

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 1759

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.09.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.11.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/109065**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2002**
(Věstník č. 1/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/22116**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/31048**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

C 07 D 413/12

A 61 K 31/517

///(C 07 D 413/12, C 07 D 239:94, C 07 D 295:04)

(71) Přihlašovatel:

**WARNER-LAMBERT COMPANY, Morris Plains, NJ,
US;**

(72) Původce:

**Bridges Alexander James, Saline, MI, US;
Driscoll Denise, Ann Arbor, MI, US;
Klohs Wayne Daniel, Ypsilanti, MI, US;**

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-
4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid,
ireversibilní inhibitor tyrosin-kinas**

(57) Anotace:

Sloučenina je ireversibilním inhibitorem tyrosinkinasy, využití
nalezne při léčbě nádorů, aterosklerosy, restenozy,
endometriosy a psoriasy.

CZ 2001 - 1759 A3

N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid, ireversibilní inhibitor tyrosin-kinas

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká sloučeniny N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu, která je ireversibilním inhibitorem tyrosin-kinas. Předkládaný vynález se také týká způsobu léčby nádorů, atherosklerosy, restenozy, endometriozy a psoriasis za použití sloučeniny N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu a farmaceutický prostředků obsahujících sloučeninu N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid.

Dosavadní stav techniky

Nádory se považují za onemocnění vznikající v důsledku intracelulární signalizace nebo mechanismu přenosu signálu. Buňky dostávají příkazy z mnoha extracelulárních zdrojů, a tyto příkazy určují to, zda budou nebo nebudou buňky proliferovat. Účelem systémů přenosu signálu je získat tyto a jiné signály na povrchu buněk, přenést je do buněk a potom do jádra, cytoskeletu, transportních systémů a systémů pro syntézu proteinů.

Nejčastější příčinou nádorů je série defektů, buď v těchto proteinech, jsou-li mutovány, nebo v regulaci množství proteinu v buňkách tak, že je nadměrně nebo nedostatečně produkován. Nejčastěji existují klíčové léze v buňkách, které vedou k trvalému stavu, při kterém dostávají buněčná jádra

signál k proliferaci, i když není ve skutečnosti tento signál přítomen. Toto může proběhnout mnoha mechanismy. Někdy může buňka začít produkovat skutečný růstový faktor pro své vlastní receptory, když by ve skutečnosti neměla, což se označuje jako mechanismus autokrinní smyčky. Mutace receptorů buněčného povrchu, které používají obvykle k signalizaci do buněk tyrosin-kinas, mohou vést k aktivaci kinasy za nepřítomnosti ligandu a k přenosu signálu, který ve skutečnosti neexistuje. Alternativně může být mnoho povrchových kinas nadměrně exprimováno na povrchu buněk, což vede k nepřiměřeně silné odpovědi na slabý signál. V buňce existuje mnoho úrovní, na kterých mohou mutace nebo nadměrná exprese vést ke stejnému chybnému signálu v buňce, a na nádorech se účastní mnoho druhů defektů signalizace. Předkládaný vynález se týká nádorů, na kterých se účastní tři právě popsané mechanismy a které nesou povrchové receptory pro tyrosin-kinasovou rodinu receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Tato rodina se skládá z EGF receptoru (též označovaného jako erbB1), erbB2 receptoru a jejich konstitutivně aktivovaných mutantních onkoproteinů Neu, erbB3 receptoru a erbB4 receptoru. Dále, jiné biologické procesy řízené prostřednictvím členů EGF rodiny receptorů mohou být také léčeny sloučeninami podle předkládaného vynálezu popsanými dále.

Nejdůležitějšími ligandy pro EGFR jsou epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor α (TGF α). Zdá se, že tyto receptory mají pouze minimální význam u dospělých lidí, ale jednoznačně se účastní chorobných procesů, jako je velké množství nádorů, zejména nádorů tlustého střeva a prsu. Hlavními ligandy pro blízkce příbuzné erbB2 (HER2), erbB3 (HER3) a erbB4 (HER4) receptory je rodina Heregulinů, a nadměrná exprese a mutace receptoru byly prokázány jako hlavní rizikový faktor pro špatnou prognosu karcinomu prsu. Dále bylo

prokázáno, že všechny čtyři členy této rodiny receptorů mohou tvořit heterodimerické signalizační komplexy s jinými členy rodiny, a že toto může vést při nadměrné expresi více než jednoho člena rodiny u malignity k synergní transformační kapacitě. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese více než jednoho člena rodiny je u lidských malignit relativně běžná.

Mimo nádorů je restenosa také onemocněním, při kterém dochází k nežádoucí proliferaci buněk. Restenosa vzniká v důsledku proliferace buněk hladkého svaly cév. Restenosa je hlavním klinickým problémem spojeným s koronární angioplastikou a jinými lékařskými zákroky. Restenosa se obvykle vyskytuje během přibližně 0 až 6 měsíců u přibližně 30% až 50% pacientů, kteří prodělali balonkovou angioplastiku pro zprůchodnění ucpaných koronárních arterií při léčbě onemocnění srdce způsobeného zúženými artériemi. Vzniklá restenosa způsobuje značnou morbiditu pacienta a zvyšuje náklady na zdravotní péči.

Proces restenosis je iniciován poraněním cév, včetně tepen a žil, s následným uvolněním trombogenních, vazoaktivních a mitogenních faktorů. Poranění endotelu a hlubších vrstev cévy vede k agregaci trombocytů, tvorbě trombu, zánětu a aktivaci makrofágů a buněk hladkého svaly. Tyto děje indukují produkci a uvolňování růstových faktorů a cytokinů, které potom mohou podporovat svou vlastní syntézu a uvolňování z cílových buněk. Tak je zahájen proces, který se sám udržuje a který zahrnuje růstové faktory jako je EGF, trombocytární růstový faktor (PDGF) nebo fibroblastový růstový faktor (FGF). Proto je výhodné mít ireversibilní inhibitory drah přenosu signálu, zejména tyrosin-kinas jako je EGF, PDGF, FGF nebo src tyrosin-kinasa.

Pro proliferativní onemocnění kůže psoriasis není v současnosti žádná dobrá léčba. Toto onemocnění se často léčí protinádorovými činidly, jako je methothrexat, které mají výrazné vedlejší účinky a které nemají - při dávkách limitovaných toxicitou - přílišnou účinnost. Předpokládá se, že TGF α je hlavním růstovým faktorem nadprodukovaným u psoriasis, protože u 50% transgenních myší, které nadměrně exprimují TGF α , vznikne psoriasis. Toto naznačuje, že dobrý inhibitor EGFR signalizace může být použit jako antipsoriatické činidlo, výhodně, ale ne nezbytně, za lokální aplikace.

Ve srovnání s reversibilními inhibitory tyrosin-kinas jsou ireversibilní inhibitory zejména výhodné, protože mohou být použity pro prodlouženou inhibici tyrosin-kinas, která je omezena pouze normální rychlostí resyntézy receptorů, která se označuje také jako obrat.

Informace o úloze src tyrosin-kinas v biologických procesech souvisejících s nádory a restenosou jsou uvedeny v následujících dokumentech, které jsou zde všechny inkorporovány jako odkazy.

Benjamin, C.W. and Jones, D.A., Platelet-Derived Growth Factor Stimulates Growth Factor Receptor Binding Protein-2 Association with Src In Vascular Smooth Muscle Cells, JBC, 1994, 269: 30911-30916;

Kovalenko, M. et al., Selective Platelet-Derived Growth Factor Receptor Kinase Blockers Reverse Cis-transformation, Cancer Res., 1994, 54: 6106-6114;

Schwartz R.S., et al., The Restenosis Paradigm Revisited: An Alternative Proposal for Cellular Mechanisms, J. Am. Coll. Cardiol, 1992:20:1284-1293;

Libby P. et al., Cascade Model for Restenosis - A Special Case of Atherosclerosis Progression, Circulation, 1992;86:47-52.

Další informace o úloze EGF tyrosin-kinas v biologických procesech souvisejících s nádory a restenosou jsou uvedeny v následujících dokumentech, které jsou zde všechny inkorporovány jako odkazy.

Jonathan Blay and Morley D. Hollenberg, Heterologous Regulation Of EGF Receptor Function In Cultured Aortic Smooth Muscle Cells, Eur. J. Pharmacol., Mol. Pharmacol. Sect., 1989;172(1):17.

Informace o tom, že protilátky k EGF nebo EGFR mají protinádorovou aktivitu, jsou uvedeny v následujících dokumentech, které jsou zde všechny inkorporovány jako odkazy.

Modjahedi H., Eccles S., Box G., Styles J., Dean C., Immunotherapy Of Human Tumour Xenografts Overexpressing The EGF Receptor With Rat Antibodies That Block Growth Factor-Receptor Interaction, Br. J. Cancer, 1993;67:254-261.

Kurachi H., Morishige K.I., Amemiya K., Adachi H., Hirota K., Miyake A., Tanizawa O., Importance Of Transferring Growth Factor Alpha/Epidermal Growth Factor Receptor Autocrine Growth Mechanism In An Ovarian Cancer Cell Line In Vivo, Cancer Res., 1991;51:5956-5959.

Masui H., Moroyama T., Mendelsohn J., Mechanism Of Antitumor Activity In Mice For Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies With Different Isotypes, Cancer Res., 1986;46:5592-5598.

Rodeck U., Herlyn M., Herlyn D., Molthoff C., Atkinson B., Varello M., Steplewski Z., Koprowski H., Tumor Growth Modulation By A Monoclonal Antibody To The Epidermal Growth Factor Receptor: Immunologically Mediated And Effector Cell-

Independent Effects, Cancer Res., 1987;47:3692-3696.

Guan E., Zhou T., Wang J., Huang P., Tang W., Zhao M., Chen Y., Sun Y., Growth Inhibition Of Human Nasopharyngeal Carcinoma In Athymic Mice By Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies, Internat. J. Cell Clon., 1989;7:242-256.

Masui H., Kawamoto T., Sato J.D., Wolf B., Sato G., Mendelsohn J., Growth Inhibition Of Human Tumor Cells In Athymic Mice By Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies, Cancer Res. 1984;44:10021007.

Dále, následující dokumenty uvádějí protinádorovou aktivitu inhibitorů protein tyrosin-kinas. Tyto dokumenty jsou zde uvedeny jako odkazy.

Buchdunger E., Trinks U., Mett H., Regenass U., Muller M., Meyer T., McGlynn E., Pinna L.A., Traxler P., Lydon N.B. 4,5-Bis(4-fluoroanilino)phthalimide: A Protein Tyrosine Kinase Inhibitor With Selectivity For The Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction Pathway And Potent In Vivo Antitumor Activity" Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1994;91 :2334-2338.

Buchdunger E., Mett H., Trinks U., Regenass U., Muller M., Meyer T., Beilstein P., Wirz B., Schneider P., Traxler P., Lydon N., 4,5-Bis(4-Fluoroanilino)Phthalimide: A Selective Inhibitor Of The Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction Pathway With Potent In Vivo Mdd Antitumor Activity, Clinical Cancer Research, 1995;1:813-821.

Sloučeniny, které jsou ireverzibilními inhibitory tyrosin-kinas, byly popsány v US patentech č. 5,457,105, 5,475,001, a 5,409,930 a v PCT přihláškách č. WO 9519774 a WO 9519970. Sloučenina podle předkládaného vynálezu, která je strukturálně odlišná od inhibitorů tyrosin-kinas popsaných ve výše uvedených dokumentech, je ireversibilním inhibitorem tyrosin-

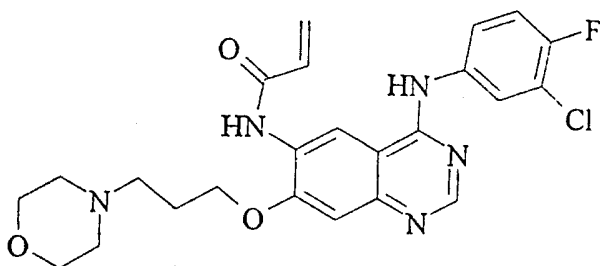
03.08.01

kinas.

PCT přihláška č. PCT/US97/05778 (přihláška č. WO 97/38983), která je zde uvedena jako odkaz, popisuje sloučeniny, které jsou ireversibilními inhibitory tyrosin-kinas.

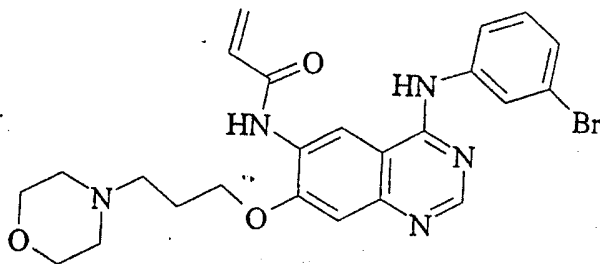
Generický vzorec uvedený v PCT přihlášce zahrnuje sloučeninu N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-chinazolin-6-yl)-akrylamid (zde "sloučeninu 1"), ale sloučenina 1 není v PCT přihlášce specificky uvedena.

Sloučenina 1 má následující chemickou strukturu:



Sloučenina 1

PCT přihláška popisuje v příkladu 21 sloučeninu N-[4-(3-bromfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)-propoxy]chinazolin-6-yl]-akrylamid, která má následující chemický vzorec:



Příklad 21

Sloučenina 1 se liší od sloučeniny příkladu 21 v substituci fenylového kruhu, který je navázán na chinolinovou skupinu prostřednictvím atomu dusíku. Fenylový kruh sloučeniny 1 je substituován ve 3-pozici chlorem a ve 4-pozici fluorem. Naopak, fenylový kruh sloučeniny příkladu 21 PCT přihlášky (zde "příklad 21") je substituován pouze ve 3-pozici bromem. Ačkoliv mají tyto dvě sloučeniny podobnou strukturu, vykazuje sloučenina 1 překvapivé a neočekávané vlastnosti in vivo ve srovnání se sloučeninou příkladu 21 PCT přihlášky.

Ještě překvapivější a neočekávanější je to, že sloučenina 1 a sloučenina příkladu 21 mají podobnou aktivitu in vitro v některých testech, ale mají výrazně odlišnou aktivitu in vivo.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje sloučeninu N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid, nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.

Vynález také poskytuje farmaceuticky přijatelný prostředek, který obsahuje N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid.

Vynález také zahrnuje způsob pro léčbu nádorů, při kterém je pacientovi s nádorovým onemocněním podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Ve výhodném provedení způsobu léčby nádorů je nádorem karcinom prsu.

03.08.01

Ve výhodném provedení způsobu léčby nádorů je nádorem karcinom tlustého střeva.

Vynález také zahrnuje způsob pro léčbu nebo prevenci restenozy, při kterém je pacientovi s restenozou nebo rizikem restenozy podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Vynález také zahrnuje způsob pro ireversibilní inhibici tyrosin-kinas, při kterém je pacientovi, který potřebuje inhibici tyrosin-kinas, podáno množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu inhibující tyrosin-kinasy.

Ve výhodném provedení způsobu pro ireversibilní inhibici tyrosin-kinas je tyrosin-kinasou EGFR.

Ve výhodném provedení způsobu pro ireversibilní inhibici tyrosin-kinas je tyrosin-kinasou erbB2.

Ve výhodném provedení způsobu pro ireversibilní inhibici tyrosin-kinas je tyrosin-kinasou erbB4.

Vynález také zahrnuje způsob pro léčbu psoriasy, při kterém je pacientovi s psoriadou podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Vynález také zahrnuje způsob pro aterosklerozu, při kterém je pacientovi s aterosklerozou podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Vynález také zahrnuje způsob pro léčbu endometriosy, při kterém je pacientovi s endometrií podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Vynález také zahrnuje způsob pro inhibici sekrece VEGF, při kterém je pacientovi, který potřebuje inhibici sekrece VEGF, podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Vynález také zahrnuje způsob pro inhibici fosforylace tyrosinu erbB3, při kterém je pacientovi, který potřebuje inhibici fosforylace tyrosinu erbB3, podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje sloučeninu N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid (sloučeninu 1), nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.

Sloučenina 1 je ireversibilní inhibitor tyrosin-kinas, konkrétně EGFR tyrosin-kinasy. Mezi další tyrosin-kinasy, které mohou být inhibovány sloučeninou 1, patří FGFR, PDGFR, c-src, erbB2 a erbB4. Terapeuticky účinné množství sloučeniny 1 může být podáno pacientovi s nádorem, pacientovi s restenózou nebo s rizikem restenózy, pacientovi s psoriázou, aterosklerózou nebo rizikem aterosklerózy, nebo

s endometriosou. Odborníci v oboru snadno identifikují pacienty s nádorem, restenosou, psoriasou, aterosklerosou nebo endometriosou, nebo pacienty s rizikem restenozy nebo atherosklerozy. Například, pacienti s rizikem restenozy jsou pacienti po angioplastice, by-passu nebo transplantaci. Obdobně, mezi pacienty s rizikem vzniku atherosklerozy patří pacienti, kteří jsou obézní, jedí mnoho tuků, mají vysoké hladiny cholesterolu nebo mají hypertensi. Termín "pacient" označuje zvířata, jako jsou psi, kočky, krávy, ovce, a také zahrnuje lidi.

Termín "nádorové onemocnění" zahrnuje, například, následující nádory: prsu, vaječníků, čípku děložního, prostaty, varlat, jícnu, glioblastom, neuroblastom, žaludku, kůže (keratoakantom), plic (epidermoidní karcinom, velkobuněčný karcinom, adenokarcinom), kosti, tlustého střeva (adenokarcinom, adenom), štítné žlázy (folikulární karcinom, nediferencovaný karcinom, papilární karcinom), seminom, melanom, sarkom, karcinom močového měchýře, karcinom jater a žlučových cest, karcinom ledvin, nádorová onemocnění myeloidní řady, nádorová onemocnění lymfoidní řady (Hodgkinova nemoc, vlasatobuněčná leukemie), nádory dutiny ústní, rtu, jazyku, úst, hltanu, tenkého střeva, tlustého střeva - rekta, mozku a centrálního nervového systému a leukemie.

Mezi výhodné nádory, které mohou být léčeny sloučeninou 1, patří karcinom prsu, tlustého střeva, rekta a vaječníků.

D81e, sloučenina 1 může být použita pro léčbu pacientů, kteří potřebují inhibici sekrece vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF). Mezi pacienty potřebující inhibici sekrece VEGF patří pacienti s nádory, diabetickou retinopatií, revmatoidní artritidou, psoriasou, restenosou, aterosklerosou,

osteoporosou, endometriosou, pacienti při implantaci embrya nebo pacienti s jiným onemocněním, při kterém hraje úlohu angiogenese nebo neovaskularizace.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro inhibici fosforylace tyrosinu erbB3. Pacienti, kteří potřebují inhibici fosforylace tyrosinu erbB3 jsou pacienti, kteří mají nebo jsou riziková z hlediska onemocnění uvedených v souvislosti s inhibicí EGFR a inhibicí sekrece VEGF.

Sloučenina 1 může být podána lidem nebo zvířatům orálně, rektálně, parenterálně (intravenosně, intramuskulárně nebo podkožně), intracisternálně, intarvaginálně, intraperitoneálně, intravesikálně, lokálně (prášky, masti a nebo kapky) nebo ve formě bukalních nebo nasálních sprejů. Sloučenina může být podána samostatně nebo jako součást farmaceuticky přijatelného prostředku, který obsahuje farmaceuticky přijatelné přísady.

Prostředky vhodné pro parenterální injekce mohou obsahovat fyziologicky přijatelné sterilní vodné nebo nevodné roztoky, disperze, suspenze nebo emulze, a sterilní prášky pro rekonstituci do sterilních injekčních roztoků nebo disperzí. Příklady vhodných vodných a nevodných nosičů, ředidel, rozpouštědel nebo vehikul zahrnují vodu, ethanol, polyoly (propylenglykol, polyethylenglykol, glycerol a podobně), jejich směsi, rostlinné oleje (jako je olivový olej) a injekční organické estery, jako je ethyloleat. Správná tekutost může být udržována, například, použitím potahů jako je lecitin, udržování vhodné velikosti částic v případě disperze a použitím surfaktantů.

Tyto prostředky mohou také obsahovat pomocná činidla, jako jsou konzervační činidla, smáčivá činidla, emulgační činidla a dávkovací činidla. Prevence působení mikroorganismů může být zajištěna různými antibakteriálními a antimykotickými činidly, jako jsou například parabeny, chlorbutanol, fenol, kyselina sorbová a podobně. Může být žádoucí použití činidel upravujících izotonicitu, jako jsou například cukry, chlorid sodný a podobně. Prodloužené absorpce injekčních farmaceutických forem může být dosaženo za použití činidel oddalujících absorpci, jako je například monostearan hlinitý a želatina.

Mezi pevné dávkové formy pro orální podání patří kapsle, tablety, pilulky, prášky a granule. V takových pevných dávkových formách je aktivní sloučenina smísena s alespoň jednou běžnou přísadou (nebo nosičem), jako je citrat sodný nebo fosforečnan vápenatý nebo (a) plnivy nebo činidly zvyšujícími objem, jako jsou například škroby, laktosa, sacharosa, glukosa, manitol a kyselina křemičitá; (b) pojivy, jako je například karboxymethylcelulosa, alginaty, želatina, polyvinylpyrrolidon, sacharosa a arabská klovatina; (c) zvlhčovacími činidly, jako je například glycerol; (d) činidly podporujícími rozpadavost, jako je například agar-agar, uhličitan vápenatý, bramborový nebo tapiokový škrob, kyselina alginová, některé komplexní křemičitany a uhličitan sodný; (e) činidly zpomalujícími rozpouštění, jako je například parafin; (f) činidly zrychlujícími absorpci, jako jsou například kvarterní amoniové sloučeniny; (g) smáčivými činidly, jako je například cetyl alkohol a glycetolmonostearat; (h) adsorbenty, jako je například kaolin nebo bentonit; a (i) kluznými činidly, jako je například talek, stearan hořečnatý, pevné polyethylenglykoly, lauryl síran sodný nebo jejich

směsi. V případě kapslí, tablet a pilulek mohou tyto dávkové formy obsahovat také pufrovací činidla.

Pevné prostředky podobného typu mohou být použity také jako náplně kapslí z tuhé nebo měkké želatiny, za použití přísad jako je laktosa nebo mléčný cukr, stejně jako polyethylenglykoly s vysokou molekulovou hmotností a podobně.

Pevné dávkové formy, jako jsou tablety, dražé, kapsle, pilulky a granule mohou být připraveny s potahy nebo obaly, jako jsou enterální potahy a jiné potahy známé v oboru. Tyto potahy mohou obsahovat činidla nepropustná pro světlo a mohou mít takové složení, že uvolňují aktivní sloučeninu v některé části střevního traktu. Příklady prostředků pro inkorporaci aktivní složky jsou polymerické substance a vosky. Aktivní sloučenina může být také v mikroenkapsulované formě, pokud je to vhodné, tak s jednou nebo více z výše uvedených přísad.

Kapalné dávkové formy pro orální podání zahrnují farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a elixíry. Kapalné dávkové formy mohou kromě aktivní sloučeniny obsahovat inertní ředidla běžně používaná v oboru, jako je voda a jiná rozpouštědla, solubilizační činidla a emulgační činidla, jako je například ethylalkohol, isopropylalkohol, ethylkarbonat, ethylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, dimethylformamid, oleje, konkrétně olej z bavlníkových semen, podzemnicový olej, kukuřičný olej, olivový olej, ricinový olej a sezamový olej, glycerol, tetrahydrofurfurylalkohol, polyethylenglykoly a sorbitanové estery mastných kyselin nebo směsi těchto substancí, a podobně.

Kromě inertních ředidel může prostředek také obsahovat pomocná činidla, jako jsou smáčivá činidla, emulgační nebo suspendační činidla, sladidla, chuťová korigens a činidla upravující vůni prostředku.

Suspenze může kromě aktivní sloučeniny obsahovat suspendační činidla, jako jsou například ethoxylované isostearylalkoholy, polyoxyethylensorbitan a sorbitanové estery, mikrokystalická celulóza, metahydroxid hlinitý, bentonit, agar-agar a tragant, nebo směsi těchto substancí a podobně.

Prostředky pro rektální podání jsou výhodně čípky, které mohou být připraveny smísením sloučenin podle předkládaného vynálezu s vhodnými nedráždivými přísadami nebo nosiči, jako je kakaové máslo, polyethylenglykol nebo čípkový vosk, které jsou pevné při teplotě místnosti, ale kapalné při tělesné teplotě a proto tají v rektu nebo vagíně a uvolňují aktivní složku.

Mezi dávkové formy pro lokální podání patří masti, prášky, spreje a inhalační prostředky. Aktivní složka se smísí za sterilních podmínek s fyziologicky přijatelným nosičem a jakýmkoliv konzervačním činidlem, pufrem nebo hnacím plynem, které jsou potřebné. Oftalmologické prostředky, oční masti, prášky a roztoky také spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

Termín "farmaceuticky přijatelné soli, estery, amidy a proléčiva", jak je zde použit, označuje ty karboxylátové soli, adiční soli s aminokyselinami, estery, amidy a proléčiva sloučeniny podle předkládaného vynálezu, které jsou podle lékařských znalostí vhodné pro použití v kontaktu s tkáněmi

pacienta bez nežádoucí toxicity, dráždění, alergické reakce a podobně, s přijatelným poměrem přínos/riziko, a účinné pro požadované použití, stejně jako formy sloučenin podle předkládaného vynálezu tvořené obojetnými ionty. Termín "soli" označuje relativně netoxické adiční soli sloučenin podle předkládaného vynálezu s organickými a anorganickými kyselinami. Tyto soli mohou být připraveny in situ během konečné izolace a přečištění sloučeniny nebo samostatně reakcí přečištěné sloučeniny ve formě volné baze s vhodnou organickou nebo anorganickou kyselinou a izolací takto vzniklé soli. Příklady solí je hydrochlorid, hydrobromid, síran, kyselý síran, dusičnan, octan, šťavelan, valerat, oleat, palmitat, stearat, laurat, boritan, benzoat, laktat, fosforečnan, tosylat, citrat, maleinan, fumarat, jantaran, vinan, naftylat, mesylat, glukohexanoat, laktobionat a laurysíran a podobně. Tyto soli mohou obsahovat kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin, jako je sodík, lithium, draslík, vápník, hořčík a podobně, stejně jako netoxické ammoniové, kvarterní ammoniové a aminové kationty včetně například ammonia, tetramethylammonia, tetraethylammonia, methylaminu, dimethylaminu, trimethylaminu, triethylaminu, ethylaminu a podobně (viz například S.M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 1977; 66: 1-19, která je zde uvedena jako odkaz).

Příklady farmaceuticky přijatelných, netoxických esterů sloučenin podle předkládaného vynálezu zahrnují C₁-C₆alkyl estery, kde alkylová skupina má přímý nebo rozvětvený řetězec. Přijatelnými estery jsou také C₅-C₇cykloalkyl estery, stejně jako arylalkyl estery, jako například benzyl estery. Výhodné jsou C₁-C₄alkyl estery. Estery sloučenin podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny běžnými technikami.

Příklady farmaceuticky přijatelných, netoxických amidů sloučenin podle předkládaného vynálezu zahrnují amidy odvozené od amoniaku, primárních C₁-C₆alkylaminů a sekundárních C₁-C₆dialkylaminů, kde alkylová skupina má přímý nebo rozvětvený řetězec. V případě sekundárních aminů může být amin také ve formě 5- nebo 6-členného heterocyklu obsahujícího jeden atom dusíku. Výhodné jsou amidy odvozené od amoniaku, primárních C₁-C₃alkylaminů a sekundárních C₁-C₂dialkylaminů. Amidy sloučenin podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny běžnými metodami.

Termín "proléčivo" označuje sloučeniny, které jsou rychle transformovány in vivo za vzniku původní sloučeniny výše uvedeného vzorce, například hydrolýzou v krvi. Podrobnosti týkající se proléčiv jsou uvedeny v T. Higuchi and V. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems", svazek 14 A.C.S. Symposium Series, a v Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward, B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, které jsou zde uvedeny jako odkazy.

Sloučenina podle předkládaného vynálezu může být podána pacientovi v dávce v rozmezí od přibližně 0,1 do přibližně 1000 mg na den. Pro normálního lidského dospělého jedince o tělesné hmotnosti přibližně 70 kg je dostatečná dávka v rozmezí od přibližně 0,01 do přibližně 100 mg na kg tělesné hmotnosti na den. Přesná použitá dávka může být, nicméně, různá. Dávka závisí na různých faktorech, jako jsou požadavky pacienta, závažnost léčeného onemocnění a farmakologická aktivita použité sloučeniny. Stanovení optimálních dávek pro jednotlivé pacienty je dobře známé odborníkům v oboru.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou existovat jako nerozpuštěné formy, stejně jako formy rozpuštěné ve

farmaceuticky přijatelných rozpouštědlech, jako je voda, ethanol a podobně. Obecně, rozpuštěné formy jsou pro účely předkládaného vynálezu považovány za rovnocenné nerozpuštěným formám.

Předpokládá se, že sloučenina 1 může být produkována synteticky stejně jako biologicky, například metabolicky.

Následující příklady ilustrují jednotlivá provedení vynálezu a nijak neomezují předkládaný vynález, včetně patentových nároků.

Příklady provedení vynálezu

Sloučenina 1 může být syntetizována následujícím způsobem:

N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid

Stupeň A: N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenyl)amino]-7-fluor-6-nitrochinazolin

Práškový 4-chlor-7-fluor-6-nitrochinazolin (J. Med. Chem. 1996; 39: 918) (82,77 g, 363,7 mmol) se přidá po dávkách během 10 minut k mechanicky mísenému roztoku 3-chlor-4-fluoranilinu (53,183 g, 365,3 mmol) a N,N-dimethylanilinu (88,5 g, 730 mmol) v isopropanolu (1,09 l) pod atmosférou dusíku v ledové lázni. Ledová lázeň se odstraní na konci přidávání a směs se mísí při teplotě 25°C po dobu 6 hodin. Směs se potom znovu ochladí na ledové lázni a po kapkách se za mísení přidá voda (200 ml) a potom vodný roztok Na₂CO₃ (10% hmot./obj., 200 ml). Po dalších 10 minutách se směs přefiltruje přes Buchnerovu nálevku a reziduální pevná látka se vypláchne ředěným roztokem

NaHCO₃ (nasyceným/5, 2 x 100 ml), vodou (2 x 100 ml) a isopropanolem (2 x 100 ml). Směs se suší vzduchem a potom se suší ve vakuové pícce přes P₂O₅ při 75 °C po dobu 12 hodin za zisku 4-[(3-chlor-4-fluorofenyl)amino]-7-fluor-6-nitrochinazolinu (110,71 g, 90,4%) ve formě hořčicově žluté pevné substance. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 10,44 (s, 1 H, NH), 9,51 (d, J= 8,0 Hz, 1 H, H-5), 8,67 (s, 1 H, H-2), 8,07 (dd, J= 2,7, 6,8 Hz, 1 H, H-2'), 7,79 (d, J= 12,4 Hz, 1 H, H-8), 7,74 (ddd, J= 2,7, 4,2, 9,0 Hz, 1 H, H-6'), 7,43 (t, J= 9,2 Hz, 1 H, H-5').

Stupeň B: 4-[(3-chlor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]-6-nitrochinazolin

Roztok trimethylsilanolatu draselného (57,73 g, 0,45 mol) v dimethylsulfoxidu (DMSO) (150 ml) se po kapkách přidá během 50 minut do světle žluté kaše 4-[(3-chlor-4-fluorofenyl)amino]-7-fluor-6-nitrochinazolinu (50,503 g, 150 mmol) a 3-(4-morfolin)propan-1-olu (32,67 g, 225 mmol) v DMSO (250 ml), mísené důkladně pod N při 25 °C ve vodní lázni. Ihned vznikne tmavě červené zabarvení a na konci adice vznikne tmavá červeno-černá viskosní směs. Po 6 hodinách se reakční směs pomalu naleje na mísený led-vodu (4 l) obsahující nasycený roztok Na₂CO₃ (150 ml). Po stání po dobu 13 hodin se oranžovo-červená kaše získá Buchnerovou filtrací. Sraženina se vypláchne ředěným roztokem NaOH (0,05 M, 500 ml; 0,02 M, 500 ml), ředěným roztokem NaHCO₃ (nasyceným/5, 500 ml) a vodou (2 x 500 ml) a suší se vzduchem a potom se suší ve vakuové pícce přes P₂O₅ při 50 °C po dobu 12 hodin za zisku 4-[(3-chlor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]-6-nitrochinazolinu (62,47 g, 89% korigovaný) ve formě světel oranžovo-žluté pevné látky. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 10,11 (s, 1 H, NH), 9,18 (s, 1 H, H-5), 8,65 (s, 1 H, H-2), 8,15 (dd, J = 2,4, 6,8 Hz, 1 H, H-

2'), 7,79 (ddd, $J = 2,7, 4,3, 9,0$ Hz, 1 H, H-6'), 7,45 (t, $J = 9,0$ Hz, 1 H, H-5'), 7,44 (s, 1 H, H-8), 4,32 (t, $J = 6,1$ Hz, ArOCH_2), 3,57 ($J = 4,5$ Hz, 4 H, H-2 morfolin), 2,45 (t, $J = 6,5$ Hz, 2 H, NCH_2), 2,34 (brs, 4 H, H-3 morfolin), 1,93 (pentet, $J = 6,5$ Hz, 2 H, H-2 propoxy).

Stupeň C: 6-amino-4-[(3-chlor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]chinazolin

Roztok 4-[(3-chlor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3(4-morfolin)-propoxy]-6-nitrochinazolinu (62,9 g, 136,2 mmol) v tetrahydrofuranu (THF) (1200 ml) se hydrogenuje přes Raneyho nikl (20 g) při 50 psi a 23°C po dobu 17,67 hodin. Přidá se další Raneyho nikl (20 g) a směs se hydrogenuje po dobu dalších 4,33 hodin za stejných podmínek. Reakční směs se přefiltruje přes celit a rozpouštědlo se odpaří za redukováného tlaku za zisku 6-amino-4-[(3-chlor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]chinazolinu (57,81 g, 97,6% korigovaný) ve formě světla zeleného pevného materiálu. ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 9,40 (s, 1 H, NH), 8,38 (s, 1 H, H-2), 8,20 (dd, $J = 2,5, 7,0$ Hz, 1 H, H-2'), 7,79 (ddd, $J = 2,5, 4,5, 9,0$ Hz, 1 H, H-6'), 7,40 (s, 1 H, H-5), 7,40 (t, $J = 9,1$ Hz, 1 H, H-5'), 7,08 (s, 1 H, H-8), 5,38 (brs, NH_2), 4,19 (t, $J = 6,1$ Hz, ArOCH_2), 3,58 (t, $J = 4,4$ Hz, 4 H, H-2 morfolin), 2,49 (t, $J = 7,0$ Hz, 2 H, NCH_2), 2,36 (brs, 4 H, H-3 morfolin), 1,97 (pentet, $J = 6,5$ Hz, 2 H, H-2 propoxy).

Stupeň D: N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid

Isobutylchlorformiat (27,2 g, 0,20 mol) se po kapkách přidá během 10 minut do roztoku kyseliny akrylové (14,40 g, 0,20 mol) a triethylaminu (40,48 g, 0,40 mol) v THF (800 ml)

míseného pod dusíkem při 0°C. Po dalších 10 minutách se bílá kaše přenesse do chladicí lázně o teplotě -25°C a mísí se pod dusíkem po dobu 20 minut. Po kapkách se během 1,33 hodiny přidá 6-amino-[(3-chlor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]chinazolin (43,19 g, 0,100 mol) v THF (500 ml). Teplota chladicí lázně se upraví na -20°C, a po dalších 2,33 hodinách se reakce utlumí přidáním vody (100 ml) v jednom podílu. Po 20 minutách se reakční směs vnese na drcený led (2 kg), víří se a postupně se ředí vodou (5 l). Směs se nechá odstát po dobu 16 hodin a potom se filtruje přes Buchnerovu nálevku. Sraženina se vypláchne vodou (2 x 1 l), suší se vzduchem po dobu 18 hodin a potom se suší ve vakuové pícce přes P₂O₅ při 60 °C po dobu 16 hodin za zisku surového N-[4-[(3-chlor-4-fluorfenyl)-amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]-chinazolin-6-yl]-akrylamidu (35,76 g, 73% nekorigovaný) ve formě zeleno-žlutého pevného materiálu. Z původní kapaliny se vysráží další pevný materiál, který se filtruje přes Buchnerovu nálevku, promyje se vodou (1 l) a suší se vzduchem po dobu 14 hodin za zisku dalšího surového materiálu (4,73 g, 10% nekorigovaný) ve formě zeleno-žlutého pevného materiálu. Rekrytalizací tohoto materiálu z DMSO se získá nazpět 55% tohoto materiálu ev formě světle žlutého - khaki částečného hydratu. t.t. 186,5-188,5 °C. Vypočteno pro C₂₄H₂₅N₅O₃ClF.0,85 H₂O: C, 57,61; H, 5,37; N, 13,97%. Zjištěno: C, 57,51; H, 5,26; N, 13,88%. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 9,81 (s, 1 H, NH), 9,63 (s, 1 H, NH), 8,87 (s, 1 H, H-S), 8,54 (s, 1 H, H-2), 8,15 (dd, J= 2,5, 7,0, 1 H, H-2'), 7,81 (ddd, J= 2,7, 4,4, 9,0 Hz, 1 H, H-6'), 7,43 (t, J= 9,1 Hz, 1 H, H-5'), 7,30 (s, 1 H, H-8), 6,72 (dd, J= 10,1, 17,0 Hz, 1 H, H-2 akryloyl), 6,32 (d, J= 9, 17,0 Hz, 1 H, H-3 akryloyl), 5,83 (dd, J= 1,9, 10,1, Hz, 1 H, H-3 akryloyl), 4,27 (t, J= 6,2 Hz, ArOCH₂), 3,58 (t, J= 4,4 Hz, 4 H, H-2 morfolin), 2,48 (t, J= 7,1 Hz, 2 H, NCH₂). 2,36 (brs, 4 H, H-3 morfolin), 2,00 (pentet, J = 6,5 Hz, 2 H, H-2 propoxy).

Hmotnostní spektrum APCI 489,2 (9), 488,2 (35), 487,2 (26), 486,2 (100).

Sloučenina příkladu 21 PCT přihlášky č. PCT/US97/05778 může být syntetizována následujícím způsobem:

Sloučenina příkladu 21: N-[4-(3-bromfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolin)propoxy]chinazolin-6-yl]akrylamid

Sodík (27,6 mmol, 0,63 g) se přidá do roztoku 3-morfolinpropan-1-olu (22,0 mmol, 3,20 g) v THF (60 ml) pod atmosférou N₂. Vzniklá suspenze se mísí při 20 °C a potom se kanylou přidá do roztoku 4-[(3-bromfenyl)amino]-7-fluor-6-nitro-chinazolinu (J. Med. Chem.. 1996(39):918) (2,0 g, 5,51 mmol) v THF (50 ml) pod atmosférou N₂. Roztok se potom zahřívá při teplotě zpětného toku po dobu 24 hodin a potom se naředí vodou a extrahuje se EtOAc. Kombinované organické extrakty se suší přes bezvodý Na₂SO₄, zahustí se za redukováného tlaku a zpracují se chromatografií na oxidu hlinitém za eluce EtOAc/hexanem (1:1) až MeOH/CH₂Cl₂/EtOAc (2:3:5) za zisku 4-[(3-bromfenyl)-amino]-7-[(3-morfolin)propoxy]-6-nitrochinazolinu 1,75 g, 65%) ve formě světle žlutého prášku, t.t. (MeOH) 216-220°C. ¹H NMR [(CD₃)₂SO]: δ 10,12 (s, 1H, NH), 9,24 (s~ 1H, aromatický), 8,69 (s, 1H, aromatický), 8,19 (t, J = 1,8 Hz, 1 H, H-2'), 7,88 (dt, 1d = 7,8 Hz, J = 1,4 Hz, 1H, H-6'), 7,49 (s, 1H, aromatický), 7,38 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H-5'), 7,34 (dt, J_d = 8,1 Hz, J_t = 1,4 Hz, 1 H, H-4'), 4,35 (t, J = 6,2 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 3,58 (t, J = 4,6 Hz, 4H, morfolinmethylen), 2,45 (t, J = 7,0 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₂), 2,37 (br s, 4H, morfolinmethylen), 1,94 (kvintet, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂). ¹²C NMR: δ 157,76, 157,26, 153,76, 153,21, 140,32, 138,86, 130,37, 126,38, 124,26, 121,70, 121,13, 120,72, 110,11, 107,88, 67,87, 66,13 (x2), 54,42, 53,28 (x2), 25,30.

Analýza vypočtená pro $C_{21}H_{22}BrN_5O_4 \cdot 0,75 H_2O$ vyžaduje:

C, 50,3; H, 4,7; N, 14,0%.

Zjištěno: C, 50,3; H, 4,4; N, 13,8%.

Čerstvě promytý (1N HCl a potom destilovaná H_2O) železný prášek (12 mmol, 0,686 g) se po částech přidá do refluxujícího roztoku výše uvedeného nitrochinazolinu (1,50 g, 3,07 mmol) v EtOH/ H_2O (2:1, 80 ml), který obsahuje ledovou kyselinu octovou. Vzniklá suspenze se zahřívá při teplotě zpětného toku za důkladného mísení po dobu 20 minut a potom se ochladí, alkalizuje se přidáním koncentrovaného NH_3 a přefiltruje se přes vrstvu celitu. Celitová vrstva se promyje EtOH a potom se filtrát zahustí za redukováného tlaku, ředí se vodou a extrahuje se EtOAc. Kombinované organické extrakty se suší přes bezvodý Na_2SO_4 , zahustí se za redukováného tlaku a zpracují se chromatografií na oxidu hlinitém grade III za eluce CH_2Cl_2 /EtOAc (1:1) až MeOH/EtOAc (2:98) za zisku 6-amino-4-[(3-bromfenyl)-amino]-7-[(3-morfolin)propyloxy]chinazolinu (1,08 g, 77%) ve formě světle hnědého prášku, t.t. (EtOAc/hexan) 158-160 °C.

1H NMR [$(CD_3)_2SO$], (400 MHz): δ 9,37 (s, 1H, NH), 8,40 (s, 1H, aromatický), 8,24 (t, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-2'), 7,86 (ddd, $J = 8,2, 0,8, 1,8$ Hz, 1H, H-6'), 7,42 (s, 1H, aromatický), 7,30 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-5'), 7,21 (ddd, $J = 8,2, 1,0, 1,9$ Hz, 1H, H-4'), 7,09 (s, 1H, aromatický), 5,36 (s, 2H, NH_2), 4,20 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2O$), 3,59 (t, $J = 4,6$ Hz, 4H, morfolin-methylen), 2,50 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2$), 2,39 (br s, 4H, morfolinmethylen), 1,99 (kvintet, $J = 6,7$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$).

^{13}C NMR: δ 154,88, 151,94, 150,19, 144,84, 141,94, 138,50, 130,16, 124,66, 123,02, 121,09, 119,65, 110,42, 106,37, 100,81, 66,45, 66,14 (x2), 54,77, 53,29 (x2), 25,50.

Analýza vypočítaná pro $C_{21}H_{24}BrN_5O_2 \cdot 0,25 H_2O$ vyžaduje:

C, 54,5; H, 5,3; N, 15,1%.

Zjištěno: C, 54,6; H, 5,5; N, 15,0%.

Do míseného roztoku výše uvedeného 6-amino-chinazolinu (0,50 g, 1,09 mmol), kyseliny akrylové (6 mol, 6,54 mmol, 449 μ l) a Et_3N (nadbytku, 2,0 ml) v DMF (20 ml) pod atmosférou N_2 se přidá 1-(3-dimethyl-aminopropyl)-3-ethylkarbodiimid, hydrochlorid ($\text{EDCl} \cdot \text{HCl}$) (3 mol, 3,27 mmol, 627 mg). Reakční směs se mísí při 0 $^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut a potom se nechá ohřát na teplotu místnosti a mísí se po dobu dalších 2 hodin. Rozpouštědlo se odstraní za redukováného tlaku a získaný zbytek se naředí nasyceným roztokem NaHCO_3 a opakovaně se extrahuje EtOAc . Kombinované organické extrakty se promyjí solankou, suší se přes bezvodý Na_2SO_4 a zahustí se za redukováného tlaku. Po chromatografii na oxidu hlinitém grade III za eluce EtOAc /hexan (9:1) až MeOH / EtOAc (2:98) se získá N-[4-[(3-bromfenyl)amino]-7-[(3-morfolin)propyloxy]-chinazolin-6-yl]akrylamid (329 mg, 59%) ve formě krémově zbarveného prášku, t.t. (EtOAc / Et_2O /hexan) 170-172 $^\circ\text{C}$.

^1H NMR [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 9,78 (s, 1H, CONH), 9,62 (s, 1H, NH), 8,89 (s, 1H, aromatický), 8,56 (s, 1H, aromatický), 8,18 (t, J = 1,9 Hz, 1H, H-2'), 7,88 (br d, J = 8,2 Hz, 1H, H-6'), 7,34 (t, J = 8,1 Hz, 1H, H-5'), 7,30 (s, 1H, aromatický), 7,27 (ddd, J = 7,9, 1,4, 0,8 Hz, 1H, H-4'), 6,72 (dd, J = 17,0, 10,2 Hz, 1H, CH_2CHCO), 6,33 (dd, J = 17,0, 1,9 Hz, 1H, CH_2CHCO), 5,83 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H, CH_2CHCO), 4,27 (t, J = 6,3 Hz; 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,58 (t, J = 4,6 Hz, 4H, morfolinmethylen), 2,48 (t, J = 7,1 Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,38 (br s, 4H, morfolinmethylen), 1,99 (kvintet, J = 6,7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

^{13}C NMR: δ 163,49, 156,68, 154,96, 153,92, 149,19, 141,20, 131,58, 130,19, 127,16, 126,95, 125,52, 123,97, 121,03, 120,52, 116,78, 108,80, 107,28, 66,96, 66,14 (x2), 54,54,

53,28 (x2), 25,31.

Analýza vypočítaná pro $C_{24}H_{26}BrN_5O_2 \cdot 0,5 H_2O$ vyžaduje:

C, 55,3; H, 5,2; N, 13,4%.

Zjištěno: C, 55,3; H, 4,9; N, 13,3%.

Srovnávací testy

Tkáňová kultura

A431 lidské buňky epidermoidního karcinomu a MDA-MB-453 buňky byly získány z American Type Culture Collection, Rockville, MD a byly uchovávány jako monovrstvy v DMEM (Dulbeccove modifikovaném Eaglově mediu)/F12, 50:50 (Gibco/BRL, Bethesda, MD) obsahujícím 10% fetální hovězí sérum. Buňky byly kultivovány při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂ ve vzduchu.

Přečištění tyrosin-kinasy receptoru pro epidermální růstový faktor

Lidská tyrosin-kinasa receptoru pro EGF (EGFR) byla izolována z A431 buněk lidského epidermoidního karcinomu následujícím způsobem. Buňky byly kultivovány ve válcovitých zkumavkách v DMEM/F12 mediu (Gibco/BRL, Bethesda, MD) obsahujícím 10% fetální telecí sérum. Přibližně 10⁹ buněk bylo lyzováno ve 2 objemech pufru obsahujícího 20 mM Hepes, pH 7,4, 5 mM EGTA, 1% Tritonu X-100, 10% glycerolu, 0,1 mM ortovanadatanu sodného, 5 mM fluoridu sodného, 4 mM pyrofosforečnanu, 4mM benzamidu, 1 mM DTT, 80 µg/ml aprotininu, 40 µg/ml leupeptidu a 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF). Po odstředění při 25000 x g po dobu 10 minut se supernatant aplikoval do fast Q sepharosové kolony (Pharmacia Biotech,

Inc., Piscataway, NJ) a eluoval se lineárním gradientem od 0,1 M NaCl do 0,4 M NaCl v 50 mM Hepes, 10% glycerolu, pH 7,4. Enzymaticky aktivní frakce se shromáždily, rozdělily se do podílů a uskladnily se při -100°C . Tyrosin-kinasy receptoru pro fibroblastový růstový faktor (FGFR), trombocytární růstový faktor (PDGF), insulin a c-src se získaly způsoby dobře známými odborníkům v oboru. Viz například Fry et al., "Strategies For The Discovery Of Novel Tyrosine Kinase Inhibitors With Anticancer Activity, Anticancer Drug Design, 1994; 9: 331-351, která je zde uvedena jako odkaz.

Tyrosin-kinasové testy

Enzymové testy pro stanovení IC_{50} byly provedeny v 96-jamkových filtračních plotnách (Millipore MADVN6550, Millipore, Bedford, MA). Celkový objem byl 0,1 ml a obsahoval 20 mM Hepes, pH 7,4, 50 μM vanadatu sodného, 40 mM chloridu hořečnatého, 10 μM ATP obsahující 0,5 μCi [^{32}P]ATP, 20 μg kyseliny polyglutamové/tyrosinu (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 10 ng tyrosin kinasy receptoru pro EGF, a vhodné ředění inhibitoru. Všechny složky kromě ATP se přidaly do jamky a plotna se inkubovala za třepání po dobu 10 minut při 25°C . Reakce se zahájila přidáním [^{32}P]ATP a plotna se inkubovala při 25°C po dobu 10 minut. Reakce se ukončila přidáním 0,1 ml 20% kyseliny trichloroctové (TCA). Plotna se ponechala při teplotě 4°C po dobu alespoň 15 minut, aby se umožnilo vysrážení substrátu. Jamky se potom promyly 5-krát 0,2 ml 10% TCA a inkorporace ^{32}P se určila β -čtečkou ploten (Wallac). Testy využívající intracelulárních kinasových domén PDGF, FGF a insulinových receptorů, stejně jako c-src, byly provedeny stejně jako pro EGF receptor s tou výjimkou, že reakce se účastnil chlorid manganatý.

Testy fosforylace tyrosinu závislé na Heregulinu a EGF

A431 buňky lidského epidermoidního karcinomu nebo MDA-MB-453 buňky se kultivovaly v 6-jamkových plotnách do přibližně 80% konfluence a potom se inkubovaly v bezsérovém mediu po dobu 18 hodin. Buňky se vystavily působení různých koncentrací buď sloučeniny 1 nebo sloučeniny příkladu 21 po dobu 2 hodin a potom se stimulovaly buď 100 ng/ml EGF (A431) nebo 10 ng/ml heregulinu (MDA-MB-453) po dobu 5 minut. Připravily se buněčné extrakty a westernovým přenosem se určila redukce fosfotyrosinu.

Westernový přenos

Extrakty se připravily lýzou monovrstev ve 0,2 ml vroucího Laemliho pufru (2% dodecylsírán sodný, 5% β -merkapt ethanol, 10% glycerol a 50 mM Tris, pH 6,8) a lyzáty se zahřívaly po dobu 5 minut při teplotě 100 °C. Proteiny v lyzátu se separovaly elektroforesou na polyakrylamidovém gelu a elektroforeticky se přenesly na nitrocelulosu. Membrána se promyla jednou v (10 mM Tris, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,01% azid sodný) (TNA) a blokovala se přes noc v TNA obsahujícím 5% hovězí sérový albumin a 1% ovalbumin. Membrána se zpracovávala po dobu 2 hodin antifosfotyrosinovou protilátkou (UBI, Lake Placid, NY, 1 μ g/ml v blokovacím pufru) a potom se dvakrát promyla v TNA, jednou v TNA obsahujícím 0,05% Tween-20 a 0,05% nonidet P-40 a dvakrát v TNA. Membrány se potom inkubovaly po dobu 2 hodin v blokovacím pufru obsahujícím 0,1 μ Ci/ml [125 I]proteinu A a potom se znovu promyly stejným způsobem jako dříve. Poté, co skvrny uschly, se vložily do filmové kazety a exponovaly se na X-AR-rentgenovém filmu po dobu 1 až 7 dnů. Intenzity proužků se určily laserovým densitometrem.

Data v tabulce 1 ukazují, že sloučenina příkladu 21 a sloučenina 1 jsou přibližně stejně aktivní proti přečištěné tyrosin-kinase EGF receptoru, autofosforylaci receptoru zprostředkované EGF a fosforylaci tyrosinu zprostředkované heregulinem in vitro.

Sloučenina	IC ₅₀ (nM) Tyrosin-kinasy receptoru pro EGF	IC ₅₀ (nM) autofosforylace receptoru zprostředkované EGF	IC ₅₀ (nM) fosforylace tyrosinu zprostředkované heregulinem
Příklad 21	3,6	5,3	6,4
Sloučenina 1	2,0	2,9	9,0

Test inhibice nádorů in vivo

Lidský epidermoidní karcinom A431 byl propagován in vivo sériovou transplantací. Tento nádorový model byl vybrán pro tyto studie pro známou závislost růstu na EGF receptoru a pro svou reaktivitu v časném stadiu na terapii monoklonálními protilátkami in vivo. V tomto pokusu byly holým myším o hmotnosti 18-22 g implantovány podkožně 30 mg fragmenty A431 nádoru do oblasti pravé axily v den 0. Nádory se nechaly narůst do hmotnosti 100-150 mg a v tuto dobu se zvířata s nádory náhodně rozdělila a umístila se do léčebných boxů. Zvířata se léčila perorálně po dobu 15 následujících dnů isethionatovou solí sloučeniny příkladu 21 a sloučeniny 1 ve vodě. Isethionatové soli mohou být připraveny titrací sloučeniny do roztoku se 2 ekvivalenty kyseliny isethionové. Léčba byla založena na průměrné hmotnosti skupiny. Kontrolním zvířatům byla podána voda. Pokus se hodnotil podle zpomalení růstu nádoru, T-C, který je definován jako rozdíl, ve dnech,

v dosažení hmotnosti 750 mg pro léčené a kontrolní nádory. Data mohou být také uvedena jako procento inhibice růstu nádorů, které je definováno jako zpomalení růstu nádorů děleno počet léčebných dávek x 100%. Větší zpomalení růstu nádoru a vyšší inhibice růstu nádoru ukazují na aktivnější sloučeniny. Statistická analýza byla provedena za použití JMP pro Macintosh (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Testovaná sloučenina	Dávka (mg/kg)	Zpomalení růstu nádoru (dny)	Inhibice růstu nádoru (%)
Příklad 21	18	18,4	123
Příklad 21	5	25,7	171
Sloučenina 1	18	41,3	275
Sloučenina 1	5	53,2	355

Hodnoty pro sloučeninu 1 jsou statisticky významně odlišné od hodnot pro sloučeninu příkladu 21 v čase nutném pro to, aby jednotlivé nádory dosáhly hmotnosti 750 mg. $P < 0,05$, student t-test.

Test na sekreci VEGF

Předpokládá se, že vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), který je také známý jako faktor cévní permeability (VPF), je hlavním stimulatorem angiogenese u většiny typů nádorů. Existuje mnoho induktorů sekrece VEGF a dvěma nejúčinnějšími jsou epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor α , které jsou oba ligandy pro EGF receptor (EGFR).

Inhibice sekrece VEGF vede k antiangiogennímu účinku a může vést k regresi nádoru, protože i částečná inhibice sekrece VEGF může vést k destrukci nově vytvořených nezralých cév

v nádorech (Benjamin, L.E. and Keshel, E., Conditional switching of VEGF expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regresion of hemangioma-like vessels by VEGF withdrawal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997; 94: 8761-8766).

Srovnávali jsem dva inhibitory EGFR tyrosin-kinasy, sloučeninu 1 a sloučeninu příkladu 21, z hlediska jejich účinku na A431 nádorové buňky. Proti A431 nádorům in vivo má sloučenina 1 neočekávaně vyšší protinádorovou účinnost (T-C = 53 dnů) než sloučenina příkladu 21 (T-C = 26 dnů). Viz test popsany výše. Potom jsme hodnotili efekty obou sloučenin na sekreci VEGF v A431. K našemu překvapení byla sloučenina 1 lepší v inhibici sekerce VEGF v A431 buňkách in vitro. Při 0,5 μM blokovala sloučenina 1 sekreci VEGF stimulovanou EGF nebo TGF- α . naopak, 0,5 μM sloučeniny příkladu 21 inhibovalo sekreci VEGF téměř stejně, jako 0,1 μM sloučeniny 1. 0,1 μM sloučeniny 1 inhibovalo sekreci VEGF stimulovanou EGF o 63% a 0,5 μM inhibovalo tuto sekreci VEGF stimulovanou EGF o 86%. Naopak, 0,1 μM sloučeniny příkladu 21 inhibovalo sekreci VEGF stimulovanou EGF o 48% a 0,5 μM sloučeniny příkladu 21 inhibovalo tuto sekreci VEGF stimulovanou EGF o 57%. Podobné výsledky byly získány za použití TGF α místo EGF pro stimulaci sekrece VEGF. 0,5 μM sloučeniny 1 inhibovalo sekreci VEGF stimulovanou TGF α o více než 80%, zatímco stejná koncentrace sloučeniny příkladu 21 inhibovala sekreci VEGF o 57%. Také se zdá, že sloučenina 1 inhibuje bazální sekreci VEGF v A431 buňkách, zatímco sloučenina příkladu 21 nikoliv.

Metody

A431 lidské buňky epidermoidního karcinomu, získané z

American Type Culture Collection, Rockville, MD, byly kultivovány DMEM/F12 mediu doplněném 10% fetálním hovězím sérem. Před přidáním léku a růstového faktoru se buňky promyly třikrát v bezsérovém DMEM/F12. Buňky se ošetřovaly po dobu 2 hodin uvedenou koncentrací sloučeniny 1 nebo sloučeniny příkladu 1 a potom se přidalo 10 ng/ml buď EGF, nebo TGF α . Po 48 hodinové inkubaci při 37 °C se medium odstranilo a skladovalo se zmrazené při -70 °C. VEGF ELISA testy (Intergen, Co., Purchase, NY) se provedly na vzorcích media podle návodu výrobce. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny následující tabulce.

Ošetření	Sekrece VEGF (pg/10 ⁵ buněk $\pm$ SE)	% Inhibice
Bezsérové medium (SF)	490 $\pm$ 32	
SF + 0,1 μ M sloučeniny 1	280 $\pm$ 41	43
SF + 0,5 μ M sloučeniny 1	250 $\pm$ 46	49
SF + 0,1 μ M sloučeniny příkladu 21	600 $\pm$ 37	0
SF + 0,5 μ M sloučeniny příkladu 21	440 $\pm$ 110	10
SF + 10 ng/ml EGF	3980 $\pm$ 85	
SF + EGF + 0,1 μ M sloučeniny 1	1490 $\pm$ 180	63
SF + EGF + 0,5 μ M sloučeniny 1	560 $\pm$ 29	86
SF + EGF + 0,1 μ M sl. příkladu 21	2070 $\pm$ 160	48
SF + EGF + 0,5 μ M sl. příkladu 21	1710 $\pm$ 65	57
SF + TGF α	4034 $\pm$ 190	
SF + TGF + 0,1 μ M sloučeniny 1	1976 $\pm$ 37	51
SF + TGF + 0,5 μ M sloučeniny 1	766 $\pm$ 75	81
SF + TGF + 0,1 μ M sl. příkladu 21	3065 $\pm$ 161	24
SF + TGF + 0,5 μ M sl. příkladu 21	1734 $\pm$ 21	57

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Sloučenina N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamid, nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

2. Farmaceuticky přijatelný prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu podle nároku 1.

3. Způsob léčby nádorů v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle nároku 1 pacientovi s nádorem.

4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádorem je nádor prsu.

5. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádorem je nádor tlustého střeva.

6. Způsob léčby nebo prevence restenozy v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle nároku 1 pacientovi s restenozou nebo rizikem restenozy.

7. Způsob pro ireversibilní inhibici tyrosin-kinas v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání množství sloučeniny podle nároku 1 inhibujícího tyrosin-kinasy pacientovi s potřebou inhibice tyrosin-kinas.

8. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že tyrosin-kinasou je EGFR.

9. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že tyrosin-kinasou je erbB2.

10. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že tyrosin-kinasou je erbB4.

11. Způsob pro pro inhibici fosforylace tyrosinu erbB3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacientovi, který potřebuje inhibici fosforylace tyrosinu erbB3, je podáno terapeuticky účinné množství N-[4-(3-chlor-4-fluor-fenylamino)-7-(3-morfolin-4-yl-propoxy)-chinazolin-6-yl]-akrylamidu.

12. Způsob léčby psoriasis v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle nároku 1 pacientovi s psoriasou.

13. Způsob léčby nebo prevence aterosklerosy v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle nároku 1 pacientovi s aterosklerosou nebo rizikem aterosklerosy.

14. Způsob léčby endometriosy v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle nároku 1 pacientovi s endometriosou.

15. Způsob pro inhibici sekrece VEGF v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle nároku 1 pacientovi s potřebou inhibice sekrece VEGF.