



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0021384

(51)⁷ **C07D 239/94, A61P 35/00, A61K**
31/517

(13) **B**

(21) 1-2010-02141

(22) 18.01.2008

(86) PCT/IN2008/000036 18.01.2008

(87) WO2009/090661 23.07.2009

(45) 25.07.2019 376

(43) 27.12.2010 273

(73) NATCO PHARMA LIMITED (IN)

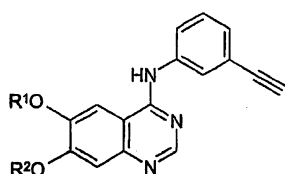
Natco House, Road No. 2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 50003-3, India

(72) JYOTHI PRASAD, Ramanadham (IN), ADIBHATLA KALI SATYA, Bhujanga Rao (IN), NAGESHWARA RAO, Bollepalli (IN), VENKAIAH CHOWDARY, Nannapaneni (IN)

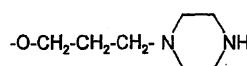
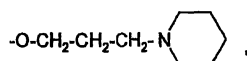
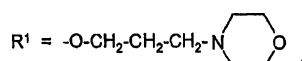
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)

(54) **QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ DẪN XUẤT 6,7-DIALKOXY QUINAZOLIN HỮU DỤNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ RỐI LOẠN LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH UNG THƯ**

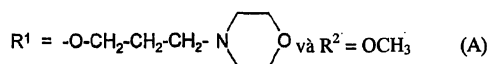
(57) Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế dẫn xuất 6,7-dialkoxy quinazolin hữu dụng để điều trị rối loạn liên quan đến bệnh ung thư, trong đó một số lớn các hợp chất hóa học có dấu hiệu cấu trúc mới được tổng hợp và sàng lọc. Quy trình điều chế dẫn xuất quinazolin có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) cho hợp chất quinazolin phản ứng với phosphoryl clorua hoặc oxalyl clorua để thu được hợp chất 4-clo quinazolin và b) cho hợp chất 4-cloquinazolin phản ứng với 3-etynyl anilin để thu được dẫn xuất quinazolin có công thức (I).



(I)



và $R^2 = OCH_3, OC_2H_5$



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế dẫn xuất 6,7-dialkoxy quinazolin hoặc muối được dụng của nó, trong đó dẫn xuất này có hoạt tính chống bệnh ung thư và do đó là hữu dụng trong các phương pháp điều trị cho người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hầu hết các phác đồ điều trị bệnh tăng sinh như bệnh vảy nến và bệnh ung thư trước đây sử dụng hợp chất ức chế tổng hợp ADN. Các hợp chất này là độc với tế bào và tác dụng có lợi của chúng chỉ nhận được khi chúng thể hiện tính chọn lọc với việc phân chia nhanh chóng tế bào khối u.

Trong những năm gần đây, đã phát hiện ra rằng tế bào có thể trở thành dạng ung thư bởi vì sự biến nạp một phần ADN của nó vào gen đột biến gây bệnh ung thư, nghĩa là gen mà khi hoạt hóa dẫn đến sự tạo thành tế bào khối u ác tính (Bradshas, Mutagenesis, 1986, 1: 91). Một số gen đột biến gây bệnh ung thư mã hóa các enzym tyrosin kinaza và các thụ thể yếu tố sinh trưởng nhất định cũng là enzym tyrosin kinaza (Larsen et al., Ann. Reports in Med. Chem. 1989, Chapt.13).

Tyrosin kinaza thụ thể là quan trọng trong việc truyền tín hiệu sinh hóa mà khởi đầu sự sao chép tế bào. Chúng có vùng liên kết ngoại bào như các yếu tố sinh trưởng như yếu tố sinh trưởng biểu bì và một phần nội bào có chức năng làm kinaza để phosphoryl hóa tyrosin axit amin trong các protein và do đó tác động đến sự tăng sinh tế bào. Đã biết rằng các kinaza này thường xuyên có mặt ở các bệnh ung thư phổ biến ở người như ung thư vú (Saimbury et al., Brit. J. Cancer, 1988, 58: 458), ung thư dạ dày-ruột như ung thư ruột kết, trực tràng và dạ dày (Bolen et al., Oncogene Res., 1987,1: 149). Đã phát hiện ra rằng hoạt

tính tyrosin kinaza (hoạt tính TK) có thể phát hiện thường xuyên hơn ở tế bào ác tính so với tế bào bình thường (Hunter, Cell, 1987, 50: 823).

Gần đây, đã phát hiện ra rằng thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) có hoạt tính TK được biểu hiện quá mức ở nhiều bệnh ung thư ở người như não, tế bào vảy ở phổi, bàng quang, dạ dày, vú, đầu và cổ, thực quản, tuyến giáp và tương tự. (WJ. Gullick, Brit. Med. Bull. 1991, 47: 87). Thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGFR), một thành viên của họ tyrosin kinaza thụ thể (Receptor Tyrosin Kinaza: RTK) gồm có bốn thụ thể Erb1/HER1, Erb/HER2, Erb/HER3 và Erb/HER4.

Một biện pháp quan trọng để ức chế hoạt tính EGFR-TK đang khám phá các phân tử tổng hợp nhỏ (Arteaga CL, Exp. Cell Res., 2003, 284: 122-130). Các dẫn xuất quinazolin nhất định như gefitinib (IressaTM, Astra Zeneca), erlotinib (OSI-774, TarcevaTM), PD-183805, PKI-166, EKB-569, PD-168393, CGP-59362 đã được khảo sát rộng rãi về các lựa chọn điều trị có thể đối với một số dạng bệnh ung thư (Baselga et al., Oncology 2002, 63: 6-16, Cohen RB., Clin. Colorectal Cancer, 2003,2: 246-251). Các đơn patent Châu Âu số EP 0566226, EP0602851A1, EP 0635507 A1, EP 0635498 A1, EO 0520722 A1 mô tả các dẫn xuất quinazolin nhất định có đặc tính chống ung thư là kết quả của đặc tính ức chế TK của chúng.

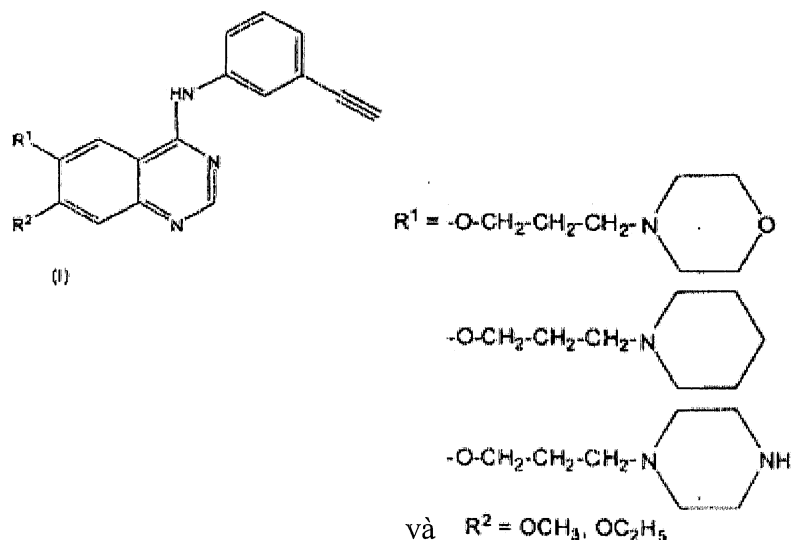
Các patent Mỹ số US 5475001, US 5457105, US 5616582, US 5770599, US 5747498, US 6900221 v.v. đề cập đến các dẫn xuất quinazolin có các đặc điểm cấu trúc như gốc anilino được thế ở vị trí 4 và nhiều nhóm alkyl có nhóm chức khác nhau ở vị trí 6 và 7 của nhân quinazolin.

Cụ thể là, US 5457105, US 5616582 đề cập đến N-(3-clo-4-flophenyl)-7-metoxo-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin (Gefitinib) và US 5747498 và US 690221 đề cập đến N-(3-etylnylphenyl)-6,7-bis(2-metoxyetoxo)-4-quinazolinamin (Erlotinib). Các công bố đơn quốc tế số WO 20005/070909, WO 2007/060691 A2 và WO 06/090413 đề cập đến các biến đổi

khác nhau ở dạng tổng hợp hoặc đa hình của hai dược chất chống ung thư phổ biến này.

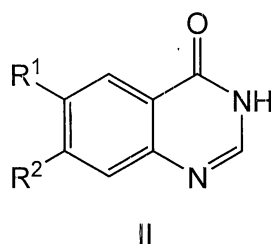
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình điều chế dẫn xuất quinazolin hữu dụng để điều trị rối loạn liên quan đến bệnh ung thư. Quy trình điều chế dẫn xuất quinazolin có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó

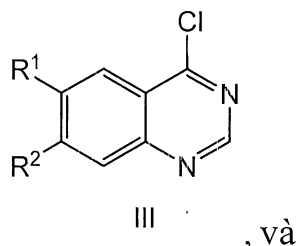


trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) cho quinazolin có công thức (II)



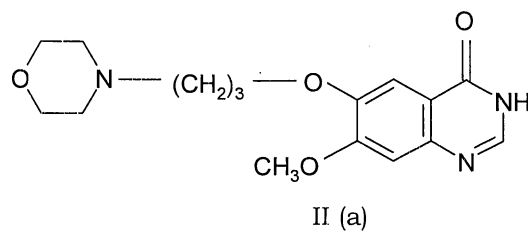
phản ứng với phosphoryl clorua hoặc oxalyl clorua để thu được 4-clo quinazolin có công thức (III)



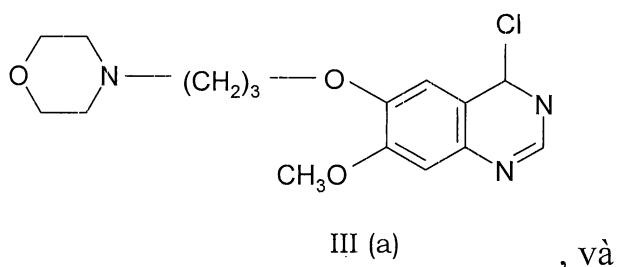
b) cho 4-cloquinazolin có công thức (III) ở trên phản ứng với 3-etylnyl anilin để thu được dẫn xuất quinazolin có công thức (I).

Sáng chế cũng đề xuất quy trình bao gồm các bước:

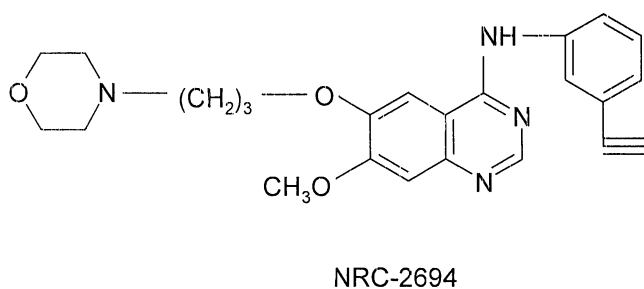
a) cho quinazolin có công thức (IIa)



phản ứng với phosphoryl clorua hoặc oxalyl clorua để thu được 4-cloquinazolin tương ứng có công thức (IIIa)

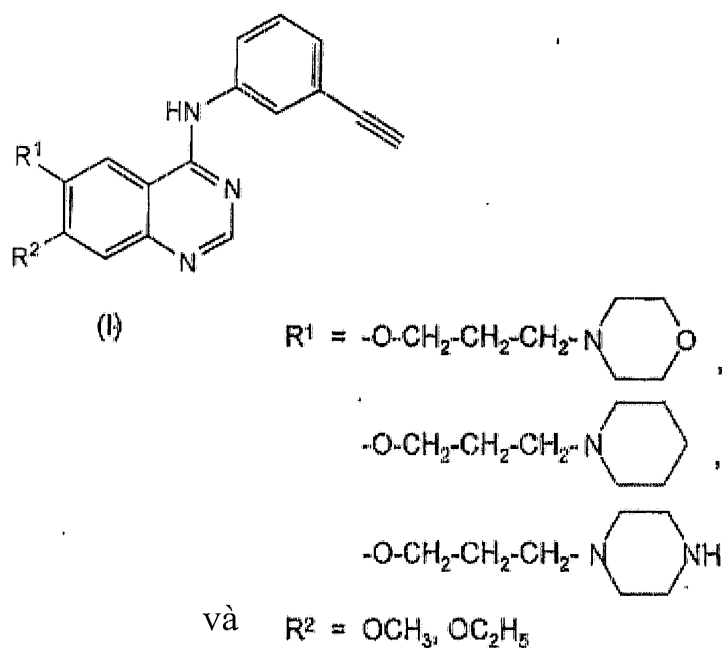


b) cho 4-cloquinazolin có công thức (IIIa) ở trên phản ứng với 3-etylnyl anilin để thu được dẫn xuất quinazolin NRC-2694

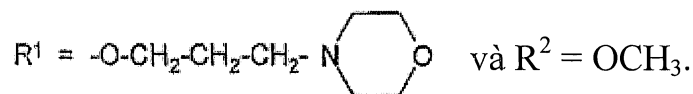


Trên quan điểm tiềm năng lớn của nhóm quinazolin của hợp chất mang lại, các tác giả sáng chế bắt đầu việc tổng hợp và sàng lọc một số lượng lớn các hóa chất có dấu hiệu cấu trúc mới. Ngạc nhiên và bất ngờ phát hiện ra rằng quinazolin có nhóm 3-etylnyl anilino ở vị trí 4 và cụ thể là nhóm alkoxy được thế ở vị trí 6 và 7, đem lại đặc tính chống tăng sinh đặc hiệu và được tăng cường nhiều khi so sánh với các thành viên nổi bật khác của nhóm quinazolin của dược chất. Tương tự, đáng ngạc nhiên là hợp chất theo sáng chế có độc tính ít hơn và profin độ an toàn rất có lợi cho ứng dụng điều trị. Các thực thể hóa học được mô tả trong sáng chế được ký hiệu bởi cấu trúc chung (I) và trước đây chưa được

tổng hợp cũng như là nghiên cứu về lợi ích điều trị và profin độ an toàn của chúng.



Hợp chất (I) là NRC-2694 khi



Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ thể hiện phân tích Western blot tế bào A549 được xử lý bằng erlotinib HCl và NRC 2694.

Hình 2 là sơ đồ thể hiện thử nghiệm xâm lấn Matrigel của tế bào H1299 được xử lý bằng erlotinib HCl và NRC 2694.

Hình 3 là sơ đồ thể hiện sự giảm kích thước khối u do sử dụng qua đường miệng và màng bụng Erlotinib HCl và NRC 2694 ở chuột trụi lông được cấy khối u phổi người A549.

Hình 4 là sơ đồ thể hiện phổi thu được từ chuột trụi lông với tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của Erlotinib HCl và NRC 2694 qua đường miệng hoặc màng bụng.

Hình 5 là sơ đồ thể hiện các lát cắt được nhuộm màu H&E đại diện của phổi mang khối u của chuột trụi lông sau khi điều trị bằng Erlotinib HCl và NRC 2694.

Hình 6 là sơ đồ thể hiện chuột trụi lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của Erlotinib HCl qua đường miệng và màng bụng.

Hình 7 là sơ đồ thể hiện chuột trụi lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của NRC 2694 qua đường miệng và màng bụng.

Hình 8 là sơ đồ thể hiện sự nghiên cứu hiệu quả của các NRC NCE liên quan đến các thụ thể khác như HER-1,2,3,4 và VEGFR in vitro.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình điều chế dẫn xuất 6,7-dialkoxy quinazolin hữu dụng để điều trị rối loạn liên quan đến bệnh ung thư, trong đó một số lớn các hợp chất hóa học có dấu hiệu cấu trúc mới được tổng hợp và sàng lọc. Muối mono HCl của NRC-2694 là NRC-2694 A và muối diHCl của NRC-2694 là NRC-2694 B. Hợp chất theo sáng chế đặc biệt là NRC-2694 có đặc tính chống ung thư/chống tăng sinh vượt trội bất ngờ và đem lại lợi ích điều trị so với các dược chất nổi bật của nhóm này như mô tả chi tiết dưới đây:

- 1) Nồng độ ức chế thấp: nồng độ ức chế (IC_{50}) trong phương pháp thử nghiệm tăng sinh MTT cho thấy giá trị nằm trong khoảng từ 40 đến 90ng/ml (100-200nm) trong khi đó erlotinib HCl có giá trị là 836ng/ml (1945nm). Thử nghiệm Western blot và xâm lấn Matrigel cũng xác nhận điều tương tự.
- 2) Thoái triển khối u hoàn toàn: Sự thoái triển khối u hoàn toàn được quan sát thấy bởi việc sử dụng qua đường miệng các hợp chất này ở chuột trụi lông được cấy tế bào khối u phổi người A549 ở liều 10mg/kg. Trong nghiên cứu so sánh, thậm chí ở liều

100mg/kg, erlotinib HCl không thể gây thoái triển khối u hoàn toàn. Kiểm tra bằng mắt mô phổi của chuột được cấy A549 và các thử nghiệm biểu hiện luxiferaza xác nhận quan sát tương tự.

- 3) Hiệu quả dược chất: đánh giá liều hiệu quả chỉ ra giá trị (ED_{50}) là 6,3mg/kg đối với hợp chất điển hình theo sáng chế nghĩa là, NRC-2694 trong khi đó giá trị thu được với erlotinib HCl là 22mg/kg.

Tác dụng chữa bệnh là 100% được quan sát thấy ở NRC-2694 so với chỉ 50-60% trong trường hợp của erlotinib HCl.

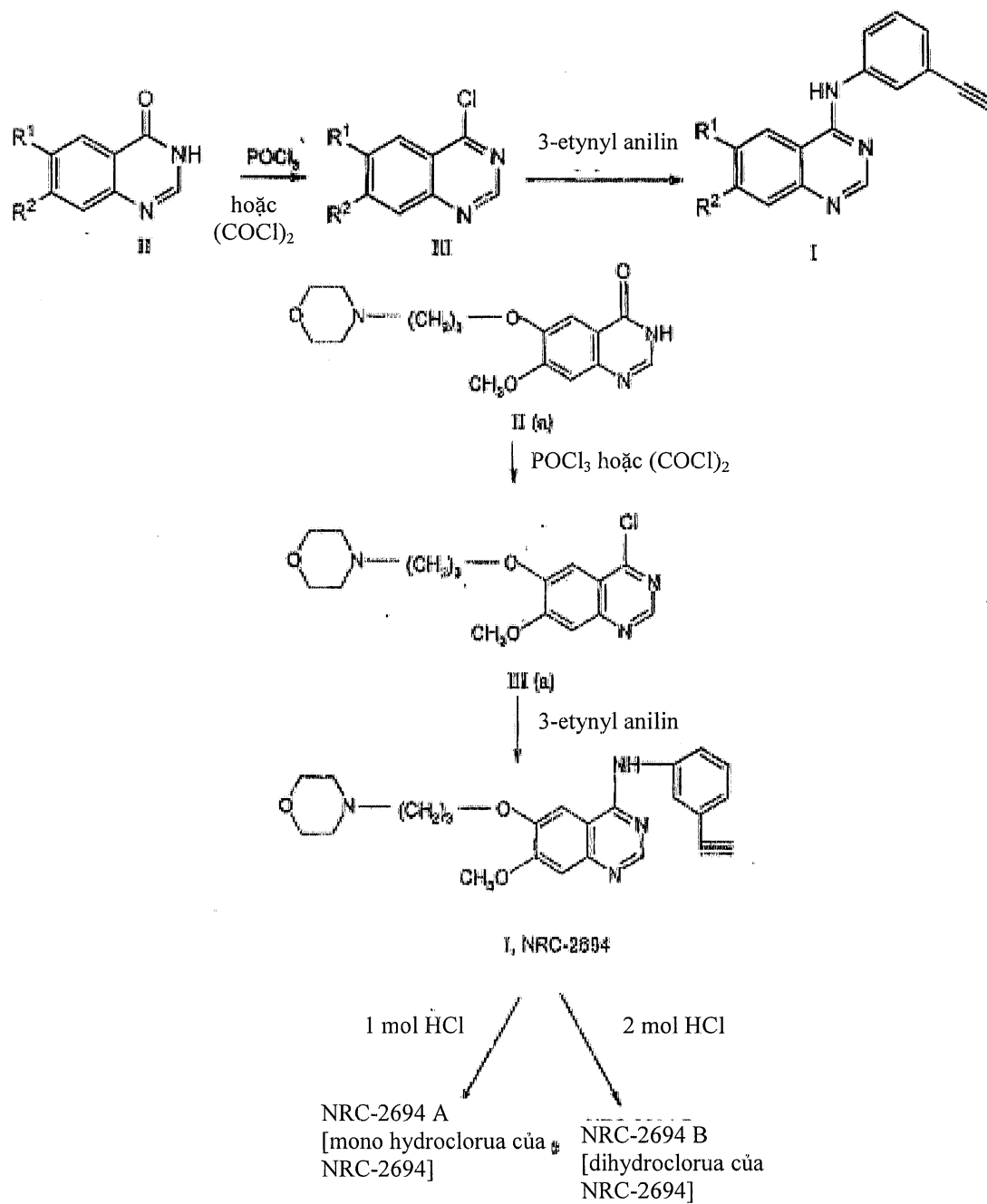
- 4) Chỉ định duy nhất bổ sung: Các hợp chất theo sáng chế cụ thể là NRC- 2694, thể hiện các chỉ định bổ sung như điều hòa giảm các mức biểu hiện của các thụ thể ErbB2, ErbB3, ErbB4 và VEGFR. Kết quả đặc biệt, rất nổi bật và ngạc nhiên này là hoàn toàn bất ngờ và không thấy ở tất cả các thụ thể với erlotinib HCl.
- 5) Profin độ an toàn: profin độ an toàn của các hợp chất theo sáng chế, đặc trưng là NRC-2694 là rất hứa hẹn và có lợi ích hoàn toàn lớn và bất ngờ. Do đó, NRC-2694 thể hiện liều dung nạp tối đa (Maximum Tolerated Dose: MTD) là 500mg/kg so với 2000mg/kg đối với erlotinib HCl.

Cửa sổ điều trị rộng đem lại bởi NRC-2694 được chứng minh bởi giá trị LD_0 của nó, là 2000mg/kg so với 500mg/kg của erlotinib HCl. Giá trị LD_{50} không thể được xác định cho NRC-2694, trong khi đó giá trị 805mg/kg được xác định đối với erlotinib HCl.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra nhằm mục đích minh họa quy trình điều chế hợp chất theo sáng chế và hiệu quả sinh học vượt trội của nó và do đó không được xem xét để làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Sơ đồ 1



Sơ đồ 1

Ví dụ 1

Điều chế N-(3-ethynylphenyl)-7-methoxy-6-[3-(4-morpholinyl)propoxy]-4-quinazolinamin (I, NRC-2694)

i) Điều chế 4-clo-6-[3-(4-morpholinyl)propoxy]-4-quinazolin (IIIa)

Bình đáy tròn bốn cổ dung tích 5 lít sạch và khô có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế được nạp clorofom (3000ml), dimetyl formamit (30ml) tiếp theo là 7-metoxi-6-(3-morpholino propoxy)-3,4-dihydro-quinazolin-4-on (IIa) (150g), thu được theo quy trình nêu trong ví dụ 1 của công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 2005/070909A1. Oxalyl clorua (120g) được thêm từ từ vào và khối phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ hồi lưu và duy trì ở nhiệt độ hồi lưu trong khoảng 5 giờ. Phản ứng được phát hiện là hoàn toàn bởi thử nghiệm HPLC. Dung môi clorofom và oxalyl clorua dư được chưng cất bằng cách sử dụng chân không nhẹ. Khối phản ứng được làm nguội đến khoảng 40°C và thêm clorofom (300ml) và lại chưng cất dung môi bằng cách sử dụng chân không nhẹ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ môi trường và axetonitril (3000ml) được thêm vào và khuấy trong 10-15 phút và giữ trong điều kiện nitơ để tiếp tục bước tiếp theo.

ii) Điều chế N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin (I, NRC-2694)

Bình đáy tròn bốn cổ dung tích 5 lít có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế chứa hợp chất clo trong axetonitril từ bước (i) ở trên được thêm từ từ 3-etylnyl anilin (69g) trong khoảng 10 đến 15 phút và khối phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ hồi lưu và duy trì ở nhiệt độ hồi lưu trong khoảng 4 giờ. Phản ứng được phát hiện là hoàn toàn bởi thử nghiệm HPLC. Sau đó khối phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ 25-35°C và lọc, rửa bánh bằng axetonitril (500ml) và làm khô bánh.

Hợp chất thô ở trên được đưa vào bình đáy tròn dung tích 5 lít khác và thêm nước (2500ml) và làm tăng nhiệt độ từ từ đến 60-65°C và điều chỉnh độ pH của khối phản ứng đến 10-12 bằng dung dịch natri hydroxit loãng. Sản phẩm rắn phân tách được lọc và rửa bằng nước và làm khô ở 70-75°C để thu được 173,0g N-(3-etylnylphenyl)-6-(3-morphilin propoxy)-7-metoxi-4-quinazolamin là chất rắn màu trắng đục.

iii) Kết tinh lại N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxo-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin từ toluen.

Bình đáy tròn bốn cổ dung tích 5 lít có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế được nạp toluen (3750ml), tiếp theo là N-(3-etylnylphenyl)-6-(3-morpholino propoxy)-7-metoxo-4-quinazolinamin (50g) thu được theo quy trình mô tả trong Ví dụ 1 ở trên. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt đến 90-95°C, để cho chất rắn hòa tan hoàn toàn. Sau đó xử lý cacbon và lọc. Dịch lọc được làm nguội đến 25-35°C, duy trì trong khoảng 1 giờ và lọc và làm khô nguyên liệu để lấy 40,15g N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxo-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin là chất rắn dạng tinh thể màu trắng.

Điểm nóng chảy: 185-187°C

Độ tinh khiết: 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}

^1H NMR (300MHz; DMSO- d_6): 9,57 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,99 (s, 1H); 7,86 đến 7,92 (d, 2H); 7,34 đến 7,44 (t, 1H) 7,18 đến 7,21 (s, 2H); 4,15 đến 4,21 (t, 4H); 3,92 (s, 3H) 3,5 đến 3,6 (t, 4H); 2,4 đến 2,52 (m, 5H); 1,95 đến 2,01 (m, 2H).

Khối lượng: 419,4 (M + 1)

Ví dụ 2

Kết tinh lại N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxo-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin từ axetonitril

Bình đáy tròn ba cổ dung tích 2 lít có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế được nạp axetonitril (1000ml), tiếp theo là N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxo-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin (25g) thu được từ quy trình mô tả trong Ví dụ 1 ở trên. Khối

phản ứng được gia nhiệt từ từ đến 65-70°C, để cho nguyên liệu rắn hòa tan hoàn toàn và xử lý cacbon và lọc khối phản ứng. Dịch lọc được chuyển sang bình đáy tròn khác và làm nguội từ từ đến 10-15°C và duy trì trong 30 phút ở nhiệt độ này. Khối được lọc và sau khi rửa bánh bằng axetonitril lạnh, làm khô để thu được 20,50g N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin là chất rắn dạng tinh thể màu trắng.

Điểm nóng chảy: 186-187°C

Độ tinh khiết: 99,68% (HPLC)

Ví dụ 3

Kết tinh lại N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin từ etyl axetat.

Bình đáy tròn ba cổ dung tích 2 lít có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế được nạp etyl axetat (2000ml), tiếp theo là N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin (25g) thu được từ quy trình mô tả trong Ví dụ 1 ở trên. Khối phản ứng được gia nhiệt từ từ đến 65-70°C, để cho nguyên liệu rắn hòa tan hoàn toàn và xử lý cacbon và lọc khối phản ứng. Dịch lọc được chuyển sang bình đáy tròn khác và làm nguội từ từ đến 10-15°C và duy trì trong 30 phút ở nhiệt độ này. Khối tinh thể được lọc và sau khi rửa bánh bằng etyl axetat làm khô để lấy 20,95g N-(3-etylnylphenyl)-6-(3-morpholino propoxy)-7-metoxi-4-quinazolinamin là chất rắn dạng tinh thể màu trắng.

Điểm nóng chảy: 185-187°C

Độ tinh khiết: 99,7% (HPLC)

Ví dụ 4

Điều chế N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholiny)propoxy]-4-quinazolinamin mono hydroclorua. (NRC-2694A)

Bình đáy tròn ba cổ dung tích 500ml có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế được nạp

rượu isopropylic (250ml), tiếp theo là N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxyl-6-[3-(4-morpholinyll)propoxy]-4-quinazolinamin (5g), thu được từ quy trình nêu trong Ví dụ 1. Nhiệt độ của khối phản ứng tăng lên 65-70°C để cho tất cả nguyên liệu rắn hòa tan và xử lý cacbon và lọc. Dịch được làm nguội đến nhiệt độ khoảng 55 đến 60°C và thêm vào dịch lọc này một mol đương lượng khí HCl hòa tan trong dung dịch rượu isopropylic khi muối mono hydroclorua tách ra. Khối phản ứng được duy trì ở nhiệt độ hồi lưu trong khoảng 2 giờ và sau đó làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và lọc và làm khô để lấy 5,1g N-(3-etylnyl phenyl)-6-(3-morpholino propoxy)-7-metoxyl-4-quinazolinamin mono hydroclorua là tinh thể màu trắng.

Độ tinh khiết: 99,8% (HPLC)

Hàm lượng HCl (hóa học): 8,19% (giá trị lý thuyết: 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.

Ví dụ 5

Điều chế N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxyl-6-[3-(4-morpholinyll)propoxy]-4-quinazolinamin di hydroclorua (NRC-2694B)

Bình đáy tròn ba cổ dung tích 500ml có thanh khuấy cơ học, bình ngưng hồi lưu, phễu góp cân bằng áp suất và ổ cắm nhiệt kế được nạp rượu isopropylic (250ml), tiếp theo là N-(3-etylnylphenyl)-7-metoxyl-6-[3-(4-morpholinyll)propoxy]-4-quinazolinamin (5g), thu được từ quy trình nêu trong Ví dụ 1. Nhiệt độ của khối phản ứng tăng lên 65-70°C để cho tất cả nguyên liệu rắn hòa tan. Xử lý cacbon và lọc. Dịch lọc được làm nguội đến nhiệt độ khoảng 55 đến 60°C và thêm vào dịch lọc này hai mol đương lượng của khí HCl hòa tan trong dung dịch rượu isopropylic khi muối dihydroclorua tách ra. Khối phản ứng được duy trì ở nhiệt độ hồi lưu trong khoảng 2 giờ và sau đó làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và lọc và làm khô để thu được 5,5g N-(3-etylnylphenyl)-7-

metoxy-6-[3-(4-morpholinyl)propoxy]-4-quinazolinamin dihydroclorua là tinh thể màu trắng.

Độ tinh khiết: 99,78% (HPLC)

Hàm lượng HCl (hóa học): 14,9% (giá trị lý thuyết: 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, 1218,3, 1157,1, 1132,7, 1105,9, 1075,6, 1001,9, 942,1, 875,3, 816,1, 787,2.

Ví dụ 6

Liều dung nạp tối đa (MTD) và đánh giá độc tính cấp (Bảng 1 và 2):

Nghiên cứu trích dẫn MTD sớm được thực hiện trên chuột Albino Thụy Sĩ đực và cái (trọng lượng 20-25g).

Nghiên cứu được thực hiện theo quy tắc hướng dẫn OECD 420, nghiên cứu được tiến hành từ 9 giờ sáng đến 5 giờ chiều để tránh chu kỳ ngày đêm, các hợp chất Erlotinib và NRC-2694 được tạo huyền phù trong 2% gôm acacia, các hợp chất được cho sử dụng ở các liều 5, 50, 300 và 2000mg/kg qua đường miệng (po: per oral). Liều trung gian được cho sử dụng tùy thuộc vào mức tử vong. Động vật được quan sát về sự thay đổi hành vi chính cứ mỗi giờ đến sáu giờ sau khi sử dụng thuốc. Quan sát thêm các con vật trong 72 giờ nếu có con nào tử vong. Động vật sống sót bị mổ xác để khám nghiệm để đánh giá sự hấp thu hợp chất qua đường dạ dày-ruột.

Độc tính cấp của Erlotinib và NRC-2694 được tiến hành ở chuột đực và chuột cái. Các liều 500, 750, 1000 và 2000mg/kg được cho sử dụng qua đường miệng. Mỗi nhóm gồm có 5 chuột. Các con chuột được quan sát về sự tử vong trong 14 ngày sau khi sử dụng hợp chất. Chuột sống sót bị mổ xác khám nghiệm để đánh giá sự hấp thu hợp chất qua đường dạ dày-ruột.

Giá trị LD_{50} được xác định bằng cách sử dụng Litchfield và Wilcoxon (J. Pharmacol.Exp. Ther.1949, 96: 99-113).

Kết quả của nghiên cứu độc tính được đưa vào các Bảng 1 và 2. Liều dung nạp tối đa (MTD) của erlotinib HCl được phát hiện là 500mg/kg (po) trong khi đó đối với NRC-2694, liều này là 2000mg/kg (po). Tương tự như vậy, LD₀ được phát hiện là 500mg/kg (po) đối với erlotinib HCl và 2000mg/kg (po) đối với NRC-2694. Do đó, độc tính thấp bất ngờ và đáng ngạc nhiên và profin độ an toàn của NRC-2694 so với erlotinib HCl được tạo nên.

Bảng 1

Nghiên cứu đánh giá sớm so sánh (mtd) của erlotinib. HCl và NRC-2694 (chuột)	
Hợp chất	MTD mg/kg (po)
Erlotinib HCl	500
NRC2694	2000

Bảng 2

Nghiên cứu giá trị LD ₅₀ cấp (liều đơn 7 ngày quan sát) ở chuột		
Hợp chất	LD ₀ mg/kg (po)*	LD ₅₀ mg/kg (po)
Erlotinib HCl	500	805
NRC2694	2000	-
*LD ₀ : Không quan sát thấy tử vong lúc cuối của thời gian 7 ngày.		

Ví dụ 7

Nghiên cứu đánh giá in vitro và in vivo và đánh giá hiệu quả điều trị

Các mẫu: Erlotinib được sử dụng làm dược chất tham chiếu đối chứng, hoạt tính sinh học của hợp chất mới theo sáng chế được thử nghiệm so sánh với dược chất này làm đối chứng dương

i) Thử nghiệm tăng sinh MTT:

Thử nghiệm MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoli bromua] được mô tả lần đầu tiên bởi Mosmann vào năm 1983 là dựa trên khả năng của enzym dehydrogenaza ty thể từ tế bào sống để phân giải các nhân tetrazoli của MTT vàng nhạt và tạo thành các tinh thể formazan màu xanh dương tối có thể thấm vào màng tế bào với lượng lớn, do đó tạo nên sự tích tụ của nó trong tế bào khỏe mạnh. Việc hòa tan tế bào bằng cách thêm chất tẩy dẫn đến sự giải phóng các tinh thể, đã hòa tan. Số tế bào sống sót tỷ lệ trực tiếp với mức sản phẩm formazan tạo ra. Sau đó màu có thể được định lượng bằng thử nghiệm đo màu đơn giản. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng các nồng độ từ 0 đến 1000ng/ml của Erlotinib và các hợp chất thử nghiệm trên tế bào A549 và H1299. Quy trình là dựa trên ATCC và theo hướng dẫn của nhà sản xuất (bảng danh mục số: 30-1010K)

Từ thử nghiệm tăng sinh MTT, xác định rằng nồng độ ức chế (IC_{50}) của các hợp chất theo sáng chế thay đổi từ 40 đến 90ng/ml (100-200nm) trong khi đó “Erlotinib hydroclorua” được sử dụng làm đối chứng dương có giá trị cao đến mức 836ng/ml (1945nm). Do đó có thể suy ra là hợp chất theo sáng chế có hiệu lực cao hơn erlotinib hydroclorua ít nhất mười lần.

ii) Phân tích Western blot: (Hình 1)

Các nồng độ được chất lý tưởng được xác định từ thử nghiệm tăng sinh MTT được sử dụng để điều trị 1×10^6 tế bào H1299 hoặc A549 trong môi trường thích hợp trong 72 giờ sau đó dịch tan tế bào được chiết và phân đoạn trên gel 10% SDS PAGE trong điều kiện khử. Gel được thấm tách trên màng nylon đã xử lý (Biorad) và được dò miễn dịch đối với EGFR, PI3K và AKT.

Sự thay đổi đáng kể về biểu hiện EGFR quan sát thấy theo cách phụ thuộc liều. NRC-2694 ở nồng độ 80ng (190nm) gây ra sự ức chế biểu hiện của EGFR có thể so sánh với erlotinib HCl ở nồng độ 800ng (1860nm). Do đó rõ ràng là hiệu quả của NRC-2694 gấp mười lần.

iii) Thử nghiệm xâm lấn Matrigel: (Hình 2)

Sự xâm lấn in vitro của các tế bào H1299 và A549 với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của hợp chất NRC (như được xác định bởi thử nghiệm MTT) được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm buồng Boyden có cải biến. Các tế bào được xử lý bằng các hợp chất này trong 48 giờ. 1×10^6 tế bào được tạo huyền phù trong 600 μ l môi trường không có huyết thanh được cung cấp 0,2% BSA và đặt ở ngăn trên của buồng chuyển lỗ (Corning Costar Fisher Scientific cat #07-200-158, Pittsburgh PA) được phủ matrigel (0,7mg/ml). Ngăn dưới của buồng được nạp 200 μ l môi trường không có huyết thanh và tế bào được để xâm nhập trong 24 giờ. Sau khi ủ, tế bào được cố định và nhuộm màu bằng Hema-3 và được định lượng như nêu trên (Mohanam et al. 1993). Tế bào đã xâm nhập được định lượng là phần trăm xâm lấn. Hợp chất NRC-2694 cho thấy sự giảm đáng kể xâm lấn theo cách phụ thuộc liều.

iv) Đánh giá in vivo về các khối u phổi dưới da ở chuột trụi lông (Hình 3):

Chuột trụi lông được cấy 2×10^6 tế bào A549 vào bên sườn chi sau bên phải. Khi quan sát khối u (>2 mm), chuột được cho sử dụng qua đường miệng hoặc màng bụng hợp chất thử nghiệm bao gồm erlotinib HCl được sử dụng làm đối chứng dương. Một liều 100mg/kg erlotinib HCl được xác định là liều ban đầu.

Kích thước khối u được đo và sự thoái triển hoàn toàn của khối u được quan sát thấy ở chuột được điều trị bằng NRC-2694 ở liều 10mg/kg. Tuy nhiên vẫn có khối u ở nhóm đối chứng được điều trị tương tự bằng erlotinib HCl thậm chí ở mức liều 100mg/kg. Do đó, mức vượt trội hiệu quả của hợp chất theo sáng chế (NRC-2694) gấp mười lần được chứng minh.

v) Đánh giá mô phổi lấy từ chuột trụi lông sau khi điều trị (Hình 4):

Phổi thu được từ chuột trụi lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được điều trị bằng các nồng độ khác nhau của erlotinib HCl và NRC-2694 qua đường miệng/màng bụng được kiểm tra về khối u còn lại.

Sự thoái triển hoàn toàn của khối u được quan sát thấy ở nhóm điều trị bằng NRC-2694, trong khi đó vẫn có khối u ở nhóm điều trị bằng erlotinib HCl, do đó chứng minh hiệu quả vượt trội bất ngờ không dự đoán được của hợp chất theo sáng chế.

vi) Kiểm tra bằng mắt khối u ở mô phổi: (Hình 5)

Chuột trụi lông được cấy bằng cách tiêm trong phổi tế bào A549. Chuột được điều trị qua đường miệng/màng bụng bằng erlotinib HCl và NRC 2694 ở các liều 2,5 và 20mg/kg. Ba mươi ngày sau khi điều trị hàng ngày bằng được chất, giết chuột và thu lấy phổi. Mô phổi được cố định trong 10% formaldehyt có chất đệm, gắn parafin và cắt. Các mảnh cắt được nhuộm màu H&E theo phương pháp đã ấn định để nhìn chất rắn hoặc khối u lan tỏa.

Nhóm được điều trị bằng NRC 2694 khỏe hơn nhóm điều trị bằng erlotinib HCl ở tất cả các mức liều do đó chứng minh hiệu quả vượt trội của NRC 2694.

vii) Chuột trụi lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549: (Hình 6 và 7)

Chuột trụi lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được điều trị bằng các nồng độ khác nhau của erlotinib HCl và NRC 2694 qua đường miệng và màng bụng được quan sát về khối u và các quan sát diễn tả bằng hình ảnh được đưa ra trong Hình 6 và Hình 7. Quan sát thấy rằng nhóm được điều trị bằng NRC 2694 khỏe hơn nhóm điều trị bằng erlotinib HCl rất nhiều. Không quan sát thấy khối u ở thời điểm cuối của 42 ngày điều trị bằng NRC 2694 trong khi đó vẫn có khối u ở nhóm điều trị bằng erlotinib HCl ở bằng đường miệng lẫn đường màng bụng.

viii) Hiệu quả chữa bệnh từ thử nghiệm in vivo ở chuột trụi lông:

Hiệu quả chữa bệnh là tỷ lệ số động vật chữa khỏi so với số động vật trong nghiên cứu được đưa vào bảng 3.

Bảng 3: Hiệu quả chữa bệnh của NRC-2694 và erlotinib HCl trên bệnh ung thư phổi

Dược chất	Nồng độ mg/kg	Tỷ lệ chữa bệnh
Erlotinib màng bụng	2,5	1/5
	5	2/5
	10	2/5
	10	3/5
Erlotinib đường miệng	2,5	2/5
	5	0/5
	10	1/5
	20	2/5
NRC 2694 màng bụng	2,5	1/5
	5	1/5
	10	3/5
	20	5/5 (100%)
NRC 2694 đường miệng	2,5	1/5
	5	2/5
	10	3/5
	20	3/5

Có thể thấy là tỷ lệ gần với 100% trong trường hợp NRC 2694 trong khi đó tỷ lệ nằm trong khoảng từ 40 đến 60% trong trường hợp nhóm nghiên cứu erlotinib HCl.

ix) Đánh giá giá trị ED_{50} :

Các giá trị ED_{50} được đánh giá dựa trên lát cắt phổi và các nghiên cứu thoái triển khối u. Giá trị 6,3mg/kg tính được đối với NRC 2694 trong khi đó giá trị thu được đối với erlotinib HCl là 22mg/kg qua đường miệng. Do đó hiệu quả vượt trội của hợp chất theo sáng chế được chứng minh.

x) Nghiên cứu với các thụ thể khác như HER-1, HER-2, HER-3, HER-4 và VEGFR in vitro (Hình 8):

Để xác định tác dụng của NRC 2694 trên các thụ thể khác nhau khác của họ EGFR (Erb/HER), tế bào ung thư phổi người A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của NRC 2694 cùng với erlotinib HCl trong so sánh song song. các Mức của Erb-1, Erb- 2, Erb-3, Erb-4 và VEGFR được xác định bằng phân tích thẩm tách Tây.

Quan sát thấy rằng mức NRC 2694 điều hòa giảm các mức Erb B2, Erb B3, Erb B4 và VEGFR một cách hiệu quả trong khi đó không thấy dấu hiệu này ở erlotinib HCl. Dấu hiệu ức chế bổ sung của các mức biểu hiện của các thụ thể nêu trên rõ ràng chứng minh đặc tính bất ngờ và không dự đoán được của phân tử chính theo sáng chế, đó là NRC 2694.

xi) Kết luận:

Đặc tính chống khối u vượt trội, bất ngờ, không dự đoán được và tiềm năng điều trị bổ sung của hợp chất theo sáng chế được chứng minh trong các thử nghiệm nêu trên so với erlotinib HCl.

Ví dụ 8

Sau đây là dạng liều đại diện minh họa chứa hợp chất có công thức NRC-2694 hoặc muối được dụng của nó, để sử dụng điều trị hoặc phòng bệnh ở người:

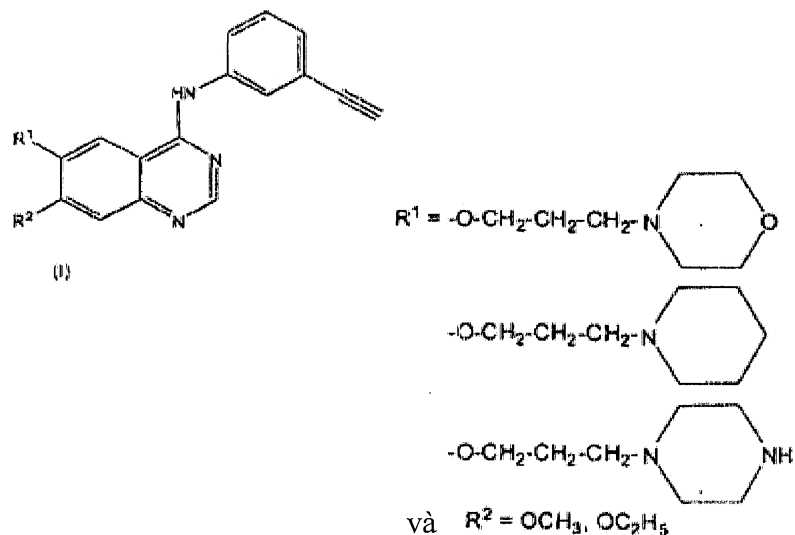
Viên nén	mg/viên nén
Hợp chất NRC-2694	50
Lactosa khan (USP)	156
Xenluloza vi tinh thể (Avicel pH102)	15
Natri lauryl sulfat	5
Natri tinh bột glycolat	10
Povidon K-30	3

21384

Hydroxy propyl xenluloza (LH-11)	10
Magie stearat	1

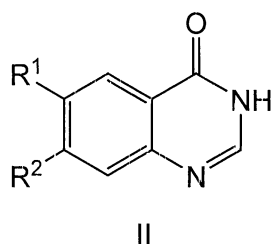
Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình điều chế dẫn xuất quinazolin có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó

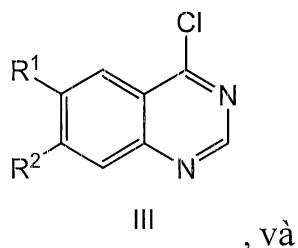


trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) cho quinazolin có công thức (II)



phản ứng với phosphoryl clorua hoặc oxalyl clorua để thu được 4-clo quinazolin có công thức (III)

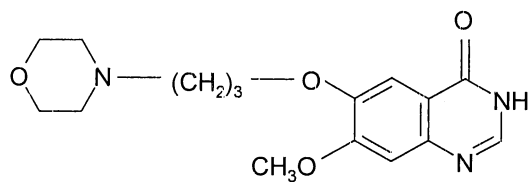


, và

b) cho 4-cloquinazolin có công thức (III) ở trên phản ứng với 3-etynyl anilin để thu được dẫn xuất quinazolin có công thức (I).

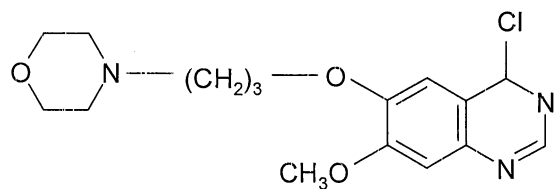
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) cho quinazolin có công thức (IIa)



II (a)

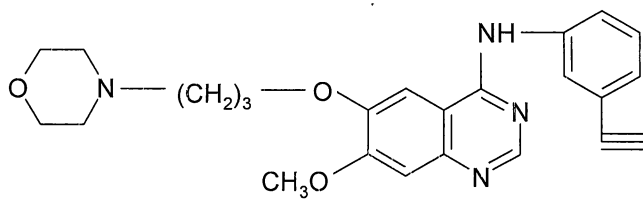
phản ứng với phosphoryl clorua hoặc oxalyl clorua để thu được 4-cloquinazolin tương ứng có công thức (IIIa)



III (a)

, và

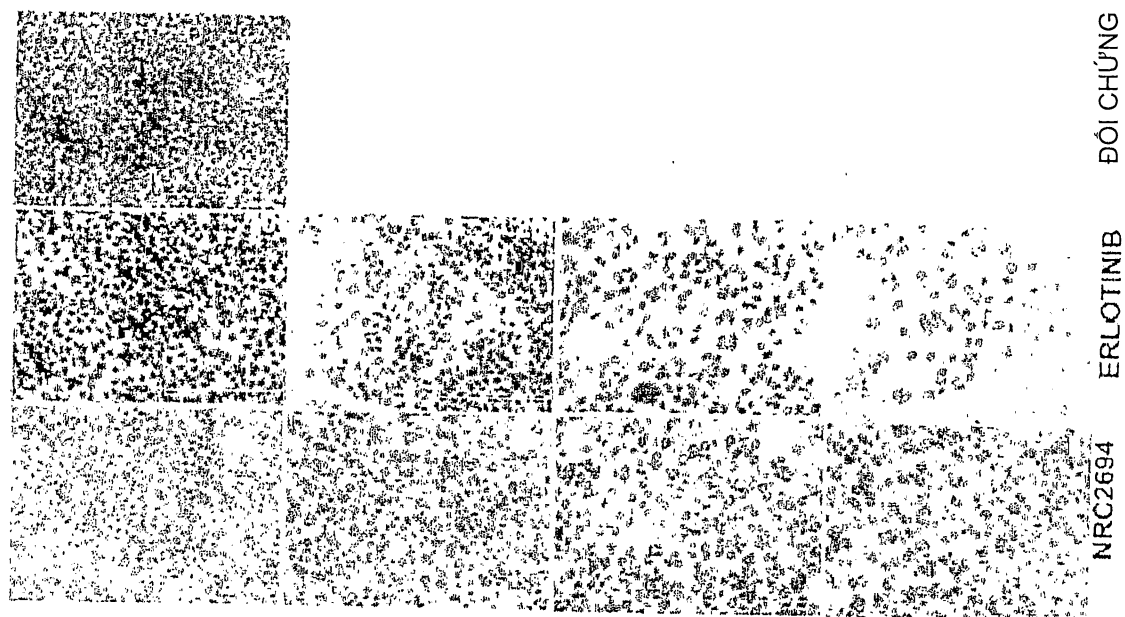
b) cho 4-cloquinazolin có công thức (IIIa) ở trên phản ứng với 3-etynyl anilin để thu được dẫn xuất quinazolin NRC-2694



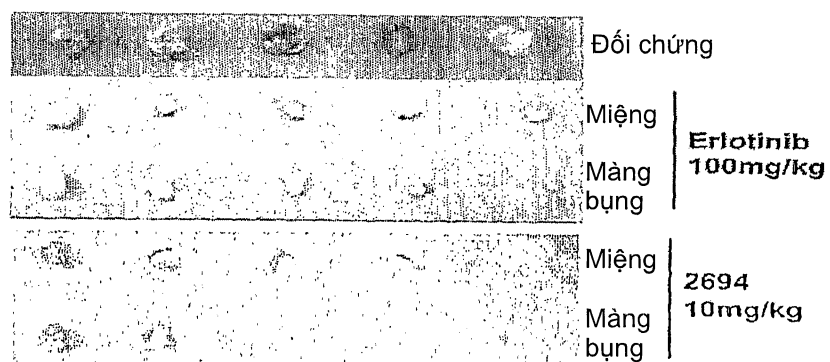
NRC-2694



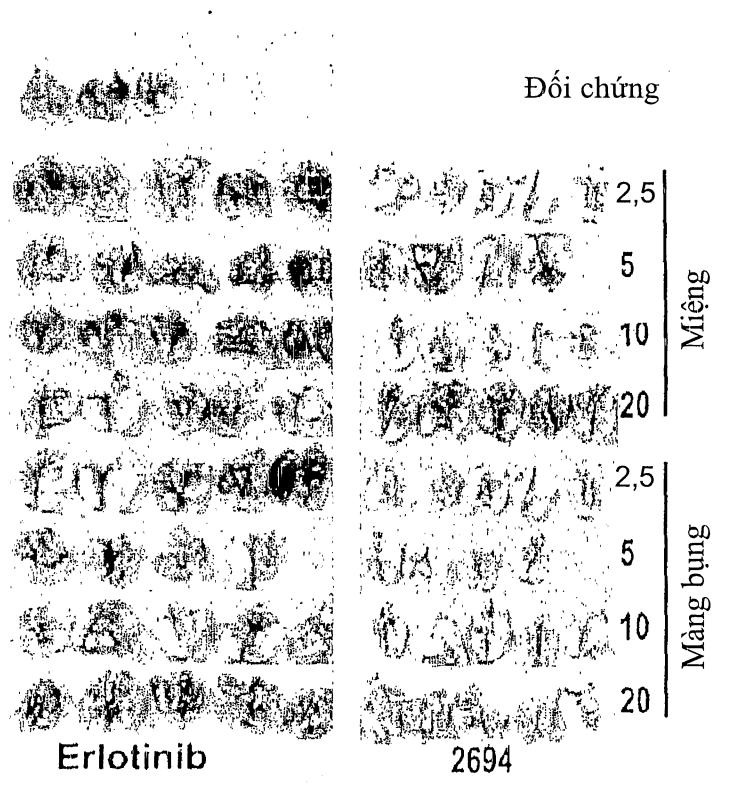
Hình 1: Phân tích Western blot tế bào A549 được xử lý bằng erlotinib HCl và NRC 2694. Quan sát thấy sự giảm mức EGFR phụ thuộc liều



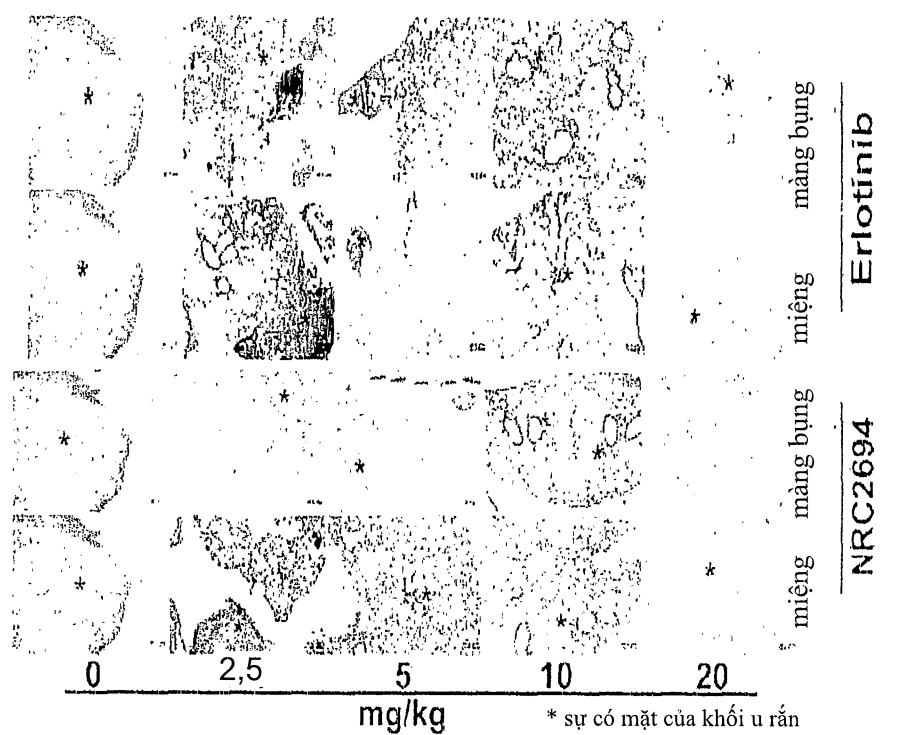
Hình 2: Thử nghiệm xâm lấn Matrigel của tế bào H1299 được xử lý bằng erlotinib và NRC 2694. Quan sát thấy sự giảm xâm lấn phụ thuộc liều



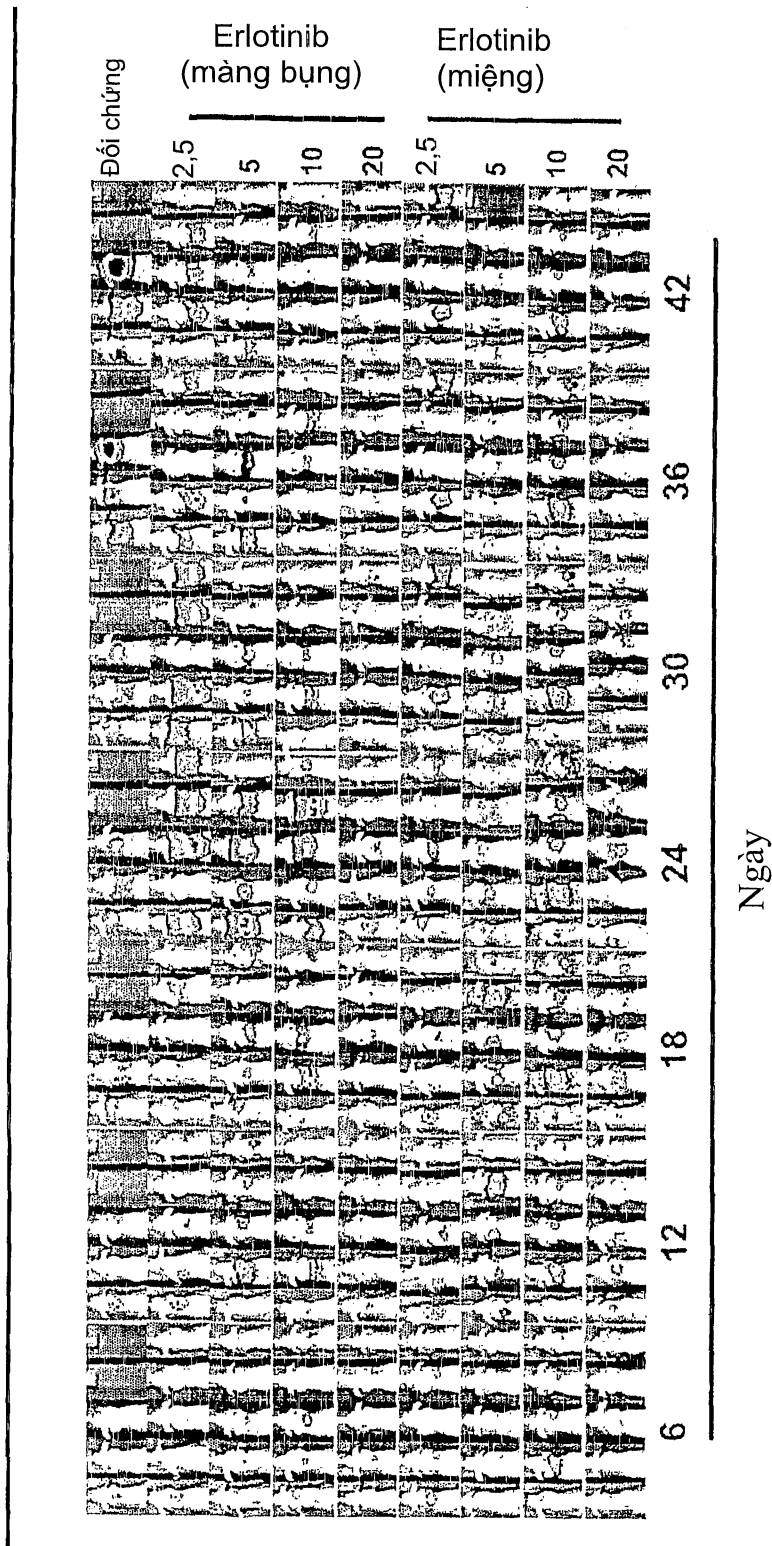
Hình 3: Giảm kích thước khối u do sử dụng qua đường miệng và màng bụng Erlotinib HCl và NRC 2694 ở chuột trụi lông được cấy khối u phổi người A549



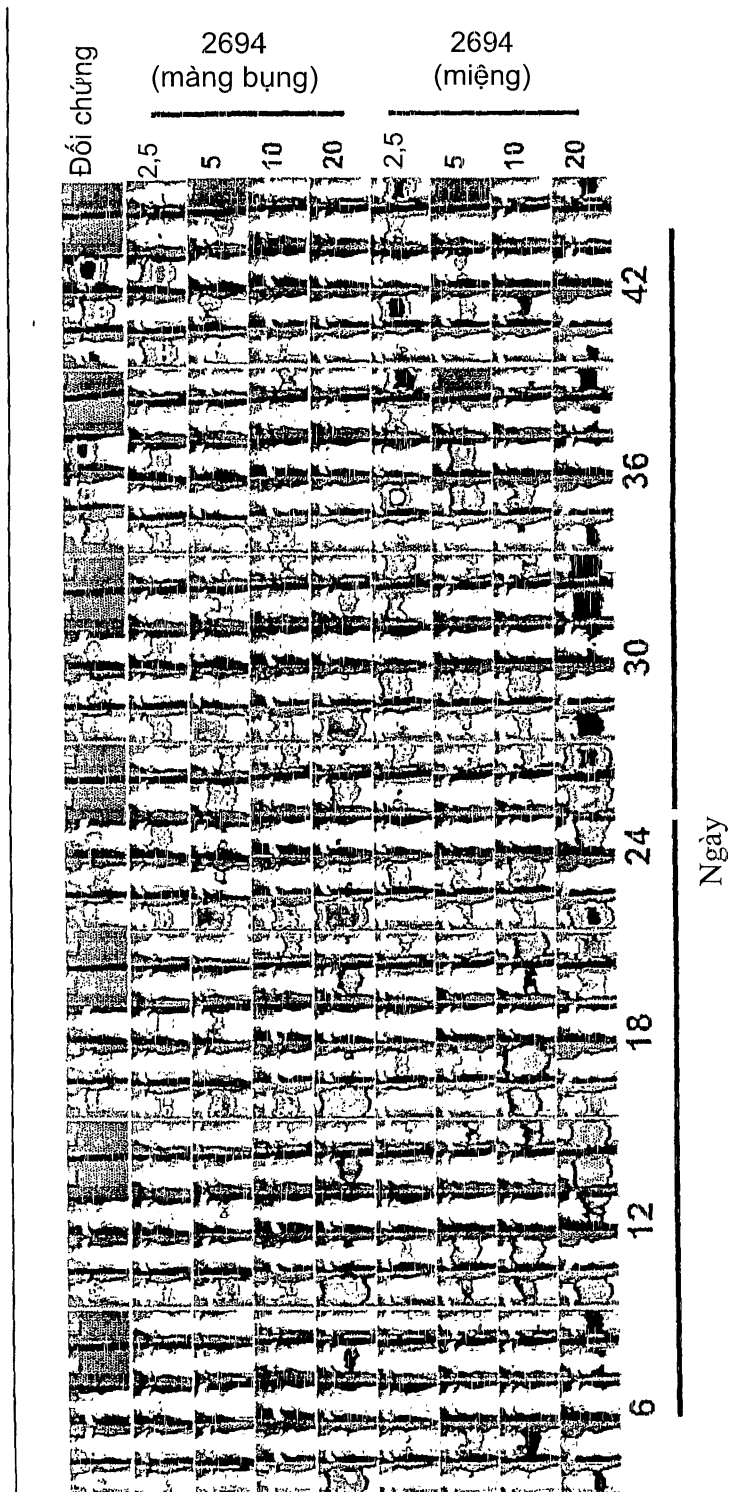
Hình 4: Phổi thu được từ chuột trại lông với tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của Erlotinib HCl và NRC 2694 qua đường miệng hoặc màng bụng



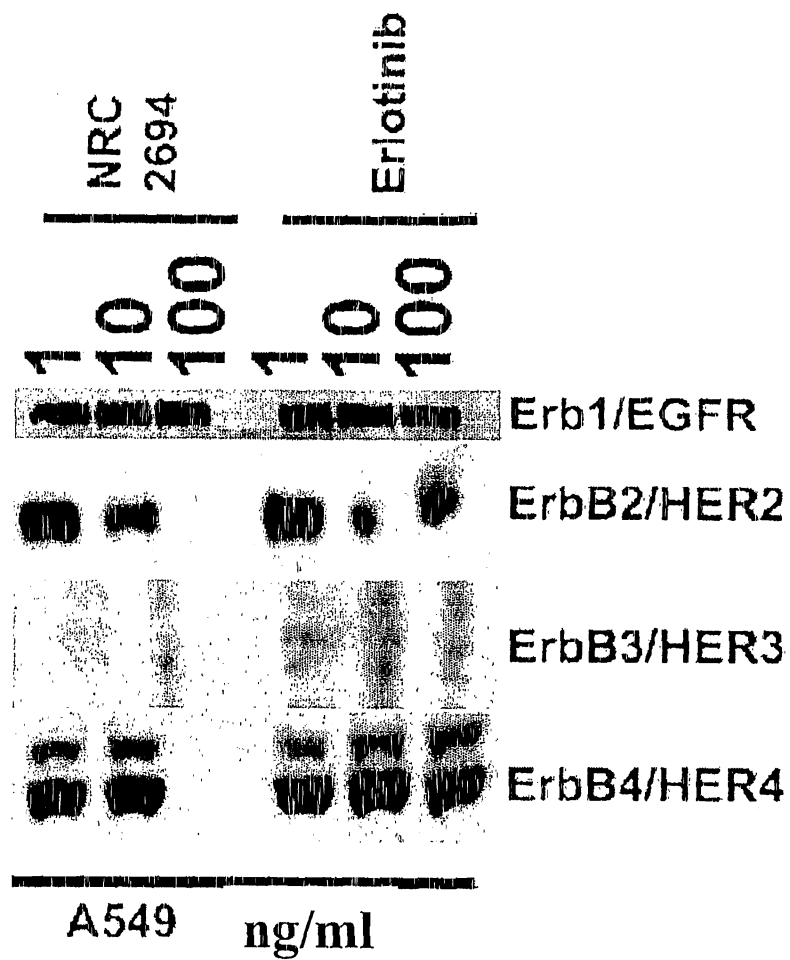
Hình 5: Các lát cắt được nhuộm màu H&E đại diện của phổi mang khối u của chuột trụ lông sau khi điều trị bằng Erlotinib HCl và NRC 2694



Hình 6: Chuột trị lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của Erlotinib HCl qua đường miệng và màng bụng



Hình 7: Chuột trụi lông được cấy tế bào biểu hiện luxiferaza A549 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của NRC 2694 qua đường miệng và màng bụng



Hình 8: Nghiên cứu hiệu quả của các NRC NCE liên quan đến các thụ thể khác như HER-1,2,3,4 và VEGFR in vitro
Quan sát thấy sự giảm mức ErbB1, ErbB2, ErbB3 và ErbB4 sau khi điều trị bằng NRC 2694 ở tế bào A549