

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 895**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2018 PCT/JP2018/032314**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019 WO19045036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2018 E 18851555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3677266**

54 Título: **Inhibidor selectivo del EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21**

30 Prioridad:

01.09.2017 JP 2017168606

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

17.06.2024

73 Titular/es:

**TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
1-27, Kandanishiki-cho
Chiyoda-ku, Tokyo 101-8444, JP**

72 Inventor/es:

**ABE, NAOMI y
HASAKO, SHINICHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 972 895 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

Inhibidor selectivo del EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente antitumoral contra cánceres, que comprende un receptor del factor de crecimiento epidérmico mutante en el exón 18 y/o en el exón 21 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "EGFR").

10

Antecedentes técnicos

EGFR es una tirosina quinasa de tipo receptor, ejerce su función fisiológica en el tejido normal al unirse al factor de crecimiento epidérmico (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado EGF), que es un ligando, y contribuye al crecimiento y a la inhibición de la apoptosis en los tejidos epiteliales (NPL 1). Además, la mutación somática del gen EGFR se conoce como un gen causante del cáncer; por ejemplo, EGFR en el que se eliminan los codones 746 a 750 en el exón 19 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "mutación por eliminación en el exón 19") y EGFR en el que la leucina codificada por el codón 858 en el exón 21 está mutada a arginina (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada la "mutación L858R") induce constantemente la actividad de la quinasa independiente de EGF y contribuye al crecimiento y a la supervivencia de las células cancerosas (NPL 2). Estas mutaciones se observan, por ejemplo, entre el 30 y el 50 % de los cánceres de pulmón no microcítico en el este de Asia. Las mutaciones también se observan en aproximadamente el 10 % del cáncer de pulmón no microcítico en Europa y en los Estados Unidos, y se consideran una de las causas del cáncer (NPL 3).

15

20

25

30

35

Por lo tanto, se han llevado a cabo activamente investigaciones y el desarrollo del inhibidor de EGFR como agente antitumoral, y se han introducido en el tratamiento de varios cánceres de pulmón positivos a la mutación de EGFR (NPL 2 y NPL 4). Gefitinib, erlotinib y afatinib se han utilizado como agente terapéutico contra cánceres de pulmón positivos para EGFR mutante por eliminación del exón 19 y mutante de L858R. La mutación por eliminación del exón 19 y la mutación L858R representan el 90 % de la mutación del EGFR. Además, se conoce la aparición de resistencia adquirida en el proceso del tratamiento con estos agentes, y el 50 % de los mismos es causado por EGFR con mutación de resistencia en el que el codón 790 del exón 20 se cambia de treonina a metionina (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "mutación T790M"). Para tratar los cánceres de pulmón que tienen esta mutación, se ha utilizado osimertinib como agente terapéutico. Por lo tanto, los tratamientos que usan inhibidores de EGFR están en proceso de establecerse para pacientes con cáncer de pulmón que tienen mutaciones importantes de EGFR.

40

45

50

Por otra parte, en la actualidad, no se han establecido tratamientos que usen inhibidores de EGFR con respecto a algunas mutaciones raras de EGFR, tales como mutación puntual o mutación por eliminación del exón 18, mutación puntual del exón 21 o similares; y hay informes de que la sensibilidad a los fármacos de estos EGFR mutantes varía en función del tipo de mutación (NPL 4). Por ejemplo, la sensibilidad del cáncer de pulmón que tiene una mutación puntual en la que la glicina codificada por el codón 719 del exón 18 se sustituye con un aminoácido arbitrario (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "mutación G719X") o el cáncer de pulmón en el que la leucina codificada por el codón 861 del exón 21 se sustituye con glutamina (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "mutación L861Q") con respecto a gefitinib, erlotinib y afatinib es inferior a las de la mutación por eliminación del exón 19 y la mutación L858R, que son mutaciones sensibles a los fármacos. Además, hay informes de trastornos de la piel y de trastornos del tracto digestivo como efectos secundarios comunes mediante la administración de dosis terapéuticas de afatinib, gefitinib, y erlotinib. Se cree ampliamente que estos efectos secundarios son atribuibles a la inhibición de la función del EGFR de tipo silvestre expresado en tejidos normales, como la piel o el tracto digestivo, por el agente terapéutico (NPL 1); se ha deseado el desarrollo de un inhibidor caracterizado por una menor actividad inhibitoria con respecto al EGFR de tipo silvestre de los tejidos normales, en comparación con el EGFR mutante expresado en los tejidos tumorales, en vista de la reducción de los efectos secundarios.

55

60

Por lo tanto, se espera que el desarrollo de un fármaco que tenga una alta actividad inhibitoria con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y en el exón 21, así como una alta selectividad con respecto al EGFR mutante en comparación con el EGFR de tipo silvestre, permita la inhibición del crecimiento de células de cáncer de pulmón que tienen EGFR mutante con una dosis inferior a la dosis que causa los efectos secundarios en la piel o en el tracto digestivo, lo que contribuye a la prolongación de la vida o al aumento de la calidad de vida de los pacientes con cánceres positivos a EGFR mutante para los cuales no se han establecido métodos de tratamiento. Además, se espera que un fármaco que tiene una alta actividad inhibitoria con respecto a T790M, que es una mutación de resistencia adquirida contra los tratamientos que usan inhibidores de EGFR, reduzca la frecuencia de expresión de la resistencia adquirida durante los tratamientos que usan inhibidores de EGFR contra el EGFR mutante en el exón 18 o en el exón 21, que es mutación *de novo*; y, por lo tanto, se espera que contribuya a la prolongación de la vida de los pacientes con cáncer.

65

El documento WO 2015/025936 A1 describe un compuesto que tiene una actividad inhibitoria de EGFR y también un efecto inhibitor de la proliferación celular, así como un medicamento que tiene una actividad inhibitoria de EGFR.

- Cancer Science, Vol. 107, págs. 1179-1186 (2016) describe mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico en el cáncer de pulmón y perspectivas para una estrategia individualizada de tratamiento. Lancet Oncol. Vol. 16, págs. 830-838 (2012) describe la actividad clínica de afatinib en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado que alberga mutaciones poco comunes de EGFR.
- 5 [Internet<URL:https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/photos/1329.pdf>](https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/photos/1329.pdf)(2016) (consultado el 18 de octubre de 2018) describe directrices de examen sobre la mutación del gen de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón.

Lista de referencias bibliográficas

10 Bibliografía de patentes

PTL 1: WO2015/175632A1
PTL 2: WO2015/025936A1

15 Bibliografía no relacionada con patentes

- NPL 1: Nat. Rev. Cancer, Vol. 6, págs. 803-812 (2006)
NPL 2: Nature Medicine, Vol. 19, págs. 1389-1400 (2013)
NPL 3: Nat. Rev. Cancer, Vol. 7, págs. 169-181 (2007)
20 NPL 4: Lancet Oncol. Vol. 13, e. 23-31 (2012)
NPL 5: Cancer Science, Vol. 107, págs. 1179-1186 (2016)
NPL 6: Lancet Oncol. Vol. 16, págs. 830-838 (2012)
NPL 7: [Internet<URL:https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/photos/1329.pdf>](https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/photos/1329.pdf)(2016) (consultado el 18 de octubre de 2018)

25

Sumario de la invención

Problema técnico

- 30 Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente antitumoral que no provoque la inhibición del EGFR de tipo silvestre y, por lo tanto, cause efectos secundarios más pequeños, sirviendo como un inhibidor que puede garantizar una alta selectividad con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21 para lo cual los efectos terapéuticos de los inhibidores de EGFR previamente conocidos son insuficientes.

35 Solución al problema

- Los inventores de la presente invención realizaron una investigación exhaustiva y descubrieron que el EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21 es una diana apropiada en el tratamiento del cáncer, y que los inhibidores de EGFR utilizados convencionalmente para los tratamientos tienen una selectividad inferior entre el EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21. Además, los inventores también confirmaron que el compuesto de la presente invención ejerce una selectividad superior y efectos inhibidores del crecimiento tumoral con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21. Con este hallazgo, los inventores lograron la presente invención.

- 45 En un primer aspecto, la presente invención proporciona S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación G719X del exón 18, una mutación E709X del exón 18 y una mutación L861X del exón 21, en donde X representa un residuo de aminoácido arbitrario.

- 50 En una primera realización del primer aspecto, la presente invención proporciona S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso como se reivindica, en donde la mutación del exón 18 es al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en G719A, G719S, G719C, E709K y E709A.

- 55 En una segunda realización del primer aspecto, la presente invención proporciona S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso como se reivindica, en donde la mutación del exón 21 es L861Q.

- 60 En una tercera realización del primer aspecto, la presente invención proporciona S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso como se reivindica, en donde el EGFR tiene además una mutación T790M.

- 65 En una cuarta realización del primer aspecto, la presente invención proporciona S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso como se reivindica, en donde S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma está en la forma de una composición farmacéutica.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir los efectos terapéuticos de la quimioterapia usando un agente antitumoral que comprende, como principio activo, (S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma en un paciente con un tumor maligno, comprendiendo el método las etapas (1) y (2) siguientes:

(1) una etapa para detectar la presencia o ausencia de mutación del gen de EGFR contenido en una muestra biológica obtenida del paciente; y

(2) una etapa para predecir que es muy probable que la quimioterapia presente suficientes efectos terapéuticos con respecto al paciente cuando los resultados de la detección en la etapa (1) encontraron que el gen de EGFR tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación G719X del exón 18, una mutación E709X del exón 18 y una mutación L861X del exón 21, en donde X representa un residuo de aminoácido arbitrario.

En una primera realización del segundo aspecto, la presente invención proporciona el método como se reivindica, en donde la mutación del exón 18 es al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en G719A, G719S, G719C, E709K y E709A.

En una segunda realización del segundo aspecto, la presente invención proporciona el método como se reivindica, en donde la mutación del exón 21 es L861Q.

En una tercera realización del segundo aspecto, la presente invención proporciona el método como se reivindica, en donde el EGFR tiene además una mutación T790M.

En una cuarta realización del segundo aspecto, la presente invención proporciona S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso como se reivindica, en donde el paciente se ha sometido a la predicción según se reivindica.

Efectos ventajosos de la invención

El agente antitumoral de la presente invención ejerce una alta selectividad con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y/o en el exón 21. Por lo tanto, el agente antitumoral para su uso en la presente invención es útil en vista de proporcionar un agente antitumoral que ejerce efectos terapéuticos superiores para un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21, para lo cual los efectos terapéuticos de los inhibidores de EGFR previamente conocidos son insuficientes.

La presente invención también es útil en términos de proporcionar un método para tratar un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

Los inhibidores de EGFR previamente conocidos tienen baja selectividad con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y en el exón 21, en comparación con el EGFR de tipo silvestre; por lo tanto, la diferencia entre la dosificación para garantizar los efectos antitumorales y la dosificación que causa los efectos secundarios (trastornos de la piel, trastornos del tracto digestivo, etc.) derivados de la inhibición de EGFR de tipo silvestre fue pequeña. Por consiguiente, los inhibidores de EGFR previamente conocidos tienen dificultad para ejercer suficientes efectos terapéuticos. Por el contrario, dado que el agente antitumoral para su uso en la presente invención tiene una alta selectividad con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y en el exón 21, es posible aumentar la dosificación sin causar efectos secundarios derivados de la inhibición del EGFR de tipo silvestre. Por lo tanto, el agente antitumoral para su uso en la presente invención ejerce efectos terapéuticos superiores para un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

Por añadidura, el agente antitumoral para su uso en la presente invención presentó una alta actividad inhibidora con respecto al EGFR mutante en el exón 18 y en el exón 21 en presencia de la mutación T790M, que es una mutación de resistencia adquirida en la región del exón 20. Por lo tanto, el agente antitumoral para su uso en la presente invención ejerce efectos terapéuticos superiores con respecto a un paciente con un tumor maligno cuya respuesta al fármaco existente es baja debido a la mutación de resistencia adquirida causada por el uso del agente antitumoral existente.

Además, el agente antitumoral para su uso en la presente invención también es útil en términos de reducción de la frecuencia de expresión de resistencia adquirida durante los tratamientos que usan inhibidores de EGFR contra el EGFR mutante en el exón 18 o en el exón 21, que es mutación *de novo*, debido a su alta actividad inhibidora contra el EGFR mutante en el exón 18 y en el exón 21 incluso bajo la presencia de la mutación T790M, que es una mutación de resistencia adquirida en la región del exón 20.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra el volumen tumoral (que en lo sucesivo en el presente documento se denominará "TV" de modelos

de ratón trasplantados por vía subcutánea con la línea celular que expresa EGFR mutante G719A para medir el efecto antitumoral del compuesto A.

5 La Fig. 2 ilustra el cambio de peso corporal durante un período de dosificación de compuestos de modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A para medir la toxicidad del compuesto A.

10 La Fig. 3 ilustra el volumen tumoral de modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A+T790M para medir el efecto antitumoral del compuesto A.

La Fig. 4 ilustra el cambio de peso corporal durante un período de dosificación de compuestos de modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A+T790M para medir la toxicidad del compuesto A.

15 Descripción de las realizaciones

La invención es como se define en las reivindicaciones.

20 A continuación se explican en detalle ejemplos preferibles de diversas definiciones en el alcance de la presente invención usadas en esta memoria descriptiva.

En esta memoria descriptiva, "EGFR" se refiere a una proteína receptora del factor de crecimiento epidérmico humano, y también se conoce como ErbB-1 o HER1.

25 En esta memoria descriptiva, "EGFR de tipo silvestre" se refiere a EGFR libre de mutación somática, que es una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (Número de acceso a GenBank: NP_005219.2).

30 En esta memoria descriptiva, "exón 18" se refiere a la región 688-728 en la secuencia de aminoácidos de EGFR de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

35 En esta memoria descriptiva, "mutación del exón 18" se refiere a la mutación puntual en un aminoácido en la región del exón 18 del EGFR de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). La mutación del exón 18 preferible es una mutación puntual o una mutación por eliminación con 1 sustitución de aminoácidos en la región del exón 18. Más preferentemente, la mutación del exón 18 es E709X, que es una mutación puntual en la que el ácido glutámico codificado por el codón 709 del exón 18 está sustituido con un aminoácido arbitrario; o G719X, que es una mutación puntual en la que la glicina codificada por el codón 719 del exón 18 se sustituye con un aminoácido arbitrario. De manera más específica, los ejemplos preferibles de E709X incluyen E709K, que es una mutación puntual en la que el ácido glutámico codificado por el codón 709 en la región del exón 18 está sustituido con lisina; y E709A, que es una mutación puntual en la que el ácido glutámico codificado por el codón 709 en la región del exón 18 está sustituido con alanina. Los ejemplos preferibles de G719X incluyen G719A, que es una mutación puntual en la que la glicina codificada por el codón 719 en la región del exón 18 está sustituida con alanina; G719S, que es una mutación puntual en la que la glicina codificada por el codón 719 en la región del exón 18 se sustituye con serina; y G719C, que es una mutación puntual en la que la glicina codificada por el codón 719 en la región del exón 18 se sustituye con cisteína. Entre estos, G719A es particularmente preferible.

En la presente invención, "exón 21" se refiere a la región 824-875 en la secuencia de aminoácidos de EGFR de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

50 En esta memoria descriptiva, "mutación del exón 21" se refiere a la mutación puntual en un aminoácido en la región del exón 21 del EGFR de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). La mutación del exón 21 preferible es una mutación puntual con 1 sustitución de aminoácidos en la región del exón 21. Más preferentemente, la mutación del exón 21 es L861X, que es una mutación puntual en la que la leucina codificada por el codón 861 en la región del exón 21 está sustituida con un aminoácido arbitrario. De manera más específica, L861Q, que es una mutación puntual en la que la leucina codificada por el codón 861 en la región del exón 21 está sustituida con glutamina, es preferible.

En la presente invención, "mutación del exón 18 y/o del exón 21" abarca "mutación del exón 18", "mutación del exón 21" y "mutación del exón 18 y del exón 21".

60 En la presente invención, "mutación puntual" se refiere a la mutación que causa la sustitución, inserción o eliminación de uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1 a 10, preferentemente aproximadamente 1 a 5, más preferentemente aproximadamente 1, 2 o 3) residuos de aminoácidos; y puede incluir mutación de inserción y/o de eliminación en marco como ácido nucleico.

65 "EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21" abarca "EGFR que tiene una mutación en el exón 18", "EGFR que tiene una mutación en el exón 21", y "EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y en el exón 21".

En esta memoria descriptiva, el "EGFR que tiene una mutación en el exón 18" se refiere a EGFR que tiene al menos una mutación en el exón 18. El EGFR puede tener dos o más mutaciones diferentes en el exón 18, y preferentemente tiene una sola mutación en el exón 18. Además, el EGFR también puede tener una mutación distinta de la mutación del exón 18 (como la mutación de eliminación del exón 19, la mutación L858R o la mutación L790M).

En esta memoria descriptiva, el "EGFR que tiene una mutación en el exón 21" se refiere a EGFR que tiene al menos una mutación en el exón 21. El EGFR puede tener dos o más mutaciones diferentes en el exón 21, y preferentemente tiene una sola mutación en el exón 21. Además, el EGFR también puede tener una mutación distinta de la mutación del exón 21 (como la mutación de eliminación del exón 19, la mutación L858R o la mutación L790M).

Además, el EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21 puede tener además una mutación T790M. T790M es una mutación de resistencia adquirida en la región del exón 20. Se sabe que T790M se genera mediante el uso de inhibidores de EGFR existentes. La adquisición de T790M a menudo disminuye los efectos del fármaco existente con respecto a los pacientes con un tumor maligno.

En la presente invención, específicamente, el EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21 que tiene además una mutación T790M es preferentemente uno de EGFR que tiene una mutación E709X y/o G719X en la región del exón 18 que tiene además una mutación T790M y un EGFR que tiene una mutación L861X en la región del exón 21 que tiene además una mutación T790M. En la presente invención, de manera más específica, el EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21 que tiene además una mutación T790M es preferentemente uno de EGFR que tiene una mutación E709K o E709A que tiene además una mutación T790M, EGFR que tiene una mutación G719A, G719S o G719C que tiene además una mutación T790M y EGFR que tiene una mutación L861Q que tiene además una mutación T790M. Entre estos, EGFR que tiene una mutación G719A que tiene además una mutación T790M y EGFR que tiene una mutación L861Q que tiene además una mutación T790M son particularmente preferibles.

En la presente invención, el método para detectar la mutación en el exón 18 y/o en el exón 21 del EGFR expresado por un paciente con un tumor maligno no está particularmente limitado en la medida en que el método sea capaz de detectar las mutaciones, y se puede usar cualquier método de detección conocido.

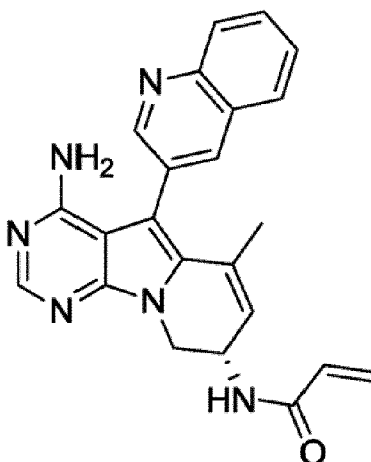
La muestra utilizada en la detección de la mutación en el exón 18 y/o en el exón 21 no está particularmente limitada siempre que la muestra sea una muestra biológica aislada de un paciente con un tumor maligno, en particular, una muestra obtenida de un paciente con un tumor maligno y contenga células tumorales malignas. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina, etc.), tejidos, extractos de los mismos y los cultivos de los tejidos obtenidos. El método para obtener una muestra biológica puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de muestra biológica.

La muestra biológica se prepara mediante un tratamiento adecuado de acuerdo con el método de medición. Además, el reactivo que comprende cebador o sonda usado para la detección puede prepararse mediante un método convencional de acuerdo con el método de medición para el mismo.

En una realización de la presente invención, se puede realizar una etapa para detectar la presencia de mutación en el exón 18 y/o en el exón 21 de EGFR expresada por un paciente con un tumor maligno antes de la administración de un agente antitumoral a un paciente con un tumor maligno.

Un tumor maligno puede incluir dos o más tipos diferentes de células tumorales malignas. Además, se pueden generar dos o más tumores malignos en un solo paciente. Por lo tanto, un solo paciente puede tener diferentes mutaciones en la misma posición de aminoácidos de EGFR (por ejemplo, la mutación en el exón 18 es la mutación en el exón 18 G719A, G719S y G719C; mutación del exón 18 E709K y E709A) al mismo tiempo.

El agente antitumoral para su uso en la presente invención según se reivindica comprende, como principio activo, (S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida (Compuesto (A)) o una sal de la misma. El compuesto (A) está representado por la siguiente fórmula química.



El método para producir el compuesto para su uso en la presente invención se explica a continuación.

- 5 El compuesto A de la presente invención puede producirse, por ejemplo, a través del método de producción divulgado en el documento WO2015/025936A1, los métodos descritos en los Ejemplos, y similares. No obstante, el método de producción del compuesto para su uso en la presente invención no se limita a estos ejemplos de reacción.

10 Cuando el Compuesto A para su uso en la presente invención tiene isómeros tales como isómeros ópticos, estereoisómeros y tautómeros, cualquiera de los isómeros y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance del compuesto para su uso en la presente invención, a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, cuando el Compuesto A para su uso en la presente invención tiene isómeros ópticos, las mezclas racémicas y los isómeros ópticos separados de una mezcla racémica también se incluyen dentro del alcance del compuesto para su uso en la presente invención, a menos que se indique otra cosa.

15 Las sales del Compuesto A se refieren a cualquier sal farmacéuticamente aceptable; los ejemplos incluyen sales de adición de bases y sales de adición de ácidos.

20 Algunos ejemplos de sales de adición de base incluyen sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales de amonio; y sales de aminas orgánicas, tales como sales de trimetilamina, sales de trietilamina, sales de diciclohexilamina, sales de etanolamina, sales de dietanolamina, sales de trietanolamina, sales de procaína y sales de N,N'-dibenciletilendiamina.

25 Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidratos, sulfatos, nitratos, fosfatos, y percloratos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, formiatos, maleatos, fumaratos, tartratos, citratos, ascorbatos, y trifluoroacetatos; y sulfonatos, tales como metanosulfonatos, isetionatos, bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos.

30 El compuesto para su uso en la presente invención y sales del mismo también incluyen profármacos del mismo. Un profármaco se refiere a un compuesto que se puede convertir en el compuesto para su uso en la presente invención o una sal del mismo a través de una reacción con una enzima, ácido gástrico o similares, en condiciones fisiológicas *in vivo*, es decir, un compuesto que se puede convertir en el compuesto para su uso en la presente invención o una sal del mismo por oxidación enzimática, reducción, hidrólisis, o similar; o un compuesto que se puede convertir en el compuesto para su uso en la presente invención o una sal del mismo por hidrólisis o similares con ácido gástrico o similares. Además, el profármaco puede ser compuestos que pueden convertirse en el compuesto para su uso en la presente invención o una sal del mismo en condiciones fisiológicas, tales como los descritos en "Iyakuhiin no Kaihatsu [Development of Pharmaceuticals]", Vol. 7, Molecular Design, publicado en 1990 por Hirokawa Shoten Co., págs. 163-198.

40 Descripción de enfermedades

Los ejemplos específicos de tumores dirigidos en la presente invención incluyen, aunque sin limitación particular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal (cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer duodenal, cáncer de hígado, cáncer biliar (por ejemplo, cáncer de vesícula biliar y de vías biliares), cáncer pancreático, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon y cáncer rectal), etc.), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de pulmón no microcítico y mesotelioma), cáncer de mama, cáncer genital (cáncer de ovario, cáncer de útero (por ejemplo, cáncer de cuello de útero y cáncer de endometrio), etc.), cáncer urológico (por ejemplo, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata y tumor testicular), tumor hematopoyético (por ejemplo, leucemia, linfoma maligno y mieloma múltiple), osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de piel, tumor cerebral y similares. Los ejemplos preferibles incluyen cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, tumor cerebral, cáncer

de útero, cáncer de órganos digestivos, tumor hematopoyético o cáncer de piel. El cáncer de pulmón es particularmente preferible.

5 Cuando se usa el Compuesto A o una sal del mismo como agente farmacéutico, se puede añadir un vehículo farmacéutico, si fuese necesario, formando así una forma farmacéutica adecuada de acuerdo con los fines de prevención y tratamiento. Algunos ejemplos de forma farmacéutica incluyen preparaciones orales, inyecciones, supositorios, pomadas, parches y similares. Las preparaciones orales son las preferibles. Dichas formas farmacéuticas pueden formarse mediante métodos convencionalmente conocidos por el experto en la materia.

10 En una realización, el agente antitumoral para su uso en la presente invención según se reivindica se proporciona como una composición farmacéutica que comprende el Compuesto A o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Como vehículo farmacéuticamente aceptable, pueden combinarse varios materiales portadores convencionales orgánicos o inorgánicos usados como materiales de preparación como excipiente, aglutinante, disgregante, lubricante, o colorante en preparaciones sólidas; o como disolvente, agente solubilizante, agente de suspensión, agente isotónico, tampón o agente suavizante en preparaciones líquidas. Asimismo, aditivos de preparación farmacéutica, tales como antisépticos, antioxidantes, colorantes, edulcorantes, y estabilizantes, también se pueden usar, en caso de que sea necesario.

20 Las preparaciones sólidas orales se preparan de la siguiente manera. Después de añadir opcionalmente un excipiente con un excipiente, aglutinante, disgregante, lubricante, colorante, agente enmascarante del sabor, o agente aromatizante, etc., al compuesto para su uso en la presente invención, la mezcla resultante se formula en comprimidos, comprimidos recubiertos, gránulos, polvos, cápsulas o similares mediante los métodos habituales.

25 Como ejemplos de excipientes se incluyen lactosa, sacarosa, D-manitol, glucosa, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa microcristalina y ácido silícico anhidro. Como ejemplos de aglutinantes se incluyen agua, etanol, 1-propanol, 2-propanol, jarabe simple, glucosa líquida, α -almidón líquido, gelatina líquida, D-manitol, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil almidón, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfato de calcio, polivinilpirrolidona y similares. Como ejemplos de disgregantes se incluyen almidón deshidratado, alginato sódico, agar en polvo, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato cálcico, laurilsulfato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, lactosa y similares. Como ejemplos de lubricantes se incluyen talco purificado, estearato de sodio, estearato de magnesio, bórax, polietilenglicol y similares. Algunos ejemplos de colorantes incluyen óxido de titanio, óxido de hierro y similares. Como ejemplos de agentes enmascaradores del sabor o saborizantes se incluyen sacarosa, cáscara de naranja amarga, ácido cítrico, ácido tartárico y similares.

30 Cuando se prepara una preparación líquida para la administración oral se puede añadir al compuesto para su uso en la presente invención, un agente enmascarante del sabor, un tampón, un estabilizante, un agente saborizante y similares; y la mezcla resultante puede formularse en una preparación oral líquida, jarabe, elixir, etc., de acuerdo con un método habitual.

35 Cuando se prepara un agente de inyección, un regulador de pH, un tampón, un estabilizante, un agente isotonzante, un anestésico local y similares, puede añadirse al compuesto para su uso en la presente invención; y la mezcla puede formularse en una inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa de acuerdo con un método ordinario.

40 Los ejemplos del ajustador del pH y el tampón usado en el presente documento incluyen citrato de sodio, acetato de sodio, y fosfato de sodio. Los ejemplos del estabilizante incluyen piro-sulfito sódico, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico. Los ejemplos del anestésico local incluyen clorhidrato de procaína y clorhidrato de lidocaína. Como ejemplos de agente de tonicidad se incluyen cloruro sódico, glucosa, D-manitol y glicerol.

45 Cuando se prepara un supositorio, los vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en el campo relacionado, tales como polietilenglicol, lanolina, manteca de cacao y triglicéridos de ácidos grasos; y, según sea necesario, tensioactivos tales como Tween 80 (marca registrada), se pueden añadir al Compuesto A, y la mezcla resultante se puede formular en un supositorio de acuerdo con un método ordinario.

50 Cuando se prepara una pomada, una base de uso común, estabilizante, agente humectante, conservante, y similares, puede mezclarse con el Compuesto A, según sea necesario; y la mezcla obtenida se mezcla y formula en una pomada de acuerdo con un método ordinario.

55 Los ejemplos de la base incluyen parafina líquida, vaselina blanca, cera de abejas blanca, alcohol octil dodecílico, y parafina.

60 Los ejemplos del conservante incluyen paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo, y paraoxibenzoato de propilo.

65 Cuando se prepara un parche, la pomada, crema, gel, pasta o similares anteriormente descritos, pueden aplicarse a

un sustrato ordinario de acuerdo con un método ordinario.

Los ejemplos de sustratos incluyen telas tejidas o telas no tejidas que comprenden algodón, fibras cortadas, o fibras químicas; y películas y planchas de espuma de cloruro de vinilo blando, polietileno, poliuretano, etc., también pueden usarse.

La cantidad del Compuesto A que debe incorporarse en cada una de dichas formas farmacéuticas depende del estado del paciente al que se administre el compuesto, la forma farmacéutica del mismo, etc. En general, en el caso de un agente oral, la cantidad del compuesto es preferentemente de 0,05 a 1000 mg por forma farmacéutica unitaria. En el caso de una inyección, la cantidad del compuesto es preferentemente de 0,01 a 500 mg por forma farmacéutica unitaria; y en el caso de un supositorio, la cantidad del compuesto es preferentemente de 1 a 1000 mg por forma farmacéutica unitaria.

Además, la dosis diaria de la medicina de dicha forma farmacéutica depende de la afección, peso corporal, edad, sexo, etc., del paciente, y no puede generalizarse ni limitarse. Por lo general, la dosis diaria para un adulto (peso corporal: 50 kg) de Compuesto A puede ser generalmente de 0,05 a 5000 mg, y preferentemente de 0,1 a 1000 mg; y preferentemente se administra en una dosis, o en dos a tres dosis divididas, al día.

También se describe un método para tratar a un paciente con un tumor maligno, que comprende la etapa para administrar el Compuesto A o una sal del mismo a un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

También se describe el Compuesto A o una sal del mismo para tratar a un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

También se describe el uso del Compuesto A o una sal del mismo para tratar a un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

También se describe el uso del Compuesto A o una sal del mismo para la producción de un agente farmacéutico para tratar a un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

También se describe una composición farmacéutica para tratar a un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21, comprendiendo la composición farmacéutica el Compuesto A o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe un método para predecir los efectos terapéuticos de la quimioterapia usando un agente antitumoral que comprende, como principio activo, el Compuesto A o una sal del mismo en un paciente con un tumor maligno, comprendiendo el método las etapas (1) y (2) siguientes:

- (1) una etapa para detectar la presencia o ausencia de mutación del gen de EGFR contenido en una muestra biológica obtenida del paciente; y
- (2) una etapa para predecir que es muy probable que la quimioterapia presente suficientes efectos terapéuticos para el paciente cuando los resultados de la detección en la etapa (1) encontraron que el gen de EGFR tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21.

También se describe un método para tratar a un paciente con un tumor maligno, que comprende las etapas (1) a (3) siguientes:

- (1) una etapa para detectar la presencia o ausencia de mutación del gen de EGFR contenido en una muestra biológica obtenida del paciente; y
- (2) una etapa para predecir que la quimioterapia utilizando un agente antitumoral que comprende, como principio activo, (S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma es muy probable que presente suficientes efectos terapéuticos con respecto al paciente cuando los resultados de la detección en la etapa (1) encontraron que el gen de EGFR tiene una mutación en el exón 18 y/o en el exón 21; y
- (3) una etapa para administrar (S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma a un paciente con un tumor maligno que se predijo que era altamente probable que respondiera suficientemente a la quimioterapia usando un agente antitumoral que comprende, como principio activo, (S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, en la etapa (2).

La secuencia de bases del gen de EGFR es públicamente conocida. El número de acceso a GenBank de la secuencia de bases del ADNc es NM_005228.4.

Los "efectos terapéuticos" pueden evaluarse mediante los efectos de reducción del tumor, los efectos supresores de recaídas, los efectos de prolongación de la vida y similares. Los efectos supresores de la recaída pueden mostrarse

como el grado de extensión del período sin recaída o el grado de mejora en la tasa de recaída; y los efectos de prolongación de la vida pueden mostrarse como el grado del tiempo de supervivencia completo o el grado de extensión de la mediana de supervivencia libre de progresión, o similares. Los "efectos terapéuticos suficientes" de la quimioterapia usando un agente antitumoral que comprende, como principio activo, el Compuesto A o una sal del mismo significa, por ejemplo, que se obtienen efectos terapéuticos superiores mediante la administración del agente antitumoral que comprende, como principio activo, el Compuesto A o una sal del mismo, tal como la extensión del tiempo de supervivencia, la supresión de recaída y similares, en comparación con la no administración.

Ejemplos

A continuación, se describe la presente invención con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos de prueba. No obstante, la presente invención no se limita a estos Ejemplos (Ejemplos de prueba).

Ejemplo de prueba 1: Prueba de eficacia del fármaco *in vitro*

Resultados de la evaluación de la fosforilación intracelular en el sistema de expresión forzada de EGFR mutante utilizando células HEK293 (actividad inhibidora)

La actividad inhibidora diana intracelular de los compuestos se evaluó en base a lo siguiente como un índice: fosforilación intracelular del EGFR en un sistema de expresión forzada de EGFR mutante usando células HEK293 Jump-In (marca registrada) Grip (marca registrada) (Thermo Fisher Scientific Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento denominadas como "células HEK293").

Las células HEK293 se mantuvieron en D-MEM con GlutaMAX (marca registrada)-I (contenido alto de glucosa) (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía FBS dializado al 10 % y penicilina 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific Inc.); y un vector pJTI™ R4 DEST CMV pA al que se codificó un gen de EGFR humano (G719A, G719S, G719C, E709K, E709A, L861Q, G719A+T790M, o L861Q+T790M; el símbolo "+" indica que ambas mutaciones están codificadas) se introdujo en las células HEK293, junto con Opti-MEM (marca registrada) I (Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando un reactivo de transfección ViaFect (marca registrada) (Promega Corporation).

Las células HEK293 que expresan EGFR humano mutante se sembraron en cada pocillo de una microplaca de fondo plano de 384 pocillos, de modo que el recuento celular por pocillo fue de 10.000, y se incubaron en una incubadora que contenía gas CO₂ al 5 % a 37 °C durante 1 día. El Compuesto A, erlotinib, afatinib y osimertinib (erlotinib, afatinib y osimertinib) pueden denominarse cada uno en lo sucesivo en el presente documento como un "compuesto comparativo" se disolvieron individualmente en DMSO y se diluyeron con DMSO o el medio utilizado para suspender las células. Luego, las soluciones se añadieron individualmente a cada pocillo de la placa de cultivo de las células, y las células se incubaron en una incubadora que contenía gas CO₂ al 5 % a 37 °C durante 6 horas. Después de la incubación, las células se inmovilizaron usando formalina tamponada neutra al 20 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se bloquearon con un tampón de bloqueo Odyssey (marca registrada) (PBS) (M&S TechnoSystems Inc.). Luego, las células se hicieron reaccionar con un anticuerpo primario (Anticuerpo monoclonal del EGFR (R19/48MIX) #AHR5062) (Thermo Fisher Scientific Inc.) que se diluyó con un tampón de bloqueo Odyssey (marca registrada) (PBS) a 1/200 y un Anticuerpo del receptor fosfo-EGFR (Tyr1068) #2234L (CST)), seguido de someter las células a permeación a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las células se hicieron reaccionar con un anticuerpo secundario (IRDye 800CW Goat aRabbit #926-32211 e IRDye 680RD Goat aMouse #926-68070 (M&S TechnoSystems Inc.)) diluido con un tampón de bloqueo (PBS) Odyssey (marca registrada) a 1/800, y sometido a permeación a temperatura ambiente durante 1 hora. La intensidad de fluorescencia (que puede denominarse en lo sucesivo en el presente documento como "FI") se detectó con un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Bioscience) a una longitud de onda de fluorescencia de 800 nm y 700 nm.

El valor obtenido deduciendo la FI de un pocillo sin las células de la FI detectado a una longitud de onda de fluorescencia de 800 nm o 700 nm se denomina FI (800, EGFR)-Blanco (para 800 nm) y FI (700, p-EGFR)-Blanco (para 700 nm). Se determinó que el valor obtenido dividiendo FI (700, p-EGFR)-Blanco de cada pocillo por FI (800, EGFR)-Blanco era FI (p-EGFR/EGFR). La tasa de inhibición de EGFR fosforilado se calculó usando la siguiente fórmula para determinar la concentración de los compuestos de prueba en los que el EGFR fosforilado se inhibió en un 50 % (CI₅₀ (µM)). La Tabla 1 ilustra los resultados.

$$\text{Tasa inhibidora del EGFR fosforilado (\%)} = T/C \times 100$$

T: FI (p-EGFR/EGFR) de un pocillo al que se añadió un compuesto de prueba.

C: FI (p-EGFR/EGFR) de un pocillo al que no se añadió un compuesto de prueba.

Como resulta evidente de la Tabla 1, el compuesto A presentó una alta actividad inhibidora contra la fosforilación intracelular de EGFR mutante en el exón 18 o en el exón 21; y la actividad fue mayor que la de erlotinib u osimertinib, y fue equivalente a la de afatinib. La actividad inhibidora del compuesto A contra EGFR mutante en el exón 18 o en el exón 21 fue mayor que la de afatinib en presencia de la mutación T790M, que es una mutación resistente adquirida.

Tabla 1

	Compuesto A	Osimertinib	Afatinib	Erlotinib
G719A	20,5	237,0	20,0	>1000
G719S	22,7	251,9	16,9	539,7
G719C	9,3	102,0	15,3	98,3
E709K	86,0	424,2	14,0	451,4
E709A	103,5	548,9	19,2	478,1
L861Q	40,5	143,1	24,7	608,1
G719A+ T790M	31,3	132,1	110,2	>1000
L861Q+ T790M	81,8	132,4	177,6	>1000

Ejemplo de prueba 2

5

Evaluación del efecto inhibidor del crecimiento celular frente a la línea celular que expresa EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante (*in vitro*)

10 La actividad inhibidora de los compuestos contra EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante se evaluó usando células Ba/F3, que son la línea celular precursora de linfocitos B de ratón en la que se introdujo un gen de EGFR humano. Las células Ba/F3 se mantuvieron en un medio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc.), y 1 ng/ml de interleucina-3 de ratón (mIL-3) (CST). Se codificó un vector PB-CMV-MCS-EF1-GFP+Puro o PB-CMV-MCS-EF1-RFP+Puro en el que se introdujo un gen de EGFR humano (tipo silvestre (WT), G719A o L861Q) en las células, junto con un vector de expresión de Transposasa Super PiggyBac, por electroporación usando un Kit V Amaxa (marca registrada) Cell Line Nucleofector (marca registrada), seguido de selección usando puromicina (SIGMA). Las células Ba/F3 que expresan EGFR de tipo silvestre (que pueden denominarse en lo sucesivo en el presente documento como "Ba/F3-EGFR_WT") presentaron un crecimiento independiente de mIL-3 en presencia de 50 ng/ml de EGF (R&D Systems); y las células Ba/F3 que expresan EGFR mutante activo en el exón 18 o en el exón 21 (que en lo sucesivo en el presente documento se denominarán "Ba/F3-EGFR G719A", y "Ba/F3-EGFR L861Q") presentaron un crecimiento independiente de mIL-3 en ausencia de EGF.

25 Para evaluar un efecto inhibidor del crecimiento celular, se suspendieron células Ba/F3-EGFR_WT en un medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 50 ng/ml de EGF; y la suspensión celular se sembró en cada pocillo de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos, de modo que el recuento celular por pocillo fue de 30.000. Las células Ba/F3-EGFR G719A y las células Ba/F3-EGFR L861Q fueron suspendidas en los respectivos medios RPMI-1640 que contienen FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin; y las suspensiones celulares se sembraron de manera individual en cada pocillo de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos, de modo que el recuento celular por pocillo fue de 15.000. Seguidamente, el compuesto A, gefitinib, erlotinib, afatinib y osimertinib (gefitinib, erlotinib, afatinib y osimertinib pueden denominarse cada uno en lo sucesivo en el presente documento como un "compuesto comparativo") se disolvieron individualmente en DMSO y se diluyeron con DMSO o el medio utilizado para suspender las células. Luego, las soluciones se añadieron a cada pocillo de la placa de cultivo de las células, y las células se incubaron en una incubadora que contenía gas CO₂ al 5 % a 37 °C durante 3 días. El recuento celular después de la incubación se midió mediante un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (marca registrada) (Promega Corporation) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La tasa inhibidora del crecimiento se calculó utilizando la siguiente fórmula para determinar la concentración de cada compuesto de prueba para una inhibición del 50 % (CI₅₀ (µM)).

$$40 \quad \text{Tasa inhibidora del crecimiento (\%)} = T/C \times 100$$

T: la intensidad de luminiscencia de un pocillo al que se añadió un compuesto de prueba.

C: la intensidad de luminiscencia de un pocillo al que no se añadió un compuesto de prueba.

45 La relación CI₅₀ entre EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante G719A, o entre EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante L861Q se determinó usando la siguiente fórmula. La Tabla 2 ilustra los resultados.

$$\text{Relación CI}_{50} = \text{IC}_{50}(\text{WT})/\text{CI}_{50}(\text{G719A o L861Q})$$

50 Como resulta evidente de la Tabla 2, el compuesto A presentó una actividad inhibidora selectiva contra la mutación G719A y la mutación L861Q.

Tabla 2

	Cl ₅₀ (nM)			Relación Cl ₅₀	
	WT	G719A	L861Q	WT/G719A	WT/L861Q
Compuesto A	597,3	9,0	19,0	66,4	31,4
Osimertinib	378,7	209,0	47,0	1,8	8,1
Afatinib	17,7	3,3	2,3	5,3	7,6
Erlotinib	778,3	336,3	353,0	2,3	2,2

Ejemplo de prueba 3: Prueba de eficacia del fármaco *in vivo*

5 Evaluación del efecto antitumoral en el modelo de ratón trasplantado por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A

10 La evaluación en modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A se realizó usando células NIH-3T3, que son líneas celulares de fibroblastos de ratón en las que se introdujo un gen de EGFR humano. Las células NIH-3T3 se mantuvieron en un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía suero de ternera recién nacida (NBCS) al 10 %, 1.500 mg/l de hidrogenocarbonato de sodio y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific Inc.); y se introdujo en las células un vector PB-CMV-MCS-EF1-RFP+Puro en el que se codificó un gen de EGFR humano (G719A), junto con un vector de expresión de Transposasa Super PiggyBac, por electroporación usando un Kit R Amaxa (marca registrada) Cell Line Nucleofector (marca registrada), seguido de selección usando puromicina (SIGMA). Las células NIH-3T3 que expresan EGFR mutante en el exón 18 (que pueden denominarse en lo sucesivo en el presente documento "NIH3T3-EGFR G719A") presentaron un crecimiento en ausencia de EGF en condiciones de NBCS al 1 %.

20 En la evaluación usando modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con la línea celular que expresa EGFR mutante G719A, los ratones desnudos fueron trasplantados por vía subcutánea con células NIH3T3-EGFR G719A en las que se introdujo un EGFR humano mutante. En el punto en que el volumen tumoral del tumor injertado en los ratones creció hasta aproximadamente 100 a 200 mm³, los ratones se asignaron en grupos, 5 o 6 ratones para cada grupo, mediante aleatorización estratificada de modo que el volumen tumoral promedio entre los grupos fue uniforme. Luego se administró a los ratones por vía oral el compuesto A, afatinib u osimertinib una vez al día durante 14 días consecutivos.

30 La dosis de afatinib fue de 20 mg/kg/día, que es la dosis máxima tolerada (la dosis máxima a la que la pérdida de peso durante un período de dosificación es inferior al 20 %), durante 14 días, el período de dosificación de esta prueba. La dosis de osimertinib fue de 25 mg/kg/día, que es una dosis clínicamente eficaz. Para el compuesto A, se establecieron tres tipos de dosis: 200 mg/kg/día (dosis máxima tolerada), 100 mg/kg/día y 50 mg/kg/día. La dosis máxima tolerada se determinó de acuerdo con las "Directrices sobre propuestas de neoplasia experimental en ratones y ratas" del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), desde una perspectiva humanitaria.

35 Para comparar los cambios en el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo debido a la administración de los compuestos de prueba individuales, el volumen tumoral (que en lo sucesivo en el presente documento se denominará "TV" se utilizó como índice. Para un índice de toxicidad, el peso corporal se midió con el tiempo, y el cambio de peso corporal (que en lo sucesivo en el presente documento se denominará "BWC (%)") a partir del día en que los ratones se dividieron en grupos se calculó de acuerdo con siguiente fórmula.

40
$$\text{BWC (\%)} = (\text{el peso corporal medido el día de la medición del peso corporal}) / (\text{el peso corporal en el día en que los ratones se dividieron en grupos})$$

45 Cuando la diferencia en el TV promedio entre el grupo control y el grupo al que se le ha administrado un compuesto de prueba en el día de evaluación final fue estadísticamente significativa (prueba de Dunnett, $p < 0,05$), y el valor del tratamiento/control (T/C) se calculó usando la siguiente fórmula era inferior a 100, se determinó que el compuesto de prueba era eficaz. Tal caso se indica mediante el símbolo "*" en las figuras.

50
$$\text{T/C (\%)} = (\text{el TV promedio del grupo al que se le ha administrado un compuesto de prueba}) / (\text{el TV promedio del grupo de control}) \times 100$$

55 Como se desprende claramente de los resultados ilustrados en la Fig. 1, el compuesto A para su uso en la presente invención presentó un notable efecto antitumoral sobre la línea celular que expresa EGFR mutante G719A trasplantada subcutáneamente en ratones desnudos, acompañada de regresión tumoral. El efecto también fue mayor que el de afatinib u osimertinib. Los ratones no mostraron síntomas, tales como pérdida de peso grave, como se ilustra en la Fig. 2, heces anormales o piel anormal.

Ejemplo de prueba 4: Prueba de eficacia del fármaco *in vitro*

Evaluación del efecto inhibidor del crecimiento celular en la línea celular que expresa EGFR mutante T790M (*in vitro*)

5 La actividad inhibidora del compuesto en EGFR mutante T790M se evaluó usando células Ba/F3, que son la línea celular precursora de linfocitos B de ratón en la que se introdujo un gen de EGFR humano. Las células Ba/F3 se mantuvieron en un medio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Thermo Fisher Scientific Inc.), y 1 ng/ml de interleucina-3 de ratón (mL-3) (CST); y se codificó un vector PB-CMV-MCS-EF1-GFP+Puro o un vector PB-CMV-MCS-EF1-RFP+Puro en el que un gen de EGFR humano (tipo silvestre (WT), G719A+T790M, o L861Q+T790M) se introdujo en las células, junto con un vector de expresión de Transposasa Super PiggyBac, por electroporación usando un Kit V Amaxa (marca registrada) Cell Line Nucleofector (marca registrada), seguido de selección usando puromicina (SIGMA). Las células Ba/F3 que expresan EGFR mutante G719A+T790M o EGFR mutante L861Q+T790M (que en lo sucesivo en el presente documento se denominarán "Ba/F3-EGFR G719A+T790M", y "Ba/F3-EGFR L861Q+T790M") presentaron un crecimiento independiente de mL-3 en ausencia de EGF.

20 Para evaluar un efecto inhibidor del crecimiento celular, las células Ba/ F3-EGFR G719A+T790M y las células Ba/ F3-EGFR L861Q+T790M fueron suspendidas en un medio RPMI-1640 que contiene FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; y las suspensiones celulares se sembraron de manera individual en cada pocillo de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos, de modo que el recuento celular por pocillo fue de 15.000. Seguidamente, el compuesto A, gefitinib, erlotinib, afatinib y osimertinib (gefitinib, erlotinib, afatinib y osimertinib pueden denominarse cada uno en lo sucesivo en el presente documento como un "compuesto comparativo") se disolvieron individualmente en DMSO y se diluyeron con DMSO o el medio utilizado para suspender las células. Estas soluciones se añadieron luego a cada pocillo de la placa de cultivo de las células, y se incubaron en una incubadora que contenía gas CO₂ al 5 % a 37 °C durante 3 días. El recuento celular después de la incubación se midió usando un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (marca registrada) (Promega Corporation), de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La tasa inhibidora del crecimiento se calculó utilizando la siguiente fórmula para determinar la concentración de cada compuesto de prueba para una inhibición del 50 % (CI₅₀ (µM)).

$$\text{Tasa de inhibición del crecimiento (\%)} = T/C \times 100$$

T: la intensidad de luminiscencia de un pocillo al que se añadió un compuesto de prueba.

C: la intensidad de luminiscencia de un pocillo al que no se añadió el compuesto de prueba.

35 De manera adicional, la relación CI₅₀ entre EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante G719A+T790M, o entre EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante L861Q+T790M se calculó usando la siguiente fórmula. La Tabla 3 ilustra los resultados.

$$\text{Relación CI}_{50} = \text{CI}_{50} (\text{WT}) / \text{CI}_{50} (\text{G719A+ T790M o L861Q+T790M})$$

40 Como resulta evidente de la Tabla 3, el compuesto A presentó una actividad inhibidora selectiva contra la mutación G719A+T790M y la mutación L861Q+T790M.

Tabla 3

	CI ₅₀ (nM)		Relación CI ₅₀	
	G719A+T790M	L861Q+T790M	WT/G719A+T790M	WT/L861Q+T790M
Compuesto A	15,8	37,5	37,9	15,9
Osimertinib	89,4	36,4	4,2	10,4
Afatinib	68,2	168,7	0,3	0,1
Erlotinib	8030,0	6424,2	0,1	0,1

45 Ejemplo de prueba 5: Prueba de eficacia del fármaco *in vivo*

Evaluación del efecto antitumoral en el modelo de ratón trasplantado por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A+T790M

50 La evaluación de modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con una línea celular que expresa EGFR mutante G719A+T790M se realizó usando células NIH-3T3, que son líneas celulares de fibroblastos de ratón en las que se introdujo un gen de EGFR humano. Las células NIH-3T3 se mantuvieron en un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía suero de ternera recién nacida (NBCS) al 10 %, 1.500 mg/l de hidrogenocarbonato de sodio y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Thermo Fisher Scientific Inc.); y se introdujo en las células un vector PB-CMV-MCS-EF1-RFP+Puro en el que se codificó un gen de EGFR

humano (G719A+T790M), junto con un vector de expresión de Transposasa Super PiggyBac, por electroporación usando un Kit R Amaxa (marca registrada) Cell Line Nucleofector (marca registrada), seguido de selección usando puromicina (SIGMA). Las células NIH-3T3 que expresan EGFR mutante en el exón 18 (que pueden denominarse en lo sucesivo en el presente documento "NIH3T3-EGFR G719A+T790M") presentaron un crecimiento en ausencia de EGF en condiciones de NBS al 1 %.

En la evaluación usando modelos de ratón trasplantados por vía subcutánea con la línea celular que expresa EGFR mutante G719A+T790M, los ratones desnudos fueron trasplantados por vía subcutánea con células NIH3T3-EGFR G719A+T790M en las que se introdujo un EGFR humano mutante. En el punto en que el volumen tumoral del tumor injertado en los ratones creció hasta aproximadamente 100 a 300 mm³, los ratones se asignaron en grupos, 5 ratones para cada grupo, mediante aleatorización estratificada de modo que el volumen tumoral promedio entre los grupos fue uniforme. A los ratones se les administró luego el compuesto A para su uso en la presente invención o afatinib una vez al día en días consecutivos.

La dosis de afatinib fue de 20 mg/kg/día, que es la dosis máxima tolerada (la dosis máxima a la que la pérdida de peso durante un período de dosificación es inferior al 20 %), durante 14 días, el período de dosificación de esta prueba. Para el compuesto A para su uso en la presente invención, se establecieron tres tipos de dosis: 200 mg/kg/día (dosis máxima tolerada), 100 mg/kg/día y 50 mg/kg/día. La dosis máxima tolerada se determinó de acuerdo con las "Directrices sobre propuestas de neoplasia experimental en ratones y ratas" del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), desde una perspectiva humanitaria.

Para comparar los cambios en el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo debido a la administración de los compuestos de prueba individuales, el volumen tumoral (que en lo sucesivo en el presente documento se denominará "TV" se utilizó como índice. La Fig. 3 ilustra los cambios en el TV con el tiempo. Para un índice de toxicidad, el peso corporal se midió con el tiempo, y el cambio de peso corporal (que en lo sucesivo en el presente documento se denominará "BWC (%)") a partir del día en que los ratones se dividieron en grupos se calculó de acuerdo con siguiente fórmula. La Fig. 4 ilustra los cambios en el peso corporal con el tiempo.

$$BWC (\%) = (\text{el peso corporal medido el día de la medición del peso corporal}) / (\text{el peso corporal en el día en que los ratones se dividieron en grupos})$$

Se realizó una prueba de Dunnett usando el promedio del TV en el día de evaluación final como índice. Cuando la diferencia en el TV promedio entre el grupo control y el grupo al que se le ha administrado un compuesto de prueba fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), y el valor del tratamiento/control (T/C) calculado usando la siguiente fórmula era inferior a 100, se determinó que el compuesto de prueba era eficaz. Tal caso se indica con el símbolo "*" en la Fig. 3 y en la Tabla 4 (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). De manera adicional, cuando la diferencia en el TV promedio entre el grupo al que se le ha administrado el compuesto A para su uso en la presente invención y el grupo al que se le ha administrado afatinib fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), y el valor T/C del grupo al que se le ha administrado el compuesto A para su uso en la presente invención fue menor que el valor T/C del grupo al que se le ha administrado afatinib, se determinó que el compuesto A tenía un mayor efecto antitumoral que afatinib. Tal caso se indica con el símbolo "#" en la Fig. 3 y en la Tabla 4 (#: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$).

$$T/C (\%) = (\text{el TV promedio del grupo al que se le ha administrado un compuesto de prueba}) / (\text{el TV promedio del grupo de control}) \times 100$$

Como se desprende claramente de los resultados ilustrados en la Fig. 3, el compuesto A para su uso en la presente invención presentó un efecto antitumoral significativo sobre la línea celular que expresa EGFR mutante G719A+T790M trasplantada subcutáneamente en ratones desnudos. De manera adicional, tal como se muestra en la Tabla 4, el efecto fue mayor que el de afatinib, sin síntomas como pérdida de peso grave (como se ilustra en la Fig. 4), heces anormales o piel anormal en ratones.

Tabla 4

Compuesto	Dosis (mg/kg)	T/C (%)	valor de <i>p</i> vs	
			Control	Afatinib
Control	-	100,0	-	-
Compuesto	50	47,7	***	N.S.
Compuesto	100	36,4	***	##
Compuesto	200	28,0	***	###
Afatinib	20	57,4	***	-

N.S.: Sin diferencia significativa
 ***: $p < 0,001$ (prueba de Dunnett vs. grupo de control)
 ##: $p < 0,01$ (prueba de Dunnett vs. grupo de afatinib)
 ###: $p < 0,001$ (prueba de Dunnett vs. grupo de afatinib)

REIVINDICACIONES

- 5 1. S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de un paciente con un tumor maligno que expresa EGFR que tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación G719X del exón 18, una mutación E709X del exón 18 y una mutación L861X del exón 21, en donde X representa un residuo de aminoácido arbitrario.
- 10 2. S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mutación del exón 18 es al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en G719A, G719S, G719C, E709K y E709A.
- 15 3. S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la mutación del exón 21 es L861Q.
- 20 4. S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el EGFR tiene además una mutación T790M.
- 25 5. S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma está en la forma de una composición farmacéutica.
- 30 6. Un método para predecir los efectos terapéuticos de la quimioterapia usando un agente antitumoral que comprende, como principio activo, (S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma en un paciente con un tumor maligno, comprendiendo el método las etapas (1) y (2) siguientes:
 - (1) una etapa para detectar la presencia o ausencia de mutación del gen de EGFR contenido en una muestra biológica obtenida del paciente; y
 - (2) una etapa para predecir que es muy probable que la quimioterapia presente suficientes efectos terapéuticos con respecto al paciente cuando los resultados de la detección en la etapa (1) encontraron que el gen de EGFR tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación G719X del exón 18, una mutación E709X del exón 18 y una mutación L861X del exón 21, en donde X representa un residuo de aminoácido arbitrario.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la mutación del exón 18 es al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en G719A, G719S, G719C, E709K y E709A.
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la mutación del exón 21 es L861Q.
- 45 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde el EGFR tiene además una mutación T790M.
10. S)-N-(4-amino-6-metil-5-(quinolin-3-il)-8,9-dihidropirimido[5,4-b]indolizin-8-il)acrilamida o una sal de la misma, para su uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el paciente se ha sometido a la predicción según lo establecido en una cualquiera de las reivindicaciones 6-9.

Fig. 1

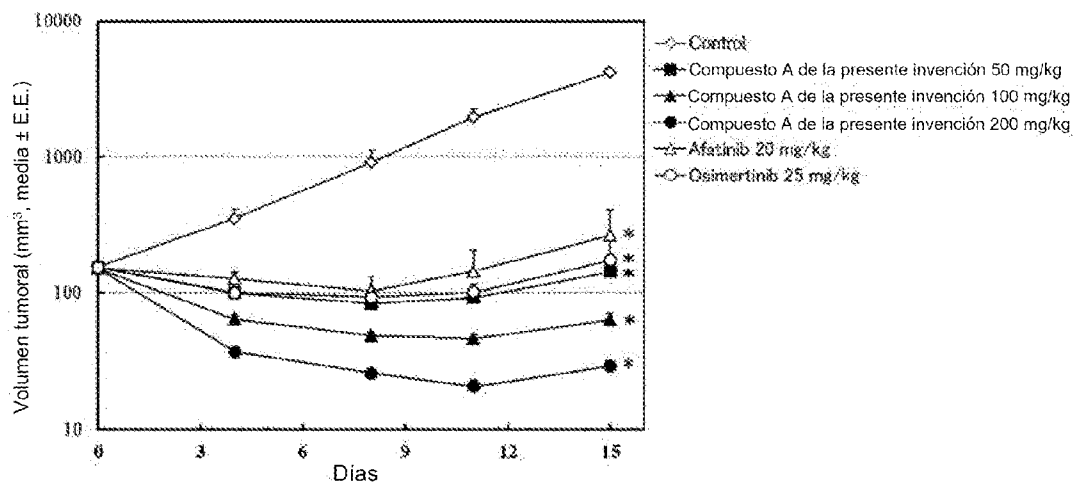


Fig. 2

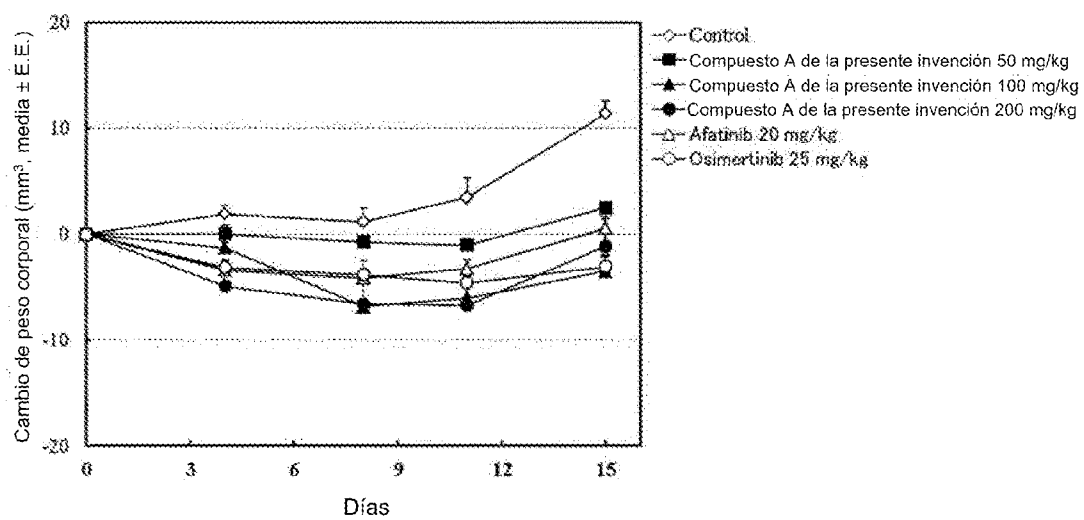


Fig. 3

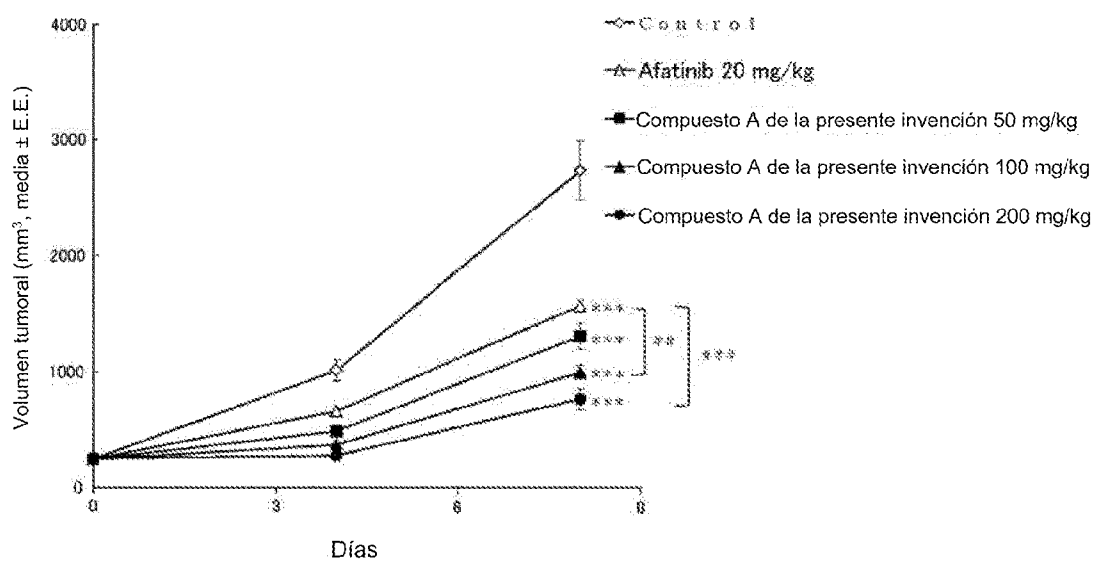


Fig. 4

