 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008 E 15199926 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 3012251**

54 Título: **Proceso para la preparación de derivados de 6,7-dialcoxi-quinazolina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2017

73 Titular/es:

**NATCO PHARMA LIMITED (100.0%)
"Natco House" Road No. 2 Banjara Hills
Hyderabad, Andhra Pradesh 500033, IN**

72 Inventor/es:

**JYOTHI PRASAD, RAMANADHAM;
ADIBHATLA KALI SATYA, BHUJANGA, RAO;
NAGESHWARA RAO, BOLLEPALLI y
VENKAI AH CHOWDARY, NANNAPANENI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 642 159 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

Proceso para la preparación de derivados de 6,7-dialcoxi-quinazolina

5 La invención se refiere a procesos para la producción de derivados de 6,7-dialcoxi quinazolina, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que poseen actividad anticáncer y por lo tanto son útiles en métodos de tratamiento en seres humanos.

10 La mayoría de los regímenes de tratamiento del pasado para enfermedades de proliferación celular tales como psoriasis y cáncer utilizan compuestos que inhiben la síntesis del ADN. Tales compuestos son tóxicos para las células y sus efectos beneficiosos se pueden obtener solamente cuando muestran selectividad para células tumorales de división rápida.

15 En los últimos años, se ha descubierto que una célula may puede llegar a ser cancerosa en virtud de la transformación de una parte de su ADN en un oncogén, es decir, un gen que, cuando se activa, conduce a la formación de células tumorales malignas (Bradshas, Mutagenesis, 1986, 1: 91). Varios oncogenes codifican enzimas de tirosina quinasa y esos ciertos factores rectores de factor de crecimiento también son enzimas tirosina quinasa (Larsen *et al.*, Ann. Reports in Med. Chem.1989, Capítulo 13).

20 Las tirosinas quinasas receptoras son importantes en la transmisión de señales bioquímicas que inician la replicación celular. Poseen un dominio de unión extracelular para factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico y una parte intracelular que funciona como una quinasa para fosforilar aminoácidos tirosina en proteínas y por lo tanto para influir en la proliferación celular. También se sabe que tales quinasas presentes frecuentemente en cánceres humanos comunes tales como cáncer de mama (Saimbury *et al.*, Brit. J. Cancer, 1988, 58: 458), cánceres gastrointestinales tales como cánceres de colon, rectal y estómago (Bolen *et al.*, Oncogene Res., 1987,1: 149). Se ha descubierto que la actividad de Tirosina Quinasa (actividad de TK) se puede detectar más frecuentemente en células malignas que en células normales (Hunter, Cell, 1987, 50: 823).

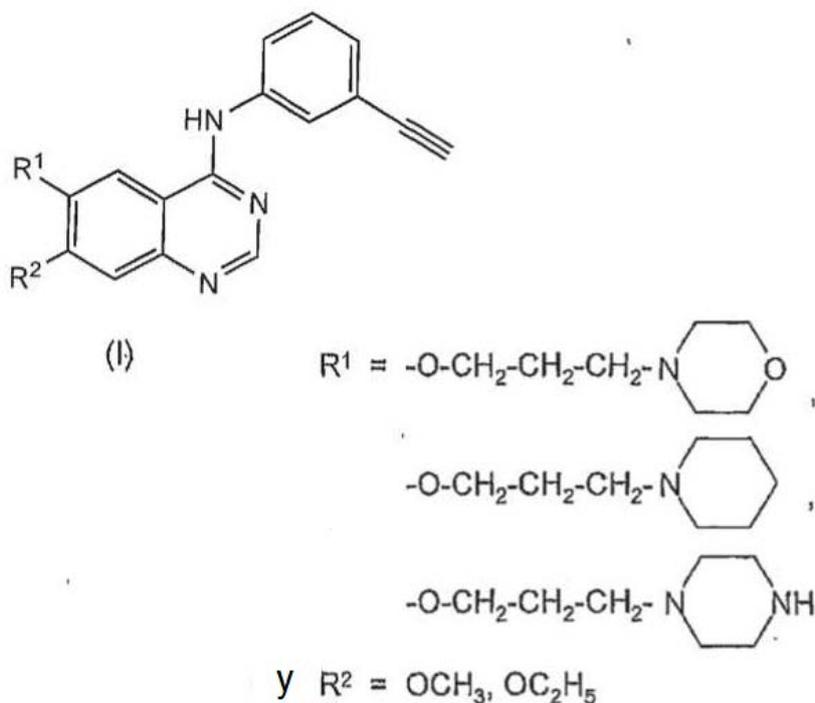
30 Más recientemente, se ha mostrado que el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) que posee actividad de TK está sobre expresado en muchos cánceres humanos tales como cánceres de cerebro, células escamosas de pulmón, vejiga, gástrico, mama, cabeza y cuello, esófago, tiroides y similares. (W.J. Gullick, Brit. Med. Bull. 1991; 47: 87). El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), un miembro de la familia de Tirosina Quinasa Receptora (RTK) comprende cuatro receptores, Erb1/HER1, Erb/HER2, Erb/HER3 y Erb/HER4.

35 Una estrategia importante para inhibir la actividad de EGFR-TK ha sido el aprovechamiento de moléculas sintéticas pequeñas (Arteaga CL, Exp. Cell Res., 2003, 284: 122-130). Ciertos derivados de quinazolina tales como gefitinib (Iressa TM, Astra Zeneca), erlotinib (OSI-774, TarcevaTM), PD-183805, PKI-166, EKB-569, PD-168393, CGP-59362 sen investigado ampliamente para posibles opciones de tratamiento para varias formas de cáncer (Baselga *et al.*, Oncology 2002,63: 6-16, Cohen RB., Clin. Colorectal Cancer, 2003,2: 246-251). Las solicitudes de patente europea, en particular EP 0566226, EP0602851A1, EP 0635507 A1, EP 0635498 A1, EO 0520722 A1 desvelaban ciertos derivados de quinazolina que poseen propiedades anticáncer como resultado de su propiedad inhibitoria de TK.

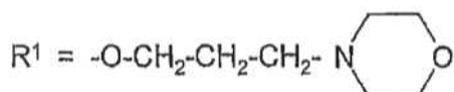
45 Los documentos de Patente de Estados Unidos n.^{os} US 5475001, US 5457105, US 5616582, US 5770599, US 5747498, US 6900221 etc. se refieren a derivados de quinazolina con características estructurales tales como un resto de anilino sustituido en la posición 4 y una diversidad de grupos alquilo funcionalizados en las posiciones 6 y 7 del núcleo de quinazolina.

50 De forma específica, los documentos de Patente de Estados Unidos n.^{os} US 5457105, US 5616582 se refieren a N-(3-Cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina (Gefitinib) y los documentos de Patente de Estados Unidos n.^{os} US 5747498 y US 690221 se refieren a N-(3-Etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina (Erlotinib). Los documentos WO 20005/070909, WO 2007/060691 A2 y WO 06/090413 se refieren a variaciones en la síntesis o formas polimórficas de estos dos fármacos anticáncer populares.

55 En vista del gran potencial que ofrece dicha clase de compuestos de quinazolina, los inventores comenzaron la síntesis y la identificación sistemática de un gran número de nuevas entidades químicas con nuevas características estructurales. De forma sorprendente e inesperada se ha encontrado que quinazolininas que tienen un grupo 3-etinil anilina en la posición 4 y grupos alcoxi específicamente sustituidos en las posiciones 6 y 7, otorgan propiedades mucho más mejoradas y antiproliferativas especiales en comparación con otros miembros importantes del tipo de fármaco de la quinazolina. Sorprendentemente, asimismo, los compuestos de esta invención son mucho menos tóxicos y el perfil de seguridad es extremadamente beneficioso para aplicaciones terapéuticas. Las nuevas entidades químicas descritas están designadas por la estructura general (I) y no se han sintetizado previamente ni se han investigado en cuanto a sus beneficios terapéuticos y perfil de seguridad.



El compuesto (I) es NRC-2694 cuando



5

y $R^2 = OCH_3$. La sal de mono HCl de NRC-2694 es NRC-2694 A. La sal de diHCl de NRC-2694 es NRC-2694 B. Los componentes novedosos de esta invención, especialmente NRC-2694, tienen propiedades anticáncer/antiproliferativas superiores inesperadas y ofrecen beneficios terapéuticos adicionales en comparación con fármacos importantes de esta clase, como se detalla a continuación:

10

1) **Concentración inhibitoria menor:** La concentración inhibitoria (CI_{50}) en el método de ensayo de proliferación de MTT indicaba un valor en el intervalo de 40-90 ng/ml (100-200 nm) mientras que el HCl de erlotinib tiene un valor de 836 ng/ml (1945 nm). Lo mismo se ha confirmado mediante análisis de transferencia de Western y ensayo de invasión de Matrigel.

15

2) **Regresión tumoral completa:** La regresión tumoral completa se observó mediante administración oral de los compuestos en ratones atímicos implantados con células de tumores de pulmón humano, A549, a 10 mg/kg de dosis. En el estudio comparativo, incluso a la dosis de 100 mg/kg, el HCl de erlotinib no podía inducir una regresión tumoral completa. El examen visual del tejido pulmonar del ratón implantado con A549 y los experimentos de expresión de luciferasa confirmaron las mismas observaciones.

20

3) **Eficacia del fármaco:** La evaluación de la dosis eficaz indicaba un valor (DE_{50}) de 6,3 mg/kg para un compuesto habitual de la presente invención es decir, NRC-2694, mientras que el valor obtenido con el HCl de erlotinib era 22 mg/kg.

25

Un efecto curativo de un 100 % se ha observado con NRC-2694 con respecto a un 50-60 % solo en el caso del HCl de erlotinib.

4) **Indicaciones únicas adicionales:** Los compuestos de la presente invención, por lo general NRC-2694, presentaban indicaciones adicionales como la regulación negativa de los niveles de expresión de los receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4 y VEGFR. Este resultado especial, muy importante y sorprendente es totalmente inesperado y no se observó en absoluto con el HCl de erlotinib.

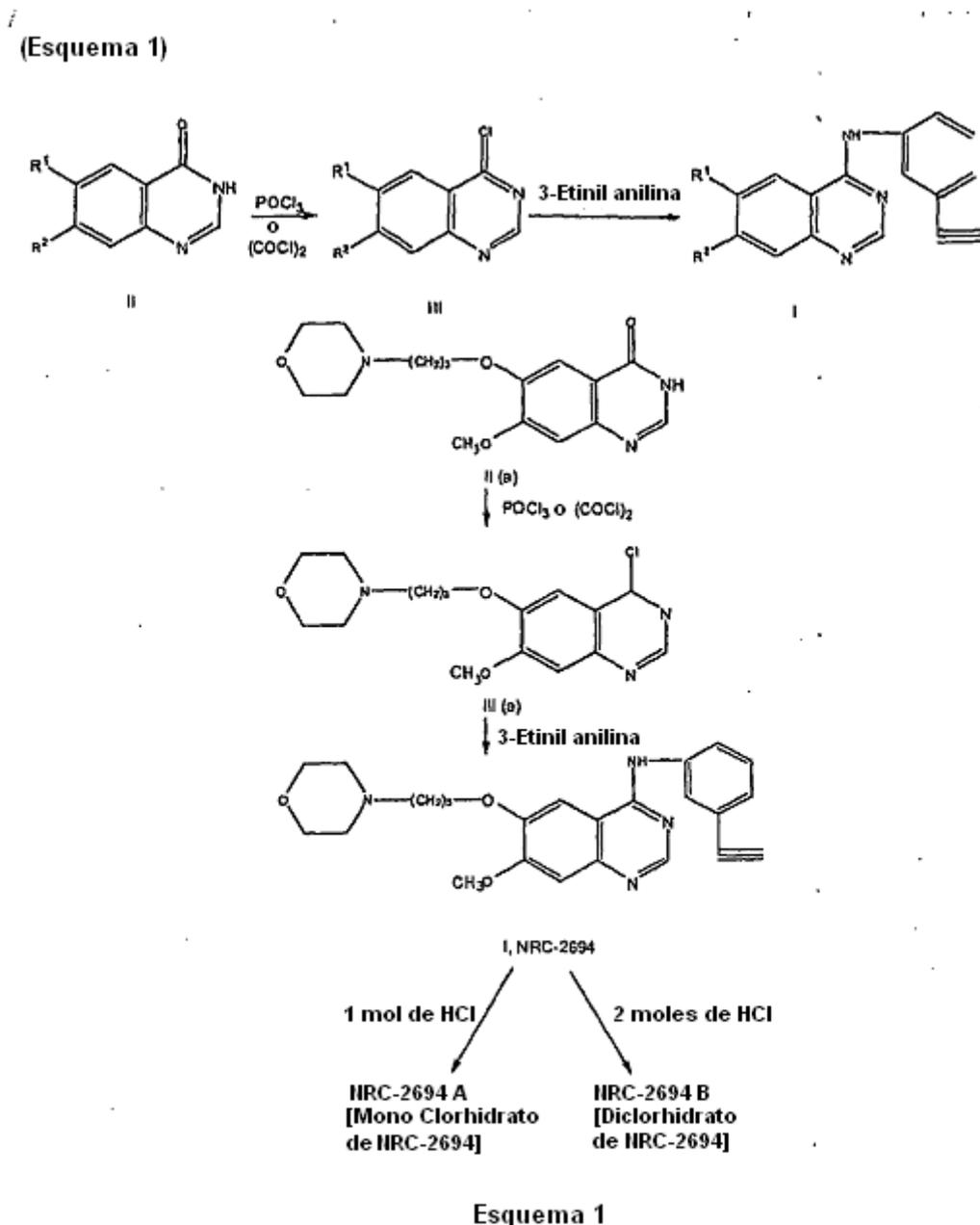
30

5) Perfil de seguridad: El perfil de seguridad de los compuestos de la presente invención, por lo general NRC-2694, es bastante prometedor y inesperadamente amplio y extremadamente beneficioso. Por lo tanto, NRC-2694 presentaba una Dosis Tolerada Máxima (MTD) de 500 mg/kg con respecto a 2000 mg/kg para el HCl de erlotinib.

35

La amplia ventana terapéutica ofrecida por NRC-2694 se demostró mediante su valor de DL_0 de 2000 mg/kg con respecto a 500 mg/kg para el HCl de erlotinib. El valor de DL_{50} no se pudo precisar para NRC-2694, mientras que un valor de 805 mg/kg se determinó para el HCl de erlotinib.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con el fin de ilustrar el proceso de preparación de compuestos de la presente invención y su eficacia biológica superior y, por lo tanto, no debería considerarse que limitan el ámbito o el espíritu de la invención. (Esquema 1)



5

Ejemplo - 1

Preparación de N-(3-etilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina (I, NRC-2694)

10

i) Preparación de 4-Cloro-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolina (IIIa)

15

En un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 litros limpio y seco equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo, embudo de adición para igualar la presión, y toma para termómetro se cargaron cloroformo (3000 ml), dimetilformamida (30 ml) seguido de 7-metoxi-6-(3-morfolino propoxi)-3,4-dihidro-quinazolin-4-ona (IIa) (150 g), obtenida de acuerdo con el método dado en el Ejemplo 1 de la solicitud internacional de PCT publicada como WO.2005/070909A1. Se añadió cloruro de oxalilo (120 g) lentamente y la masa de reacción se calentó a temperatura de reflujo y se mantuvo a temperatura de reflujo durante aproximadamente 5 horas. Se encontró que la reacción se había completado mediante ensayo de HPLC. El disolvente cloroformo y el exceso de cloruro de oxalilo

se retiraron por destilación mediante la aplicación de un vacío suave. La masa de reacción se enfrió a aproximadamente 40 °C y se añadió cloroformo (300 ml) y de nuevo se destiló el disolvente mediante aplicación de vacío suave. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió acetonitrilo (3000 ml) y se agitó durante 10-15 minutos y se mantuvo en atmósfera de nitrógeno para evolucionar a la etapa siguiente.

ii) Preparación de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina (I, NRC-2694)

En un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 litros equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo y toma para termómetro que contiene el compuesto de cloro en acetonitrilo de la etapa anterior (i); se añadió 3-etinil anilina (69 g) lentamente en aproximadamente 10-15 minutos y la masa de reacción se calentó a temperatura de reflujo y se mantuvo a temperatura de reflujo durante aproximadamente 4 h. Se encontró que la reacción se había completado mediante ensayo de HPLC. A continuación, la masa de reacción se enfrió a 25-35 °C y se filtró, la torta se lavó con acetonitrilo (500 ml) y la torta se secó.

El compuesto en bruto seco mencionado anteriormente se recogió en otro matraz de fondo redondo de 5 litros y se cargó con agua (2500 ml) y lentamente la temperatura se elevó a 60-65 °C y el pH de la masa de reacción se ajustó a 10-12 con solución diluida de hidróxido sódico. El producto sólido separado se filtró y se lavó con agua y se secó a 70-75 °C para obtener 173,0 g de N-(3-etinilfenil)-6-(3-morfolina propoxi)-7-metoxi-4-quinazolinamina en forma de un sólido de color blanquecino.

iii) Recristalización de la Preparación de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina a partir de Tolueno.

En un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 litros equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo y toma para termómetro se cargaron tolueno (3750 ml), seguido de N-(3-etinilfenil)-6-(3-morfolino propoxi)-7-metoxi-4-quinazolinamina (50 g) obtenida con el método descrito en el ejemplo (1) dado anteriormente. La mezcla de reacción se calentó a 90-95 °C, de modo que el sólido se disolvió completamente. A continuación se dio un tratamiento con carbono y se filtró. El filtrado se enfrió a 25-35 °C, mantenida durante aproximadamente 1 hora y el material se filtró y se secó para obtener 40,15 g de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina en forma de un sólido cristalino de color blanco.

pf: 185-187 °C

Pureza: 99,72 % (HPLC)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3280,9, 2954,6, 2810,3, 1620,1, 1604,2, 1572,1, 1527,7, 1505,2, 1484,1430,5, 1388,2, 1247,5, 1211,2, 1140,3, 1110,4, 1010,3, 953,4, 859,6, 784,2 Cm^{-1} RMN ^1H

(300 MHz; DMSO- d_6): 9,57 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,99 (s, 1H); 7,86 to 7,92 (d, 2H); 7,34 a 7,44 (t, 1H) 7,18 a 7,21 (s, 2H); 4,15 a 4,21 (t, 4H); 3,92 (s, 3H) 3,5

a 3,6 (t, 4H); 2,4 a 2,52 (m, 5H); 1,95 a 2,01 (m, 2H).

Masa: 419,4 (M + 1)

Ejemplo - 2

Recristalización de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina a partir de acetonitrilo

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de dos litros equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo y toma para termómetro se cargaron acetonitrilo (1000 ml), seguido de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina (25 g) obtenida a partir del método que se describe en el Ejemplo (1) dado anteriormente. La masa de reacción se calentó lentamente a 65-70 °C, de modo que el material sólido se disolvió completamente y se dio un tratamiento con carbono y la masa de reacción se filtró. El filtrado se transfirió a otro matraz de fondo redondo y se enfrió lentamente a 10-15 °C y se mantuvo durante 30 minutos a esa temperatura. La masa se filtró y después de lavar la torta con acetonitrilo frío, esta se secó para obtener 20,50 g de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina en forma de un sólido cristalino de color blanco.

pf: 186-187 °C

Pureza: 99,68 % (HPLC)

Ejemplo - 3

Recristalización de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina a partir de acetato de etilo.

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de tres litros equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo y toma para termómetro se cargaron acetato de etilo (2000 ml), seguido de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina (25 g) obtenida a partir del método que se describe en el Ejemplo - (1). La masa de reacción se calentó lentamente a 65-70 °C, de modo que el material sólido se disolvió completamente y se dio un tratamiento con carbono y la masa de reacción se filtró. El filtrado se transfirió a otro matraz de fondo redondo y se enfrió lentamente a 10-15 °C y se mantuvo durante 30 minutos a esa temperatura. La masa cristalina se filtró y

después de lavar la torta con acetato de etilo frío, esta se secó para obtener 20,95 g de N-(3-etinilfenil)-6-(3-morfolino propoxi)-7-metoxi-4-quinazolinamina en forma de un sólido cristalino de color blanco.

pf: 185-187 °C

Pureza: 99,7 % (HPLC)

5

Ejemplo - 4

Preparación de mono clorhidrato de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina. (NRC-2694A)

10

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo, toma para termómetro etc., se cargó alcohol isopropílico (250 ml), seguido de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinilo)propoxi]-4-quinazolinamina (5 g), obtenida a partir del método dado en el Ejemplo - 1. La temperatura de la masa de reacción se elevó a 65-70 °C de modo que todo el material sólido se disuelve y se dio un tratamiento con carbono y se filtró. El filtrado se enfrió de aproximadamente 55 °C a 60 °C y a esto se añadió un equivalente molar de HCl gaseoso disuelto en una solución de alcohol isopropílico momento en el que la sal de mono clorhidrato se separó. La masa de reacción se mantuvo a temperatura de reflujo durante aproximadamente 2 horas y a continuación se enfrió a temperatura ambiente y se filtró y se secó para obtener 5,1 g de mono clorhidrato de N-(3-etinilfenil)-6-(3-morfolino propoxi)-7-metoxi-4-quinazolinamina en forma de una sustancia cristalina de color blanco.

15

20

Pureza: 99,8 % (HPLC)

Contenido de HCl (químico): 8,19 % (Valor teórico : 8,01 %)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3407, 3305, 3259,5, 2934, 2619, 1625,9, 1593,8, 1579,9, 1530,8, 1512,

1476,9, 1392,2, 1356,8, 1282,1, 1242,1, 1207,9, 1141,3, 1100,8, 1076,1, 1042,1, 1026,5, 1011,5, 957,7, 941,5, 922,1, 857,3, 852, 838,1, 796, 782,4.

25

Ejemplo - 5

Preparación de diclorhidrato de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina (NRC-2694B)

30

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo y toma para termómetro se cargó alcohol isopropílico (250 ml), seguido de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinilo)propoxi]-4-quinazolinamina (5 g), obtenida a partir del método dado en el Ejemplo - 1. La temperatura de la masa de reacción se elevó a 65-70 °C de modo que todo el material sólido se disuelve. Se dio un tratamiento con carbono y se filtró. El filtrado se enfrió de aproximadamente 55 °C a 60 °C y a esto se añadieron dos equivalentes molares de HCl gaseoso disuelto en una solución de alcohol isopropílico momento en el que la sal de diclorhidrato se separó. La masa de reacción se mantuvo a temperatura de reflujo durante aproximadamente 2 horas y a continuación se enfrió a temperatura ambiente y se filtró y se secó para obtener 5,5 g de diclorhidrato de N-(3-etinilfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina en forma de una sustancia cristalina de color blanco.

35

40

Pureza: 99,78 % (HPLC)

Contenido de HCl

(químico): 14,9 % (Valor teórico: 14,83 %)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3406,8, 3194,1, 2942,7, 2681,9, 2623,6, 1633,7, 1566,2, 1528,6, 1512,5, 1438,6, 1359,6, 1282,3,

45

1075,6, 1001,9, 942,1, 875,3, 816,1, 787,2.

Ejemplo - 6

Evaluación de la Dosis Tolerada Máxima (MTD) y de la toxicidad aguda (Tablas 1 y 2):

50

El estudio de cita temprana de MTD se realizó en ratones Swiss Albino macho y hembra (con un peso de 20-25 g).

El estudio se realizó de acuerdo con la regla 420 de las directrices de OECD, el estudio se realizó entre las 9 am y las 5 pm para evitar el ciclo circadiano, los compuestos Erlotinib y NRC-2694 se suspendieron con un 2 % de goma arábica, los compuestos se administraron en dosis de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg (po) por vía oral. Las dosis intermedias se administraron dependiendo de la mortalidad. Los animales se observaron para cambios de comportamiento importantes cada hora hasta seis horas después de la administración del fármaco. Los animales se observaron adicionalmente hasta 72 horas para mortalidad si la hubiera. Los animales que sobreviven se someten a autopsia para afirmar la absorción del compuesto a través de g.i.t.

55

60

La toxicidad aguda de Erlotinib y NRC-2694 se realizó en ratones macho y hembra. Las dosis 500, 750, 1000 y 2000 mg/kg se administraron por vía oral. Cada grupo consta de 5 ratones. Los animales se observaron para mortalidad durante 14 días después de la administración del compuesto. Los animales que sobreviven se someten a autopsia para afirmar la absorción del compuesto a través de g.i.t.

65

La DL₅₀ se determinó usando Litchfield y Wilcoxon (J. Pharmacol. Exp. Ther. 1949, 96: 99-113).

Los resultados de los estudios de toxicidad se tabulan en las Tablas - 1 y 2. Se encontró que la Dosis Tolerada

Máxima (MTD) del HCl de erlotinib era de 500 mg/kg (po) mientras que para NRC-2694, es de 2000 mg/kg (po). De forma análoga, se encontró que la DL₀ era de 500 mg/kg (po) para el HCl de erlotinib y de 2000 mg/kg (po) para NRC-2694. Por lo tanto, se ha establecido la toxicidad inesperada y sorprendentemente baja y el perfil de seguridad de NRC-2694 con respecto al HCl de erlotinib.

5

Tabla - 1

<u>Estudio comparativo (mtd) de cita temprana de HCl de erlotinib y NRC-2694 (ratones)</u>	
Compuesto	MTD mg/kg (po)
HCl de Erlotinib	500
NRC2694	2000

Tabla 2

<u>Estudios de DL₅₀ aguda (observación 7 días una sola dosis) en ratones</u>		
Compuesto	DL ₀ mg/kg (po)*	DL ₅₀ mg/kg (po)
HCl de Erlotinib	500	805
NRC2694	2000	-
*DL ₀ : No se observó mortalidad al final de 7 días.		

Ejemplo - 7**Estudios de evaluación *in vitro* e *in vivo* y evaluación de la eficacia terapéutica**

Muestras: Erlotinib se usó como un fármaco de referencia de control, la actividad biológica de los nuevos compuestos de la presente invención se sometió a ensayo en comparación con este fármaco como control positivo.

15

i) Ensayo de proliferación de MTT

20

25

El ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], descrito primero por Mosmann en 1983, se basa en la capacidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de células viables para escindir los anillos de tetrazolio del MTT de color amarillo pálido y formar cristales de formazán de color azul oscuro en gran medida impermeables para las membranas celulares, dando como resultado de este modo su acumulación dentro de las células sanas. La solubilización de las células mediante la adición de un detergente da como resultado la liberación de los cristales, que se solubiliza. El número de células supervivientes es directamente proporcional al nivel del producto de formazán creado. El color se puede cuantificar a continuación usando un ensayo colorímetro sencillo. Este ensayo se realizó usando concentraciones de 0-1000 ng/ml de Erlotinib y los compuestos de ensayo en células A549 y H1299. El protocolo se basó en la ATCC y de acuerdo con las instrucciones del fabricante (n.º de Catálogo: 30-1010K).

30

A partir del ensayo de proliferación de MTT, se determinó que la concentración de inhibición (CI₅₀) de los compuestos de la invención variaba de 40-90 ng/ml (100-200 nm) mientras que el 'clorhidrato de Erlotinib' usado como un control positivo tiene un valor tan elevado como 836 ng/ml (1945 nm). Por lo tanto, se obtiene que los nuevos compuestos de la presente invención son al menos 10 veces más potentes que el clorhidrato de erlotinib.

35

ii) Análisis de transferencia de Western: (Figura - 1)

40

Las concentraciones ideales del fármaco determinadas a partir del ensayo de proliferación de MTT se usaron para tratar 1×10^6 células H1299 o A549 en medios apropiados durante 72 h tras lo cual los lisados celulares se extrajeron y se fraccionaron en un gel de SDS PAGE al 10 % en condiciones reductoras. Los geles se transfirieron en membranas de nailon tratadas (Biorad) y se sometieron a inmunosondeo para EGFR, P13K y AKT.

45

Se observa un cambio significativo en la expresión de EGFR de una manera dependiente de la dosis. NRC-2694 a concentraciones de 80 ng (190 nm) causaba una inhibición comparable de la expresión de EGFR con el HCl de erlotinib a concentraciones de 800 ng (1860 nm). Por lo tanto, el nivel de eficacia de diez veces de NRC-2694 es evidente.

iii) Ensayo de invasión de Matrigel: (Figura - 2)

La capacidad de invasión *in vitro* de las células H1299 y A549 en presencia de diversas concentraciones de compuestos de NRC (como se determina con el ensayo de MTT) se evaluó usando un ensayo de cámara de Boyden modificada. Las células se trataron con estos compuestos durante 48 h. Se suspendieron 1×10^6 células en 600 μ l de medio sin suero suplementado con un 0,2 % de BSA y se colocaron en el compartimento superior de las cámaras transpocillos (n.º de cat 07-200-158 de Coming Costar Fisher Scientific, Pittsburgh PA) revestidas con Matrigel (0,7 mg/ml). El compartimento inferior de la cámara se llenó con 200 μ l de medio de suero y se permitió que las células migraran durante 24 h después del periodo de incubación, las células se fijaron y se tiñeron con Hema-3 y se cuantificaron como se ha descrito anteriormente (Mohanam *et al.*, 1993). Las células migradas se cuantificaron como porcentaje de invasión. El compuesto NRC-2694 presenta una disminución significativa de la invasión de una manera dependiente de la dosis.

iv) Evaluación *in vivo* en tumores de pulmón subcutáneo en ratones atímicos (Figura - 3)

A los ratones atímicos se les implantaron 2×10^6 células A549 en el costado de la pata trasera derecha. Después de la observación de un tumor (> 2 mm), a los ratones les administraron tratamientos oral o ip de los compuestos de ensayo incluyendo el HCl de erlotinib usado como un control positivo. Una dosis de 100 mg/kg del HCl de erlotinib se identificó como la dosis del valor inicial.

Los tamaños del tumor se midieron y se observó la regresión completa de los tumores en los ratones tratados con NRC-2694 a una dosis de 10 mg/kg. Sin embargo, los tumores todavía estaban presentes en el grupo de control tratado del mismo modo con el HCl de erlotinib incluso a un nivel de dosis de 100 mg/kg. Por lo tanto, se ha establecido una superioridad de diez veces en la eficacia del compuesto de la presente invención (NRC-2694).

v) Evaluación del tejido de pulmón obtenido de ratones atímicos después de tratamiento: (Figura - 4)

Los pulmones obtenidos de ratones atímicos implantados con células A549 que expresan luciferasa tratadas con diversas concentraciones del HCl de erlotinib y NRC-2694 mediante las vías oral/ip se examinaron para tumores residuales.

La regresión completa de los tumores se observó en el grupo de tratamiento con NRC-2694, mientras que los tumores todavía estaban presentes en el grupo tratado con el HCl de erlotinib, estableciendo de este modo la eficacia superior sorprendentemente inesperada de los compuestos de la presente invención.

vi) Examen mediante visualización de tumores en tejido de pulmón: (Figura - 5)

A los ratones atímicos se les implantaron células A549 mediante inyecciones intrapulmonares. Los ratones se trataron mediante las vías oral/ip con el HCl de erlotinib y NRC 2694 a dosis de 2,5 y 20 mg/kg. Treinta días después de los tratamientos diarios con el fármaco, los ratones se sacrificaron y los pulmones se extrajeron. Los tejidos de pulmón se fijaron en un 10 % de formaldehído tamponado, se embebieron en parafina y se seccionaron. Las secciones se tiñeron con H&E de acuerdo con los protocolos reglamentarios para visualizar tumores sólidos o difusos.

El grupo tratado con NRC 2694 funcionó mucho mejor que los tratados con el HCl de erlotinib a todos los niveles de dosis estableciendo de este modo la eficacia superior de NRC 2694.

vii) Ratones Atímicos implantados con células A549 que expresan luciferasa: (Figuras 6 y 7)

Los ratones atímicos implantados con células A549 que expresan luciferasa tratadas con diversas concentraciones del HCl de erlotinib y NRC 2694 mediante las vías oral e ip se observaron para tumores y las observaciones visuales se proporcionan como la Figura 6 y la Figura 7. Se observó que el grupo tratado con NRC 2694 funcionaba mucho mejor que el grupo tratado con el HCl de erlotinib. No se observaron tumores al final del tratamiento de 42 días con NRC 2694 mientras que los tumores residuales todavía estaban presentes en el grupo tratado con el HCl de erlotinib con las vías tanto oral como ip.

viii) Efecto curativo a partir de estudios *in vivo* en ratones atímicos

El efecto curativo como una proporción del número de animales curados con respecto al número de animales usados en el estudio se tabula y se presenta en Tabla 3.

Tabla - 3: Efecto curativo de NRC-2694 y HCl de erlotinib en cáncer de pulmón

Fármacos	Concentración mg/kg	Proporción de cura
Erlotinib IP	2,5	1/5
	5	2/5
	10	2/5
	20	3/5
Erlotinib oral	2,5	2/5
	5	0/5
	10	1/5
	20	2/5
NRC 2694 IP	2,5	1/5
	5	1/5
	10	3/5
	20	5/5 (100 %)
NRC 2694 oral	2,5	1/5
	5	2/5
	10	3/5
	20	3/5

Se puede observar que la proporción es cercana a un 100 % en el caso de NRC 2694 mientras que la proporción está entre un 40 - 60 % en el caso del grupo de estudio con HCl de erlotinib.

5

ix) Evaluación de DE₅₀

Los valores de DE₅₀ se evaluaron basándose en la sección de pulmón y estudios de regresión tumoral. Un valor de 6,3 mg/kg se calculó para NRC 2694 mientras que el valor obtenido para el HCl de erlotinib fue de 22 mg/kg mediante la vía oral. Por lo tanto, se establece la eficacia superior del compuesto de la presente invención.

10

x) Estudio con otros receptores tales como HER-1, HER-2, HER-3, HER-4 y VEGFR *in vitro* (Figura - 8)

Para determinar el efecto de NRC 2694 en los otros diversos receptores de la familia de EGFR (Erb/HER), las células A549 de cáncer de pulmón Newman se trataron con diversas concentraciones de NRC 2694 junto con HCl de erlotinib para una comparación de uno al lado del otro. Los niveles de Erb-1, Erb-2, Erb-3, Erb-4 y VEGFR se determinaron mediante análisis de transferencia de Western.

15

Se observó que NRC 2694 regulaba de forma negativa los niveles de Erb B2, Erb B3, Erb B4 y VEGFR de forma eficaz mientras que no se observaba indicación de este tipo con el HCl de erlotinib. La indicación inhibitoria adicional en los niveles de expresión de los receptores mencionados anteriormente demuestra claramente la propiedad inesperada y sorprendente de la molécula principal de la presente invención, es decir, NRC 2694.

20

xi) Conclusión:

Las propiedades antitumorales inesperadas, sorprendentes y superiores y el potencial terapéutico adicional del compuesto de la presente invención se establecen de este modo los experimentos mencionados anteriormente en comparación con el HCl de erlotinib.

25

Ejemplo - 8

La siguiente es una forma de dosificación farmacéutica representativa ilustrativa que contiene el compuesto de fórmula NRC-2694 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso terapéutico o profiláctico en seres humanos.

30

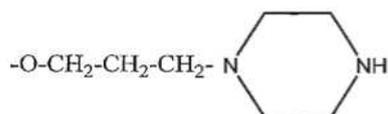
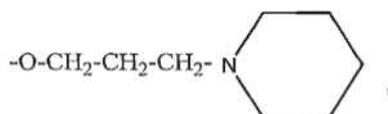
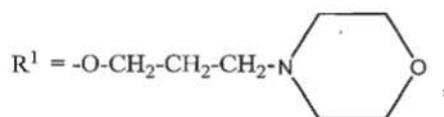
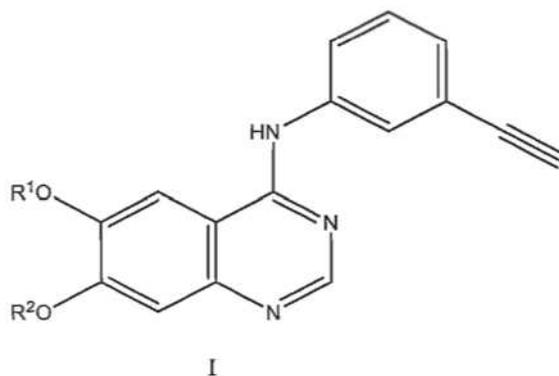
35

ES 2 642 159 T3

Comprimido	mg/comprimido
Compuesto NRC-2694	50
Lactosa anhidra (USP)	156
Celulosa microcristalina (Avicel pH102)	15
Lauril sulfato sódico	5
Glicolato de almidón sódico	10
Povidona K-30	3
Hidroxi propil celulosa (LH-11)	10
Estearato de magnesio	1

REIVINDICACIONES

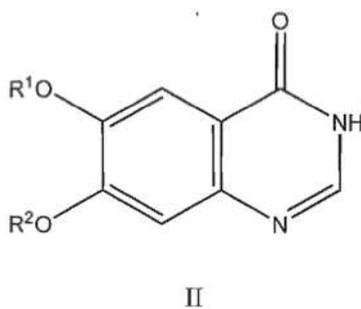
1. Un proceso para la preparación de un derivado de quinazolina de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



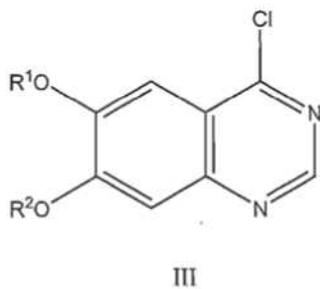
5

y $R^2 = -OCH_3, -OC_2H_5,$
proceso que comprende:

10 a) hacer reaccionar la quinazolina de fórmula (II)



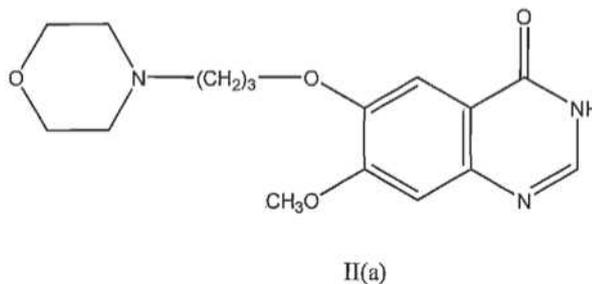
con cloruro de fosforilo o cloruro de oxalilo para obtener la 4-cloroquinazolina de fórmula (III)



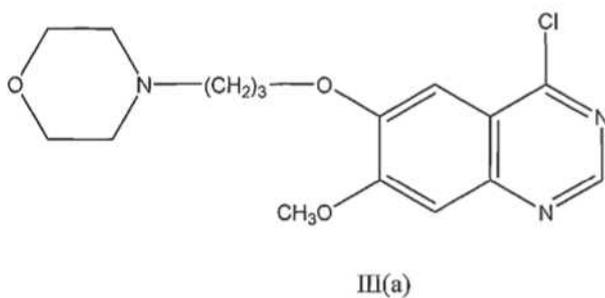
5 y
b) hacer reaccionar la 4-cloroquinazolina de fórmula (III) con 3-etil anilina para obtener el derivado de quinazolina de fórmula (I).

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, proceso que comprende:

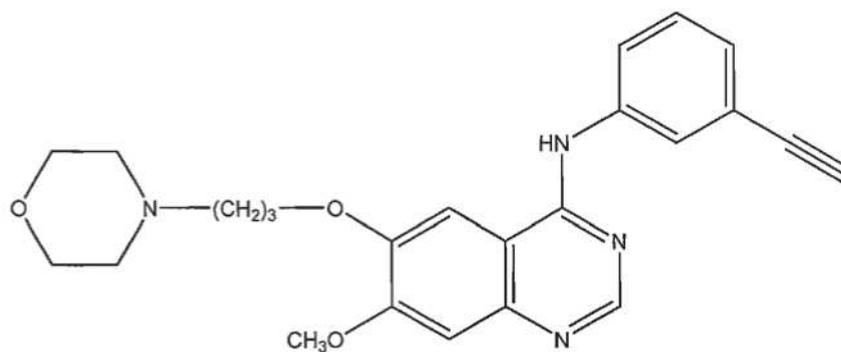
10 a) hacer reaccionar la quinazolina de fórmula (IIa)



con cloruro de fosforilo o cloruro de oxalilo para obtener la correspondiente 4-cloroquinazolina de fórmula (IIIa)



15 y
b) hacer reaccionar la 4-cloroquinazolina de fórmula (IIIa) anterior con 3-etil anilina para obtener el derivado de quinazolina NRC-2694



NRC-2694

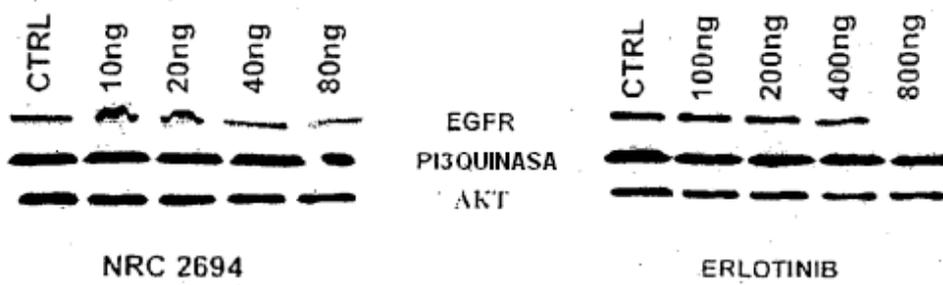


Figura - 1: Análisis de transferencia de Western de células A549 tratadas con HCl de erlotinib y NRC 2694. Se observó una disminución dependiente de la dosis en los niveles de EGFR.

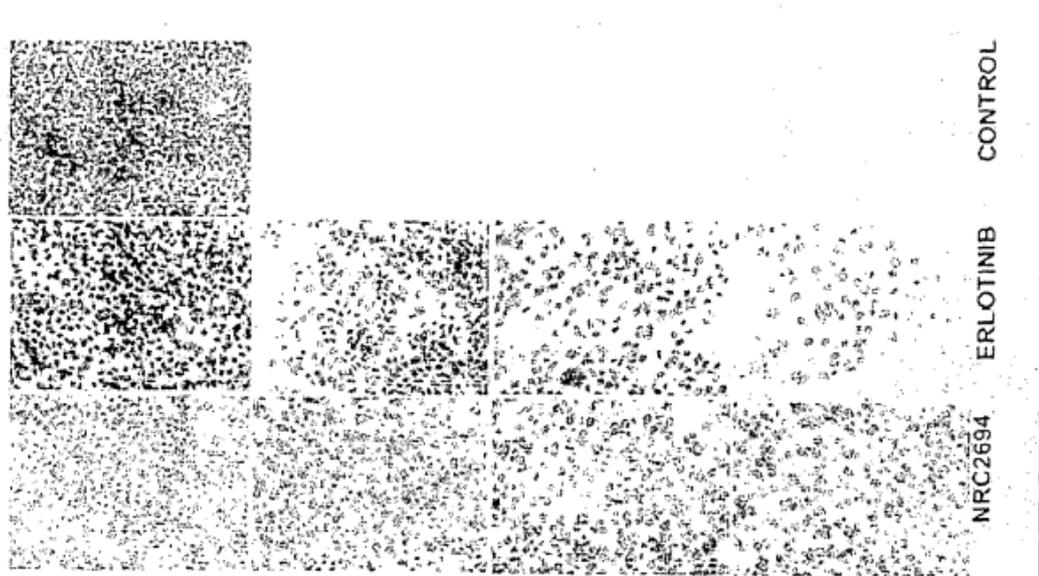


Figura - 2: Ensayo de invasión de Matrigel de células H1299 tratadas con Erlotinib y NRC 2694. Se observó una disminución dependiente de la dosis en la invasión.

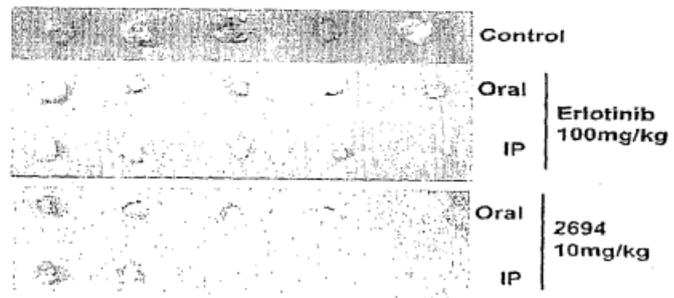


Figura - 3: Disminución del tamaño tumoral inducido por administración oral e ip de HCl de Erlotinib y NRC 2694 en ratones atímicos implantados con tumores de pulmón humano A549

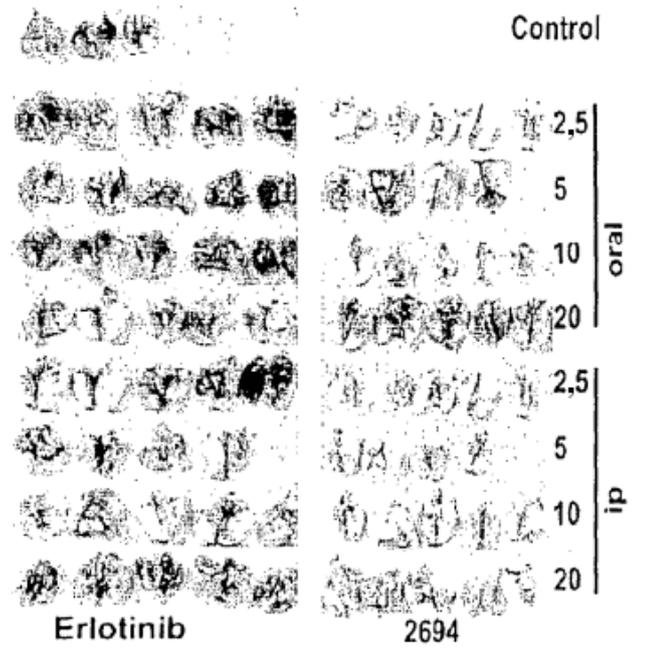


Figura - 4: Pulmones obtenidos de ratones atímicos con células A549 que expresan luciferasa tratadas con diversas concentraciones de HCl de Erlotinib y NRC 2694 mediante las vías oral o ip

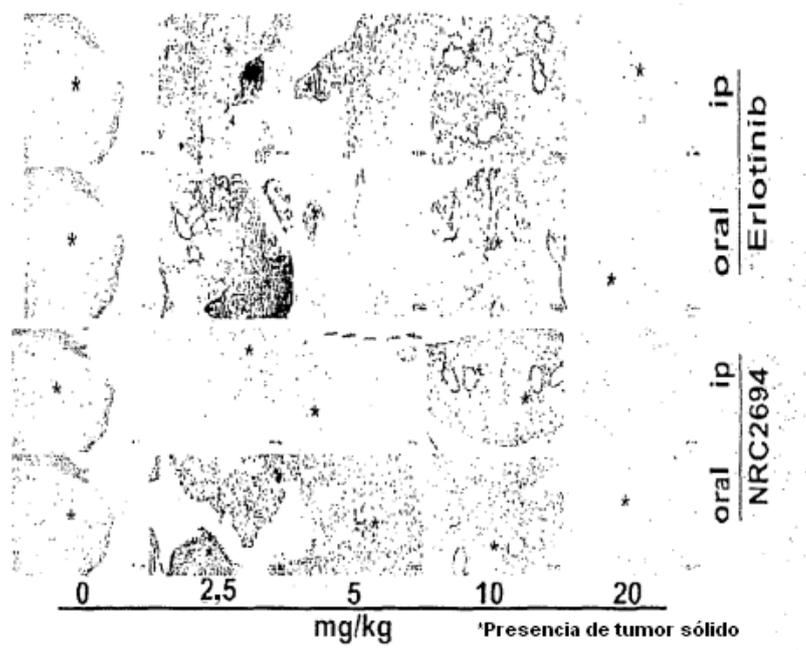


Figura - 5 : Secciones teñidas con H&E representativas de pulmones que portan tumor en ratones atímicos después de tratamiento con HCl de Erlotinib y NRC 2694

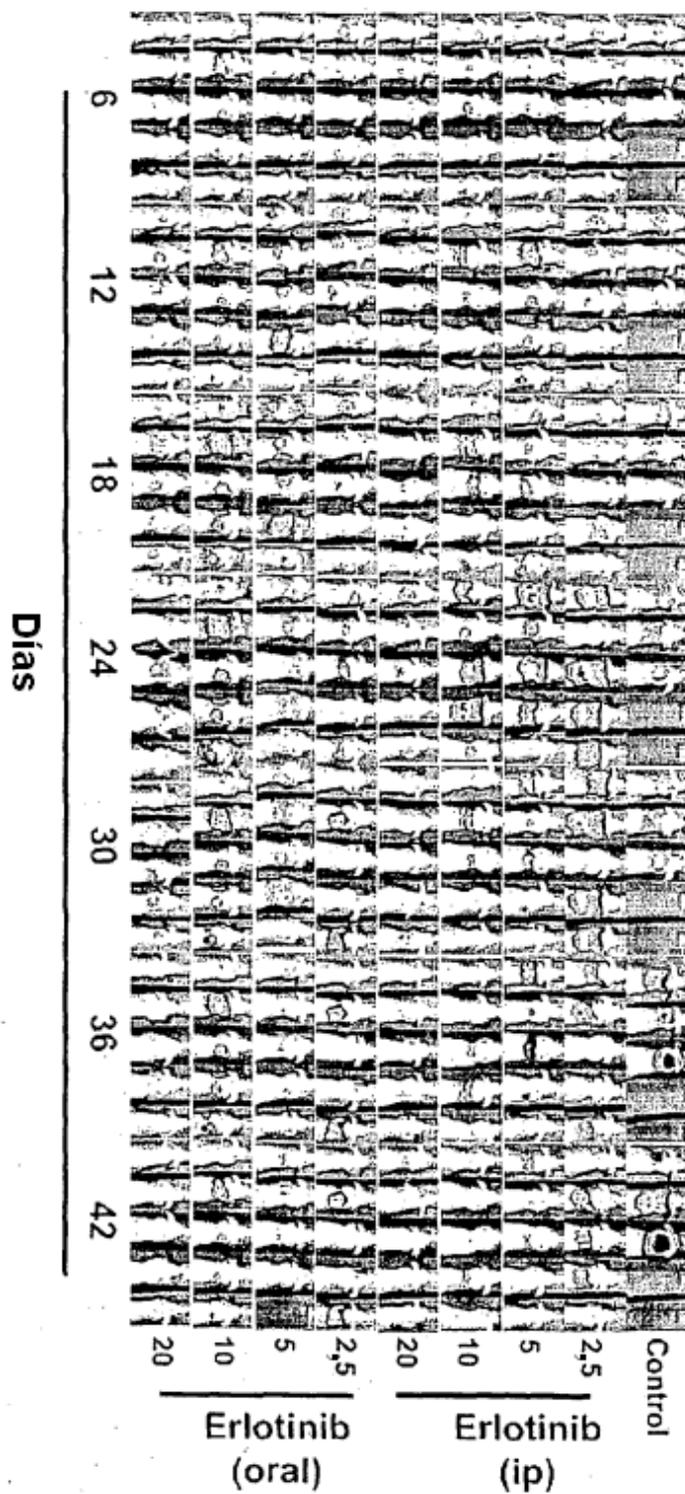


Figura - 6: Ratones atímicos implantados con células A549 que expresan luciferasa tratadas con diversas concentraciones de HCl de erlotinib mediante las vías oral o ip

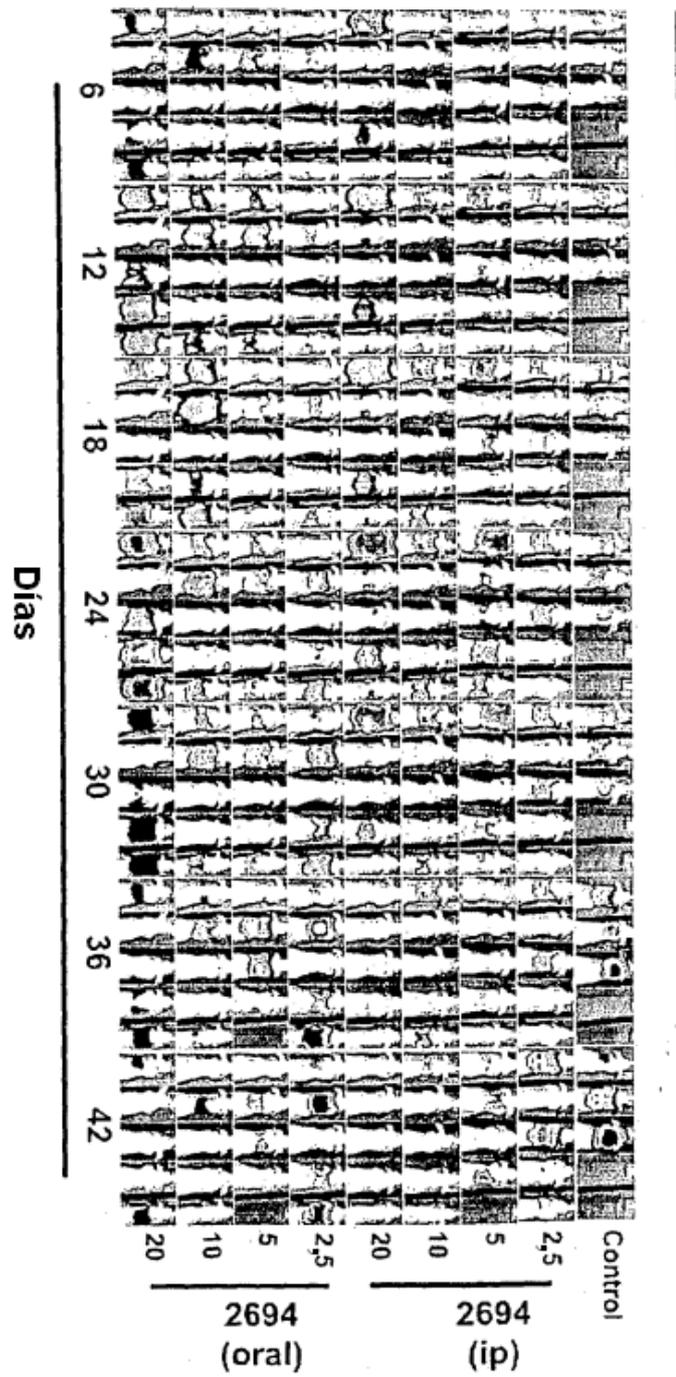


Figura -7 : Ratones atímicos implantados con células A549 que expresan luciferasa tratadas con diversas concentraciones de NRC 2694 mediante las vías oral o ip

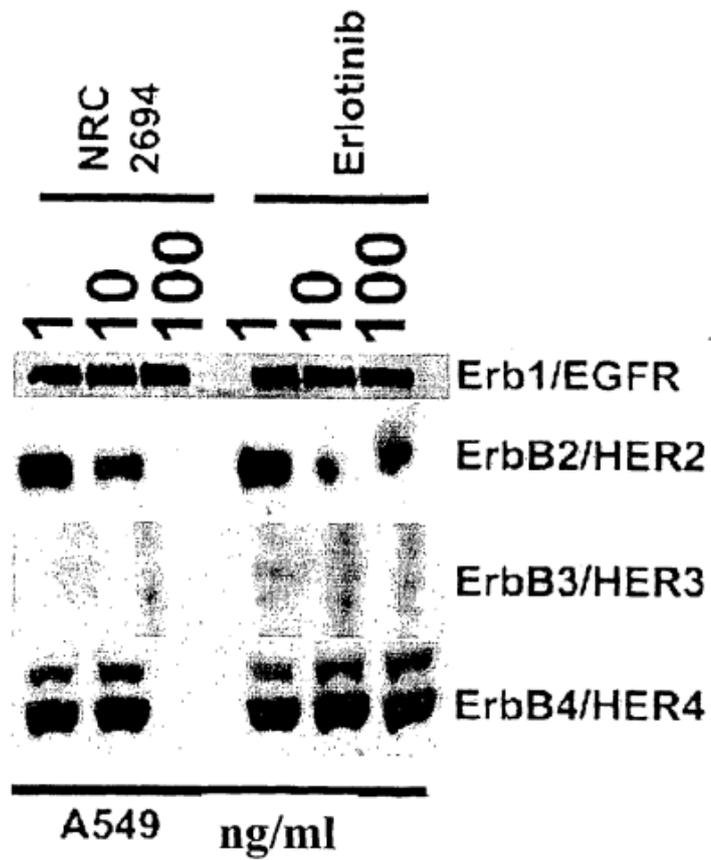


Figura-8: Estudio del efecto de NCE de NRC en relación con otros receptores tales como HER-1,2,3,4 y VEGFR *in vitro*. Se observó una disminución en los niveles de Erb1, Erb2, Erb3 y Erb 4 después de tratamiento con NRC 2694 en células A549.