



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 917**

51 Int. Cl.:
A61K 31/502 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04818795 .9**
96 Fecha de presentación : **17.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1686997**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **Inhibidores de la forma mutante de kit.**

30 Prioridad: **18.11.2003 US 520714 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.08.2009

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Buchdunger, Elisabeth y**
Fabbro, Dorian

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 324 917 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

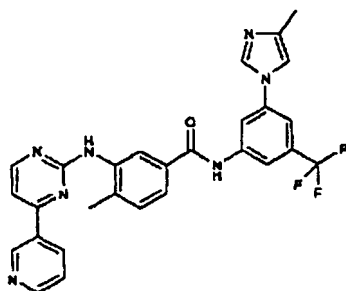
Inhibidores de la forma mutante de kit.

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades dependientes de KIT que se caracterizan por una forma mutante de KIT, por el que se identifica la KIT mutante y se administra un inhibidor apropiado de la KIT mutante.

10 El gen *c-kit* codifica una proteína tirosina quinasa receptora, que se denomina en la presente memoria KIT, pero que también se conoce como receptor de factor de crecimiento de células cebadas/pluripotenciales. La secuencia de aminoácidos de KIT y la secuencia de nucleótidos del gen *c-kit* son conocidas. Véase Swiss Prot.: P10721. Al unirse a su ligando, el factor de células pluripotenciales, KIT forma un dímero que se autofosforila y activa cascadas de señalización que conducen al crecimiento celular. Las mutaciones que conducen a una forma activada de KIT, especialmente formas que se activan independientemente de su ligando, son conocidas y se cree que representan un papel en ciertas enfermedades proliferativas, tales como enfermedades de células cebadas, como mastocitosis, particularmente mastocitosis sistémica, leucemia mielógena aguda, tumores estromáticos gastrointestinales, linfoma sinusal de NK/células T, seminomas y disgerminomas.

20 Se sabe que el imatinib, que se comercializa como su sal de mesilato bajo el nombre comercial GLIVEC o GLEEVEC, inhibe KIT silvestre y ciertas mutaciones de KIT, por ejemplos las de exones comúnmente encontrados en tumores estromáticos gastrointestinales (GIST). Sin embargo, también es inactivo o significativamente menos activo contra ciertas otras formas mutantes de KIT, por ejemplo la mutación D816V comúnmente encontrada en la mastocitosis sistémica. La presente invención se basa en una investigación que correlaciona el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una forma mutante de KIT con una terapia farmacéutica alternativa apropiada basada en la capacidad de la alternativa para inhibir la KIT mutante.

25 Así, la presente invención se refiere a un Compuesto de fórmula A



para el uso en el tratamiento de una enfermedad dependiente de KIT en un paciente, que comprende:

- 45
- (a) identificar una forma mutante de KIT asociada con la enfermedad dependiente de KIT; y
 - (b) administrar a dicho paciente una cantidad inhibidora de KIT mutante eficaz de compuesto A.

50 Las enfermedades dependientes de KIT son generalmente enfermedades proliferativas que se caracterizan por una actividad de quinasa KIT excesiva debido a una mutación activadora en KIT. Tales mutaciones activadoras se conocen en la especialidad y se identifican mediante técnicas conocidas en la especialidad.

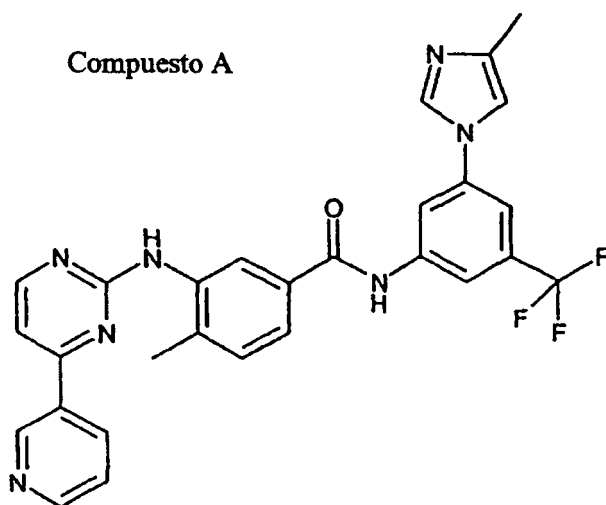
55 Enfermedades dependientes de KIT incluyen enfermedades caracterizadas por las siguientes mutaciones de KIT conocidas: D816F, D816H, D816N, D816Y, D816V, K642E, Y823D, Del 550-558, Del 557-561, N822K, V654A, N822H, Del 550-558 + V654A, Del 557-561 + V654A, Ins503AY, V560G, 558NP, Del 557-558, Del VV559-560, F522C, Del 579, R634W, K642E, T801I, C809G, D820Y, N822K, N822H, Y823D, Y823C y T670I.

60 En una realización importante de la presente invención, la enfermedad dependiente de KIT es resistente al tratamiento con imatinib. Una enfermedad dependiente de KIT que es resistente a imatinib es generalmente una enfermedad dependiente de KIT como la descrita anteriormente en la que el imatinib, administrado en una dosis de 400-1000 mg/día, no proporciona una inhibición suficiente de la KIT mutante para conseguir un beneficio terapéutico significativo. Generalmente, la KIT mutante que es resistente a imatinib tiene una IC_{50} *in vitro* de la KIT mutante mayor que aproximadamente 3 micromolar. Mutaciones de KIT resistentes a imatinib incluyen D816F, D816H, D816N, D816Y, D816V, T670I y formas mutantes que incluyen V654A.

65 La selección de un compuesto que inhibe la forma mutante de KIT se basa en probar el compuesto o un número de compuestos con respecto a su capacidad para inhibir la KIT mutante. Tal prueba se lleva a cabo mediante ensayos de inhibición estándar que son conocidos en la especialidad o dentro de las capacidades del experto.

ES 2 324 917 T3

El inhibidor de KIT utilizado de acuerdo con el presente método es el compuesto A. El compuesto A es un compuesto de la fórmula



y puede producirse de acuerdo como WO 04/005281.

Las dosificaciones apropiadas del compuesto A se determinan mediante métodos habituales.

La dosis diaria de compuesto A para una persona de 70 kg es de aproximadamente 0,05-5 g, preferiblemente de aproximadamente 0,25-1,5 g.

Ejemplos

El gen de KIT humano que codifica los aa 544-976 se clonó en el plásmido donante de baculovirus pFB-GST-01. Esta secuencia codificante se cortó usando las endonucleasas de restricción Bam H1 y EcoR1 y se ligó al vector donante de Bac a Bac pFB-GEX-P1 con extremos compatibles. Subsiguientemente, las mutaciones deseadas se introdujeron en el gen de KIT mediante métodos conocidos para un experto en la especialidad. Debido al cambio en el marco dentro del plásmido original que se usaba para generar las secuencias codificantes mutantes, los insertos plasmídicos mutados se cortaron y se insertaron en el vector donante de Bac a Bac pFB-GST-01 usando las enzimas de restricción BamH1-EcoR1 para cada mutante mostrado en la Figura 1. La secuenciación automatizada confirmaba que la secuencia correcta estaba presente para cada plásmido mutante.

Se generó DNA bacmídico a partir de 10 colonias, cada una de células DH10Bac transformadas con clones plasmídicos de pFB-G01-mutante de KIT según se describe en materiales y métodos y estos se transfectaron a células Sf9. Las células transfectadas se formaron como pellas y el baculovirus recombinante resultante presente en el medio sobrenadante se amplificó. Se aplicó transferencia Western a las pellas celulares sometidas a lisis para confirmar la expresión de la proteína de fusión GST-c-KIT mediante los clones virales usando anticuerpos anti-KIT y anti-GST para la inmunodetección.

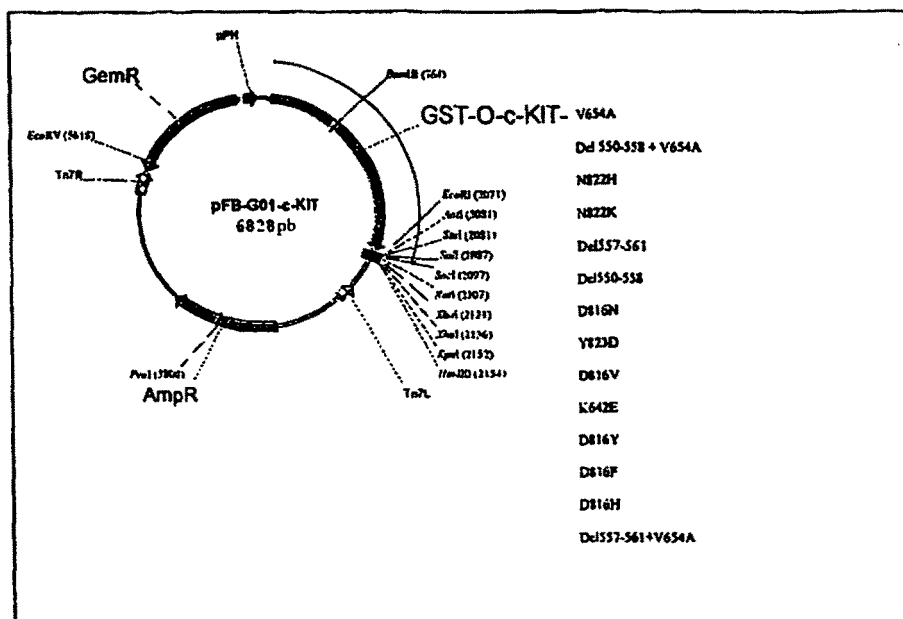


Figura 1

Mutación de Kit	Vatalanib IC ₅₀ (µM) (media)	Compuesto A IC ₅₀ (µM) (media)
D816F	>10	>10
D816H	>10	>10
D816N	>10	<10
D816Y	>10	>10
DS16V	>10	>10
K642E	<1	<10
Y823D	<1	<1
Del 550-558	<1	<2
Del 557-561	<1	<2
N822K	<2	<10
V654A	>10	>10
N822H	<2	<10
Del 550-558 + V654A	<10	<10
Del 557-561 + V654A	>10	>10

Midostaurina

ES 2 324 917 T3

Preparación de HIS	IC ₅₀ media μM	SEM	Nº de valores
HT-KIT-TA23 wt	1,7	0,15	2
HT-KIT TA23 -D820G	0,084	0,05	2
HT-KIT 7A23 -T6701	0,89	0,21	2
Preparación de GST	IC ₅₀ media μM	SEM	Nº de valores
GST-KIT wt	1,8	0,26	10
GST-KIT Del 557-561	0,32	0,042	3
GST-KIT Del 550-558	0,53	0,057	3
GST-KIT Del 550-558+ V654A	0,27	0,079	5
GST-KIT Del 557-561 + V654A	0,34	0,11	
GST-KIT V654A	0,46	0,16	5
GST-KIT K642E	0,64	0,036	4
GST-KIT R6341+V	0,33	0,13	2
GST-KIT T6701 + Del 550-558	0,11	0,05	2
GST-KIT D816F	0,41	0,055	5
GST-KIT D816H	0,35	0,078	5
GST-KIT D816N	0,74	0,25	5
GST-KIT D816Y	0,29	0,11	9
GST-KIT D816V	0,25	0,039	3
GST-KIT D816H + R634W	0,08	0,04	2
GST-KIT N822H	0,37	0,12	5
GST-KIT N822K	0,15	0,058	5
GST-KIT Y823D	0,13	0,0075	3

Condiciones de ensayo: ATP 1 μM, 5 μg/ml de Poli-EY, 10 min de incubación a temperatura ambiente

Medios que contienen virus se recogieron del cultivo celular transfectado y se usaron para infección para incrementar su concentración. Los medios que contienen virus obtenidos después de dos rondas de infección se usaron para la expresión de proteínas a gran escala. Para la expresión de proteínas a gran escala, placas de cultivo tisular redondas de 100 cm² se sembraron con 5 x 10⁷ células/placa y se infectaron con 1 ml de medios que contienen virus (aproximadamente 5 MOIs). Después de 3 días, las células se rasparon de la placa y se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos. Las pellas celulares procedentes de 10-20 placas de 100 cm² se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis enfriado con hielo (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, NP-40 al 1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). Las células se agitaron sobre hielo durante 15 minutos y a continuación de centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos.

ES 2 324 917 T3

El lisado celular centrifugado se cargó en una columna de glutationa-sepharose de 2 ml (Pharmacia) y se lavó 3 veces con 10 ml de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, NaCl 200 mM. Las proteínas marcadas con GST se eluyeron a continuación mediante 10 aplicaciones (1 ml cada una) de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, glutationa reducida 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, glicerol al 10%, y se almacenaron a -70°C.

5

Las actividades de proteína quinasa de los diversos mutantes de Kit, 200-500 ng, se ensayaron en presencia o ausencia de inhibidores, Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, MnCl₂ 3mM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 10 μM, 3 μg/ml de poli(Glu, Tyr) 4:1, DMSO al 1%, ATP 1,5 μM (γ-[³³P]-ATP 0,1 μCi). El ensayo (30 μl) se llevó a cabo en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 30 minutos y la reacción se terminó mediante la adición de 20 μl de EDTA 125 mM. Subsiguientemente, 30 μl de la mezcla de reacción se transfirieron a membrana Immobilon-PVDF (Millipore, Bedford, MA, EE. UU. de A.) previamente embebida durante 5 minutos con metanol, se enjuagaron con agua, a continuación se embebieron durante 5 minutos con H₃PO₄ al 0,5% y se montaron en una tubería de vacío con la fuente de vacío desconectada. Después de añadir todas las muestras en forma de gota, el vacío se conectó y cada pocillo se enjuagó con 200 μl de H₃PO₄ al 0,5%. Las membranas se retiraron y se lavaron 4 veces en un agitador con H₃PO₄ al 1,0% y una vez con etanol. Las membranas se contaron después de secar a temperatura ambiente, montar en un entramado de 96 pocillos Packard TopCount y la adición de 10 μl/pocillo de Microscint (Packard). Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de cada compuesto por duplicado, a 4 concentraciones (habitualmente 0,01, 0,1, 1 y 10 μM). Una unidad de actividad de proteína quinasa se define como 1 nmol de ³³P transferido desde [γ³³P]ATP al sustrato de proteína/minuto/mg de proteína a TA.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

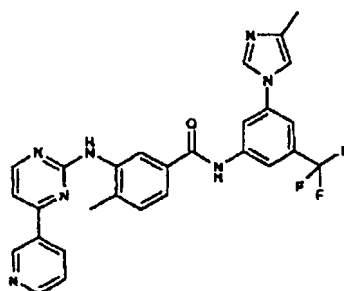
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula A

5

10

15



para el uso en el tratamiento de una enfermedad dependiente de KIT en un paciente, que comprende:

20

- (a) identificar una forma mutante de KIT asociada con la enfermedad dependiente de KIT; y
- (b) administrar a dicho paciente una cantidad inhibidora de KIT mutante eficaz de compuesto A.

25

2. Compuesto de fórmula A para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la forma mutante de KIT se selecciona de D816F, D816H, D816N, D816Y, D816V, K642E, Y823D, Del 550-558, Del 557-561, N822K, V654A, N822H, Del 550-558 + V654A, Del 557-561 + V654A, Ins503AY, V560G, 558NP, Del 557-558, Del VV559-560, F522C, Del 579, R634W, K642E, T801I, C809G, D820Y, N822K, N822H, Y823D, Y823C y T670I.

30

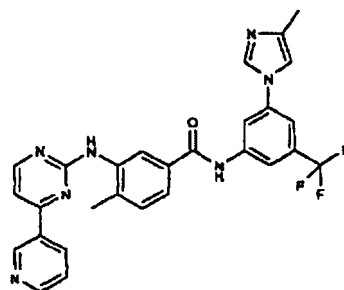
3. Compuesto de fórmula A para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la forma mutante de KIT se selecciona de D816F, D816H, D816N, D816Y, D816V, K642E, Y823D, Del 550-558, Del 557-561, N822K, V654A, N822H, Del 550-558 + V654A, Del 557-561 + V654A.

4. Compuesto de fórmula A

35

40

45



para el uso en el tratamiento de una enfermedad dependiente de KIT en un paciente, que comprende:

50

- (a) identificar una forma mutante de KIT asociada con la enfermedad dependiente de KIT; y
- (b) administrar a dicho paciente una cantidad inhibidora de KIT mutante eficaz de compuesto A,

en el que la enfermedad dependiente de KIT es resistente al tratamiento con imatinib.

55

5. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la forma mutante de KIT se selecciona del grupo que consiste en D816H, D816N, K642E, Y823D, Del 550-558, Del 557-561, N822K y N822H.

60

6. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la enfermedad dependiente de KIT se selecciona de enfermedades de células cebadas, leucemia mielógena aguda, tumores estromáticos gastrointestinales, seminomas y disgerminomas.

65