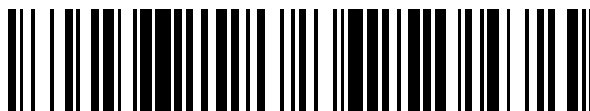


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 614**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4427 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07D 239/94 (2006.01)

C07D 211/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2016 PCT/CN2016/076693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16150340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2016 E 16767717 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3272746**

54 Título: **Sales de derivado de quinazolina y método de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

20.03.2015 CN 201510125962

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

27.07.2020

73 Titular/es:

**CHAI TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (33.3%)
No.369 Yuzhou South Road, Haizhou District, Lianyungang
Jiangsu 222062, CN;
CENTAURUS BIOPHARMA CO., LTD. (33.3%) y
LIANYUNGANG RUNZHONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ZHANG, XIQUAN;
TANG, SONG;
FENG, WEIWEI;
TIAN, XIN;
CHEN, ZHILIN;
GU, HONGMEI;
XU, HONGJIANG y
LIU, FEI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 775 614 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

Sales de derivado de quinazolina y método de preparación de las mismas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente china n.º 201510125962.4 presentada ante la Oficina Estatal de Propiedad Intelectual de China el 20 de marzo de 2015.

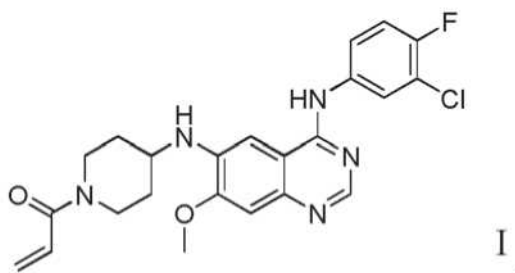
10 Campo técnico

La presente solicitud se refiere al campo de la química farmacéutica y, más concretamente, a una sal de un derivado de quinazolina, a un método de preparación de la misma y a un uso médico de la misma.

15 Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) es un receptor de tirosina quinasa, y está ampliamente distribuido en las superficies de las células epiteliales de los mamíferos, los fibroblastos, las células gliales, los queratinocitos, etc. La vía de señalización de EGFR desempeña un papel importante en los procesos fisiológicos de las células, tales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y similares. La deficiencia funcional de las proteínas tirosina quinasa, tales como EGFR, etc., o la anomalía en la actividad o la localización celular de factores clave en la vía de señalización relacionada, pueden causar la aparición de tumores, diabetes, inmunodeficiencias y enfermedades cardiovasculares.

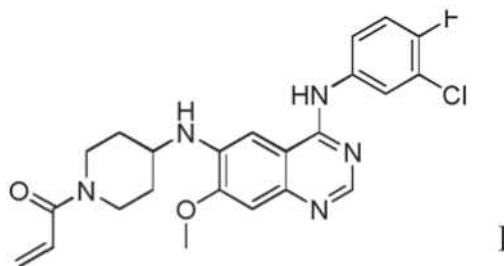
25 La N⁶-(1-acriloilazaciclohexan-4-il)-N⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxiquinazolin-4,6-diamina tiene una estructura representada por la Fórmula I



30 El compuesto de Fórmula I es un inhibidor selectivo del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se puede unir competitivamente al sitio de fosforilación de la tirosina quinasa en un dominio intracelular para bloquear una interacción entre el sitio de fosforilación y el ATP, y así inhibir la fosforilación de la tirosina y una serie de transducción de señales en dirección 3', y luego inhibir el crecimiento de las células tumorales. El compuesto de Fórmula I, por lo tanto, puede usarse para tratar diferentes tumores malignos, tales como el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama y similares. Véase la solicitud de patente china n.º 2013104528854.

Sumario de la invención

40 En un aspecto, la presente solicitud proporciona un maleato de un compuesto de Fórmula I,



45 en donde una proporción molar del ácido maleico con respecto al compuesto de Fórmula I depende de la cantidad de ácido maleico usada en la preparación de dicha sal. Por ejemplo, la proporción molar del compuesto de Fórmula I con respecto al ácido maleico en el maleato puede estar en un intervalo de 1:0,5-4.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método de preparación de un maleato de un compuesto de Fórmula I, que comprende: (1) preparar una solución del compuesto de Fórmula I; (2) poner en contacto la solución del compuesto de Fórmula I obtenida de la etapa (1) con ácido maleico; y (3) secar por pulverización una mezcla de reacción obtenida de la etapa (2), proporcionando el maleato del compuesto de Fórmula I.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica, que comprende un maleato de un compuesto de Fórmula I y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la presente solicitud proporciona un maleato de un compuesto de Fórmula I o una composición farmacéutica del mismo para su uso en el tratamiento de un tumor.

Descripción detallada

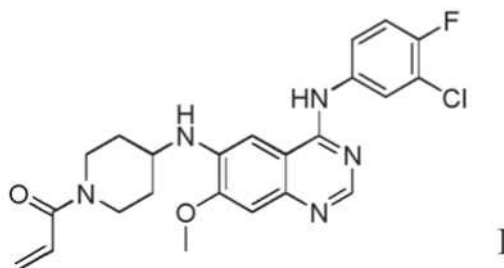
En la siguiente descripción, se incluyen ciertos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de distintas realizaciones desveladas. Sin embargo, los expertos en la materia pertinente reconocerán que las realizaciones se pueden poner en práctica con otros métodos, componentes, materiales y similares, en lugar de uno o más de estos detalles específicos.

A menos que el contexto requiera otra cosa, a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones posteriores, el término "comprenden" y las variaciones del mismo, tales como "comprende" y "que comprende", se deben interpretar en un sentido abierto e inclusivo, es decir, "que incluye/n, pero sin limitación".

La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una realización" o a "otra realización" o a "algunas realizaciones" significa que un determinado elemento, estructura o característica de referencia descritos en relación con la realización se incluye en al menos una realización. Por consiguiente, las apariciones de la expresión "en una realización" o "en otra realización" o "en algunas realizaciones" en diferentes lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los elementos, las estructuras o las características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Debería observarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/a", "uno" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contenido indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una reacción en la que está implicado "un catalizador" incluye un solo catalizador, o dos o más catalizadores. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, también cabe señalar que el término "o" se emplea generalmente en el sentido que incluye "y/o".

En un aspecto, la presente solicitud proporciona un maleato de un compuesto de Fórmula I,



en donde una proporción molar del ácido maleico con respecto al compuesto de Fórmula I depende de la cantidad de ácido maleico usada en la preparación de dicha sal. Por ejemplo, la proporción molar del compuesto de Fórmula I con respecto al ácido maleico en el maleato puede estar en un intervalo de 1:0,5-4.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, la proporción molar del compuesto de Fórmula I con respecto al ácido maleico en el maleato es de 1:1. En otras realizaciones más de la presente solicitud, la proporción molar del compuesto de Fórmula I con respecto al ácido maleico en el maleato es de 1:2.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método de preparación de un maleato de un compuesto de Fórmula I, que comprende (1) preparar una solución de un compuesto de Fórmula I; (2) mezclar la solución del compuesto de Fórmula I obtenida de la etapa (1) con ácido maleico; y (3) secar por pulverización una mezcla de reacción obtenida de la etapa (2), proporcionando el maleato del compuesto de Fórmula I.

En algunas realizaciones, una proporción molar de la cantidad del compuesto de Fórmula I con respecto a la del ácido maleico usado en el método de preparación está en un intervalo de 1:1-20, preferentemente de 1:1-15, y lo más preferentemente de 1:1-10.

En la etapa (1) del método de preparación, el compuesto de Fórmula I puede disolverse en un disolvente orgánico para preparar una solución del compuesto de Fórmula I. El disolvente orgánico incluye todos los disolventes orgánicos capaces de disolver el compuesto de Fórmula I, tal como DMF.

En la etapa (2) del método de preparación, la solución del compuesto de Fórmula I obtenida de la etapa (1) puede mezclarse con ácido maleico o una solución de ácido maleico y, si es necesario, la mezcla de reacción resultante se puede calentar hasta una temperatura adecuada, por ejemplo, de 60 °C a 100 °C, preferentemente a 80 °C. En algunas realizaciones, la solución de ácido maleico es una solución orgánica de ácido maleico obtenida mezclando ácido maleico con un disolvente orgánico. En algunas realizaciones de la presente solicitud, el disolvente orgánico es, por ejemplo, DMF.

En algunas realizaciones, un disolvente miscible con los disolventes orgánicos usados en la etapa (1) y/o la etapa (2), tal como el agua, se puede añadir antes del secado por pulverización.

En otro aspecto más, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende un maleato de un compuesto de Fórmula I y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La expresión "composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a una formulación producida por un compuesto de la presente solicitud y un vehículo, excipiente y/o diluyente que se acepta, en general, en el campo de la medicina para la administración de un compuesto bioactivo a un organismo (por ejemplo, un ser humano). El fin de la composición farmacéutica es facilitar la administración del compuesto de la presente solicitud al organismo.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos vehículos y diluyentes que no causan una estimulación significativa a un organismo, y que no perjudicarán la bioactividad ni las propiedades de un compuesto activo. "Excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia inerte que se administra junto con un principio activo y que es beneficiosa para la administración del principio activo a un organismo. Un "vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye, pero sin limitación, cualquiera de entre portadores, excipientes, vehículos, sustancias de deslizamiento, agentes edulcorantes, diluyentes, conservantes, tintes/colorantes, agentes aromatizantes, tensioactivos, agentes humectantes, dispersantes, disgregantes, agentes de suspensión, estabilizantes, agentes isotónicos, disolventes o emulsionantes, y similares, que se pueden usar en seres humanos o en ganado. Los ejemplos no limitantes de un excipiente incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares y almidones, derivados de celulosa, gelatinas, aceites vegetales, polietilenglicoles, y similares.

El maleato del compuesto de Fórmula I de la presente solicitud puede administrarse en su forma pura o en forma de una composición farmacéutica apropiada. La composición farmacéutica de la presente solicitud se puede preparar combinando el maleato del compuesto de Fórmula I de la presente solicitud con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado, y puede formularse en formulaciones sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, emulsiones, suspensiones, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, aerosoles y similares.

Las vías de administración típicas del maleato del compuesto de Fórmula I de la presente solicitud o de la composición farmacéutica del mismo incluyen, pero sin limitación, la administración oral, rectal, transmucosa, enteral, o la administración local, transdérmica, por inhalación, parenteral, sublingual, intravaginal, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea e intravenosa. La vía de administración preferida es la administración oral.

La composición farmacéutica de la presente solicitud puede prepararse usando un método conocido por un experto en la materia, tal como un método convencional de mezcla, de disolución, de granulación, de fabricación de grageas, de molienda, de emulsificación, de liofilización, y similares.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la presente solicitud está en forma oral. Para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse mezclando el compuesto activo con un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable bien conocido en la técnica. Estos vehículos, Excipientes y/o diluyentes permiten que la composición farmacéutica de la presente solicitud se formule en comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para la administración oral a un paciente. Se puede preparar una composición oral sólida mediante un método convencional de mezcla, relleno o formación de comprimidos.

Durante dicha administración, una dosis del maleato del compuesto de Fórmula I es preferentemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal al día.

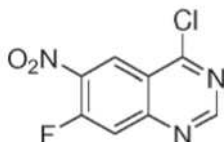
En otro aspecto más, la presente solicitud proporciona un maleato de un compuesto de Fórmula I o una composición farmacéutica del mismo para su uso en el tratamiento de un tumor.

En algunas realizaciones, el tumor incluye, pero sin limitación, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de mama.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 Preparación de un compuesto de Fórmula I

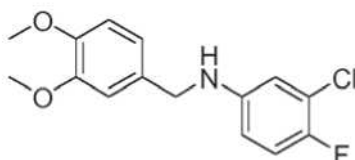
Etapas 1: 4-cloro-7-fluoro-6-nitroquinazolina



Se sometieron 7-fluoro-6-nitroquinazolin-4(3H)-ona (2,0 g, 9,6 mmol) y una gota de *N,N*-dimetilformamida a reflujo durante la noche en cloruro de tionilo (6 ml), y luego se concentró la mezcla de reacción al vacío. Se añadió al residuo tolueno, y luego se concentró al vacío nuevamente para eliminar el cloruro de tionilo restante. Se obtuvo el compuesto del título (2 g, 92 %).

15 RMN de ^1H (CDCl_3): δ 9,18 (1H, s), 9,05 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,95 (1H, d, $J = 10,4$).

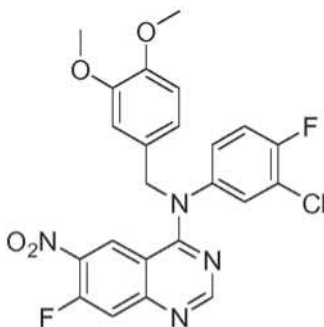
Etapas 2: 3-cloro-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-4-fluoroanilina



A 1,2-dicloroetano (30 ml), se añadieron 3-cloro-4-fluoroanilina (2,9 g, 20 mmol) y 3,4-dimetoxibenzaldehído (3,3 g, 20 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (10 g, 50 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en 100 ml de agua, y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera saturada, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título (5,5 g, 93 %).

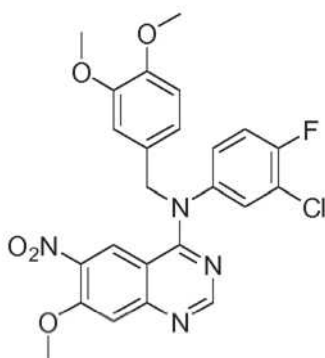
25 RMN de ^1H (CDCl_3): δ 6,94-6,82 (4H, m), 6,63-6,61 (1H, m), 6,45-6,41 (1H, m), 4,18 (2H, s), 3,98 (1H, a), 3,87 (3H, s), 3,86 (3H, s).

Etapas 3: *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-7-fluoro-6-nitroquinazolin-4-amina



Al acetonitrilo (20 ml), se añadieron 4-cloro-7-fluoro-6-nitroquinazolina (2,1 g, 9,2 mmol) y 3-cloro-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-4-fluoroanilina (2,7 g, 9,2 mmol) y se sometió a reflujo durante 3 horas. Después del enfriamiento, se neutralizó la mezcla de reacción con solución de carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera saturada, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título (3,6 g, 80 %).

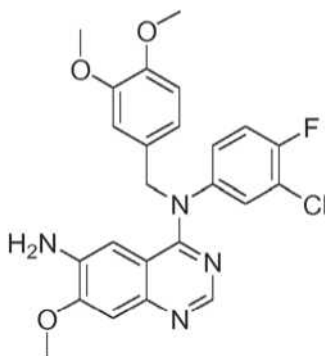
Etapas 4: *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-7-metoxi-6-nitroquinazolin-4-amina



Se añadió sodio metálico (113 mg, 5,0 mmol) a metanol anhidro (20 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, se añadió *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-7-fluoro-6-nitroquinazolin-4-amina (2,4 g, 5,0 mmol), y se agitó la mezcla de reacción resultante a 40 °C durante 6 horas. Después del enfriamiento, se vertió la mezcla en 100 ml de agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título (2,35 g, 94 %).

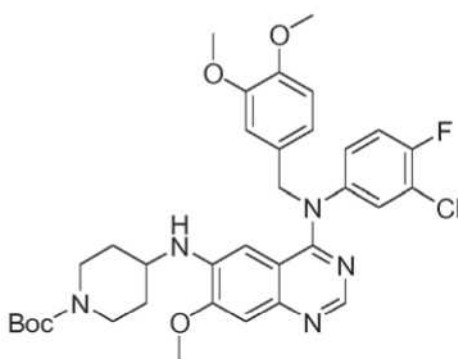
RMN de ¹H (CDCl₃): δ 8,85 (1H, s), 7,57 (1H, s), 7,35 (1H, s), 7,23-7,19 (2H, m), 7,00-6,96 (1H, m), 6,84-6,78 (2H, m), 5,35 (2H, s), 4,05 (3H, s), 3,88 (3H, s), 3,83 (3H, s).

Etapa 5: *N*⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)-*N*⁴-(3,4-dimetoxibencil)-7-metoxiquinazolin-4,6-diamina



Se añadieron *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-7-metoxi-6-nitroquinazolin-4-amina (2,35 g, 4,7 mmol) y níquel Raney (aproximadamente 0,5 g) a tetrahidrofurano (100 ml). Se reemplazó la atmósfera con gas hidrógeno y se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno (1 atm). Se filtró la mezcla, y el filtrado se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título (2 g, 90 %).

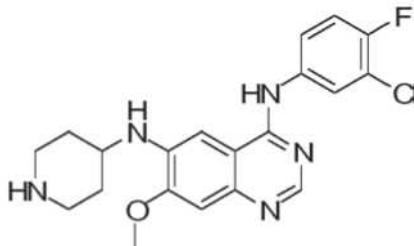
Etapa 6: 4-{{4-[(3-cloro-4-fluorofenil-(3,4-dimetoxibencil)amino]-7-metoxiquinazolin-6-il}amino}piperidin-1-carboxilato *tert*-butílico



Se agitó una solución de *N*⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)-*N*⁴-(3,4-dimetoxibencil)-7-metoxiquinazolin-4,6-diamina (469 mg,

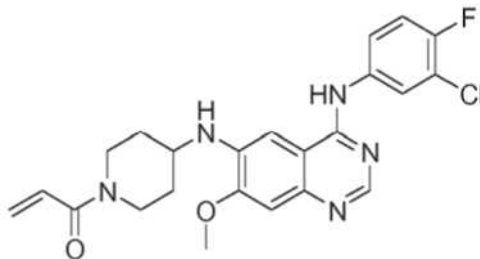
1,0 mmol) y 4-oxopiperidin-1-carboxilato *terc*-butilico (239 mg, 1,2 mmol) en ácido acético (10 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas, y luego se añadió triacetoxiborohidruro sódico (254 mg, 1,2 mmol) a la misma en una porción. Después de reaccionar durante media hora, la reacción se interrumpió añadiendo lentamente agua y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica resultante secuencialmente con agua, solución acuosa de NaHCO_3 al 5 % y salmuera saturada, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró al vacío. El residuo se separó a través de cromatografía en columna sobre gel de sílice, proporcionando el compuesto del título (404 mg, 62 %).

Etapa 7: *N*⁶-(piperidin-4-il)-*N*⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxiquinazolin-4,6-diamina



Se agitó una solución de 4-{{4-[(3-cloro-4-fluorofenil)-(3,4-dimetoxibencil)amino]-7-metoxiquinazolin-6-il}amino}piperidin-1-carboxilato *terc*-butilico (0,4 g, 0,61 mmol) en ácido trifluoroacético (8 ml) a 70 °C durante 6 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió, y se concentró al vacío. El residuo se suspendió con acetato de etilo y se filtró, proporcionando un trifluoroacetato del compuesto del título (0,26 g, 83 %).

Etapa 8: *N*⁶-(1-acriloilpiperidin-4-il)-*N*⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxiquinazolin-4,6-diamina



Se agitó una solución de mono-trifluoroacetato de *N*⁶-(piperidin-4-il)-*N*⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxiquinazolin-4,6-diamina (258 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (202 mg, 2,0 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de enfriar hasta 0 °C, se añadió gota a gota una solución de cloruro de acrilóilo (54 mg, 0,6 mmol) en tetrahidrofurano (2 ml), y luego la reacción continuó durante otros 30 minutos. La reacción se completó, se inactivó añadiendo lentamente solución de NaHCO_3 al 5 % y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica resultante con salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo se separó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, proporcionando el producto diana (150 mg, 66 %).

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 9,24 (1H, s), 8,33 (1H, s), 8,09-8,08 (1H, m), 7,77-7,74 (1H, m), 7,42-7,40 (1H, m), 7,23 (1H, s), 7,06 (1H, s), 6,85-6,81 (1H, m), 6,10-6,06 (1H, m), 5,66-5,64 (1H, m), 5,32-5,29 (1H, m), 4,41-4,38 (1H, m), 4,09-4,06 (1H, m), 3,93 (3H, s), 3,79-3,78 (1H, m), 3,35-3,34 (1H, m), 2,87-2,84 (1H, m), 2,03-2,01 (2H, m), 1,44-1,41 (2H, m).

Ejemplo 2 Preparación de un maleato de un compuesto de Fórmula I

Se disolvieron 5 g del compuesto de Fórmula I en 100 ml de DMF a temperatura ambiente, y se agitó de manera continua hasta que se obtuvo una solución homogénea. A esto, se añadieron 6,3 g de ácido maleico, y luego se calentó hasta 80 °C y se hizo reaccionar durante 2 h. Luego, se añadieron 100 ml de agua a esta temperatura, y la mezcla se secó directamente por pulverización, proporcionando 4,0 g de polvo sólido amarillo. El espectro de XRD mostró que el polvo era un maleato amorfo del compuesto de Fórmula I (1:1).

Ejemplo 3 Preparación de un citrato, oxalato y acetato del compuesto de Fórmula I

El citrato, oxalato y acetato del compuesto de Fórmula I se prepararon respectivamente de la misma manera que el Ejemplo 2.

Ejemplo 4 Prueba de biodisponibilidad

Procedimiento de estudio: Se dividieron aleatoriamente quince perros Beagle (7,4 ~ 9,4 kg de peso corporal) en 5 grupos, y se les administraron suspensiones orales del compuesto de Fórmula I, el maleato, el citrato, el oxalato y el acetato del mismo (calculado de acuerdo con la cantidad del compuesto de Fórmula I) en CMC-Na (carboximetilcelulosa sódica) a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre antes y después de la administración (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h), y se determinó la concentración del compuesto de Fórmula I para cada muestra de plasma mediante LC -MS, y luego se calculó la biodisponibilidad.

Procedimiento de detección:

Condiciones cromatográficas: metanol como fase móvil A y una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 % (v/v) como fase móvil B, una elución isocrática A: B = 52:48; 0,2 ml/min de un caudal; 35 °C de temperatura de la columna; y SHIMADZU Shim-pack VP-ODS C₁₈ (5,0 mm, 150 mm ± 2,0 mm de D.I., Shimadzu Corporation) como columna cromatográfica.

Condiciones de espectrometría de masas: fuente de iones: fuente de ionización por electronebulización, barrido en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), 250 °C de temperatura de desolventizador curvado (CDL, *Curved DesoLventizer*), 200 °C de temperatura de bloque calefactor; 25 V de tensión del CDL; +1,60 kV de tensión de detección; 1,5 l/min de caudal de gas de atomización; 2,0 l/min de caudal de gas seco.

Resultados del estudio:

	Compuesto de Fórmula I	Maleato	Citrato	Oxalato	Acetato
C _{máx} (mg/ml)	2,82 ± 2,83	8,14 ± 0,12	1,29 ± 0,37	3,59 ± 1,67	2,08 ± 0,52
T _{máx} (h)	3,17 ± 4,19	1,17 ± 0,76	1,33 ± 0,58	1,50 ± 0,71	3,33 ± 1,15
T _{1/2} (h)	5,13 ± 2,85	5,44 ± 0,72	4,48 ± 1,14	9,38 ± 4,03	9,41 ± 7,90
AUC ₀₋₁ (mg*h/ml)	42,14 ± 55,12	85,13 ± 25,27	10,76 ± 6,55	53,20 ± 35,05	20,35 ± 0,46
V _d /F (l/kg)	0,78 ± 1,08	0,06 ± 0,02	0,61 ± 0,39	0,12 ± 0,08	0,25 ± 0,01
CL/F (l/h/kg)	4,67 ± 6,67	0,48 ± 0,12	4,32 ± 3,79	1,39 ± 0,37	3,31 ± 2,73

Ejemplo 5 Prueba de actividad *in vitro*

1. Método para la prueba de enzimología *in vitro*

Se expresaron EGFR, EGFR (T790M, L858R) y HER2 quinasa y se purificaron a través de un sistema de expresión de células de insecto, o se adquirieron de entre los productos disponibles en el mercado.

Se estableció una plataforma para probar las actividades quinasa de EGFR, EGFR (T790M, L858R) y HER2 basándose en el método de fluorescencia homogénea con resolución temporal (HTRF, *Homogeneous Time-Resolved Fluorescence*) proporcionado por Cisbio Bioassays, y se determinó la actividad del compuesto con la plataforma. El compuesto se diluyó en un gradiente de 3 veces con 100 % de DMSO, partiendo de 100 nM (EGFR y HER2) y 1 mM (EGFR-T790M/L858R), respectivamente. Para cada concentración, se tomaron 4 ml de solución y se añadieron a 96 ml de tampón de reacción (ácido 4-hidroxietilpiperazin-metanosulfónico (HEPES) 50 mM (pH 7,0), NaN₃ al 0,02 %, albúmina de suero bovino al 0,01 % (BSA), Ortovanadato de sodio 0,1 mM, MgCl₂ 5 mM, SEB 50 nM (Cisbio, cat. n.º: 61SEBALB), DTT 1 mM). Se tomaron 2,5 ml de la mezcla y se añadieron a una placa de 384 pocillos (OptiPlate-384, PerkinElmer), y luego se añadieron 2,5 ml de la quinasa, y se mezclaron uniformemente a través de una centrifuga. Después, se añadieron 5 ml de sustrato ATP y TK-biotina para iniciar la reacción. Tras incubar la placa de 384 pocillos en una incubadora a 23 °C durante un cierto período de tiempo, se detuvo la reacción mediante la adición de 5 ml de anticuerpo TK marcado con Eu³⁺-Criptato y 5 ml de estreptavidina-XL665. Se leyeron los valores de fluorescencia en Envision (PerkinElmer) después de la incubación durante 1 hora en la incubadora. Se calcularon los valores de Cl₅₀ del compuesto usando el software GraphPad Prism 5.0.

2. Ensayo de proliferación celular independiente del anclaje

Se cultivaron NCI-H1975, una estirpe celular humana de cáncer de pulmón no microcítico, y BT474, una estirpe celular humana cáncer de mama, en medio de cultivo RPMI-1640 o DMEM complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % en una incubadora celular (37 °C, CO₂ al 5 %). En la prueba del compuesto, se recubrieron previamente las placas de cultivo con medio al 0,6 %, y se volvieron a suspender las células con agarosa de bajo punto de fusión al 0,3 %, y luego se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo (100 ml). El compuesto se diluyó en un gradiente de 3 veces, partiendo de 10 mM. Para cada concentración, se tomaron 2 ml de la solución y se añadieron a 98 ml de medio de cultivo, y luego se añadieron 5,3 ml de la mezcla al medio de cultivo

celular (0,1 % de concentración final de DMSO, v/v). Después del tratamiento durante una semana (7 días), se añadieron 20 ml de reactivo CellTiter-Blue® (Promega) y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se leyeron las señales de fluorescencia en Envison (Perkin Elmer), y se calcularon los valores de CI_{50} del compuesto para inhibir la proliferación celular usando GraphPad Prism 5.0.

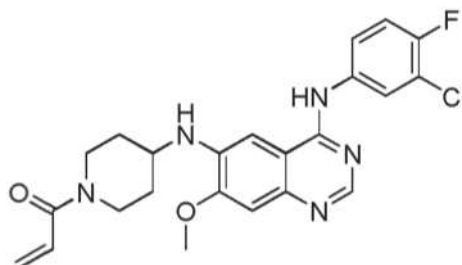
5

Actividad biológica

Compuesto	Actividad enzimática (CI_{50} nM)			Actividad celular (CI_{50} nM)	
	EGFR	EGFR-L858R/T790M	HER2	H1975	BT474
Ejemplo 1	0,2	2,0	0,2	14,0	2,1

REIVINDICACIONES

1. Un maleato de un compuesto de Fórmula I,



I

2. El maleato del compuesto de Fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una proporción molar del compuesto de Fórmula I con respecto al ácido maleico es de 1:0,5-4.

3. El maleato del compuesto de Fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la proporción molar del compuesto de Fórmula I con respecto al ácido maleico es de 1:1 o 1:2.

4. Un método de preparación del maleato del compuesto de Fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende, (1) preparar una solución del compuesto de Fórmula I; (2) mezclar la solución del compuesto de Fórmula I obtenida de la etapa (1) con ácido maleico; y (3) secar por pulverización una mezcla de reacción obtenida de la etapa (2), obteniéndose el maleato del compuesto de Fórmula I.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde una proporción molar de la cantidad del compuesto de Fórmula I con respecto a la del ácido maleico es de 1:1-20, preferentemente de 1:1-15, y más preferentemente, de 1:1-10.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde, en la etapa (1), el compuesto de Fórmula I se disuelve en un disolvente orgánico para preparar la solución del compuesto de Fórmula I, y el disolvente orgánico es preferentemente DMF.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde se añade un disolvente miscible con el disolvente orgánico antes del secado por pulverización, y el disolvente miscible con el disolvente orgánico es preferentemente agua.

8. Una composición farmacéutica, que comprende el maleato del compuesto de Fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

9. El maleato del compuesto de Fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de un tumor.