

DERIVADOS DE 2-ANILINOPYRIMIDINA COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCERES CEREBRALES

Referencia Cruzada a Solicitudes de Patentes Relacionadas

La presente solicitud de patente reivindica prioridad conforme al Título 35, Artículo 119(e) del Código de Estados Unidos de América, de la Solicitud de Patente Provisoria Estadounidense N° 62/334.830, presentada el 11 de mayo de 2016, cuya invención se incorpora en la presente por referencia.

Antecedentes de la invención

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Her1, ErbB1) es el principal miembro de la familia de ErbB de cuatro receptores de la superficie celular relacionados estructuralmente, donde los demás miembros son Her2 (Neu, ErbB2), Her3 (ErbB3) y Her4 (ErbB4). El EGFR cumple su función celular principal, a través de su actividad de catalítica intrínseca de tirosina proteína quinasa. El receptor se activa mediante la unión con los ligandos del factor de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), que transforma el monómero del EGFR catalíticamente inactivo en homodímeros y

heterodímeros catalíticamente activos. Estos dímeros catalíticamente activos luego inician la actividad intracelular de la tirosina quinasa, que deriva en la autofosforilación de los residuos de tirosina de EGFR específico y produce la activación corriente abajo, de las proteínas de señalización. Posteriormente, las proteínas de señalización inician las cascadas de transducción de señales múltiples (MAPK, Akt y JNK), que finalmente median los procesos biológicos esenciales del crecimiento, la proliferación, la motilidad y la supervivencia celular.

El EGFR se halla a niveles anormalmente altos sobre la superficie de muchos tipos de células de cáncer y los niveles aumentados del EGFR se han asociado con enfermedades avanzadas, la difusión y el mal pronóstico clínico del cáncer. Las mutaciones en el EGFR pueden derivar en la sobreexpresión del receptor, la activación perpetua o la hiperactividad sostenida y derivan en el crecimiento celular descontrolado, es decir, el cáncer. En consecuencia, se han identificado mutaciones del EGFR en varios tipos de tumores malignos, que incluyen cánceres pulmonar, de cabeza y cuello, colorrectal y pancreático metastásicos. En el cáncer pulmonar, las mutaciones ocurren principalmente en los exones 18 a 21, que codifican el receptáculo de unión a trifosfato de adenosina (ATP) del dominio de quinasa. Las

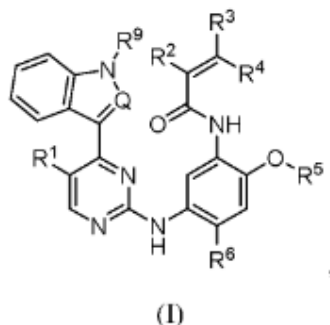
mutaciones del EGFR sensibles a los fármacos más relevantes clínicamente son las eliminaciones en el exón 19 que eliminan el motivo de aminoácido común (LREA) y las mutaciones de punto en el exón 21, que derivan en una sustitución de arginina por leucina en la posición 858 (L858R). Juntas, estas dos mutaciones activantes explican casi el 85% de las mutaciones del EGFR observadas en el cáncer pulmonar. Ambas mutaciones tienen actividad perpetua de tirosina quinasa y, en consecuencia, no son oncogénicas. En por lo menos el 50% de los pacientes que son inicialmente sensibles a la terapia actual, el progreso de la enfermedad está asociado con el de desarrollo de una mutación secundaria, T790M, en el exón 20 del EGFR (denominada la mutación de guardián).

Aproximadamente el 30-50% de los pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas desarrollan metástasis en cerebro (BM) (Baik, C.S.; *J. Thorac. Oncol.* 2015, 10, 1268), pero actualmente no existe ninguna terapia efectiva para su tratamiento.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar cánceres cerebrales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de

la fórmula (I):



o una sal, solvato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ se selecciona de hidrógeno, halógeno, metilo, trifluorometilo y ciano;

R², R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno y trifluorometilo;

R⁵ se selecciona de alquilo inferior, heterociclilo de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido, R⁷R⁸N-(alquilo inferior) y R⁷R⁸N-(cicloalquilalquilo), en donde R⁷ y R⁸ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

R⁶ se selecciona de alcoxi inferior y alquilo inferior; y

Q es C-R¹⁰ o N

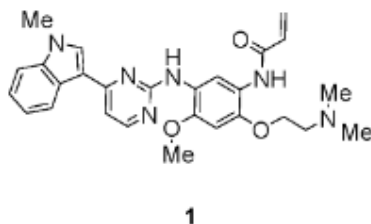
R⁹ es alquilo de C₁-C₄ o haloalquilo de C₁-C₄; y

R¹⁰ es H o CH₃.

En una realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) es el compuesto **1**.

En otra realización preferida, el cáncer cerebral es un cáncer cerebral metastásico y más preferentemente es un cáncer cerebral metastásico desarrollado a partir de un cáncer pulmonar de células no pequeñas mediado por EGFR.

La eficacia de **1** en ratones se determinó mediante la observación de la regresión de tumores implantados en forma intracraneal desde una línea de células de tumores NCI-H1975 habilitadas por luciferasa. La eficacia se basó en datos de imágenes de bioluminiscencia acopladas con puntos finales de supervivencia tradicionales. Se observó un aumento en la vida superior al 100% para animales tratados con **1** comparados con aquellos tratados con excipiente.



Otros aspectos o beneficios de la presente invención se reflejan en los dibujos, descripción detallada y reivindicaciones que siguen a continuación.

Breve Descripción de los Dibujos

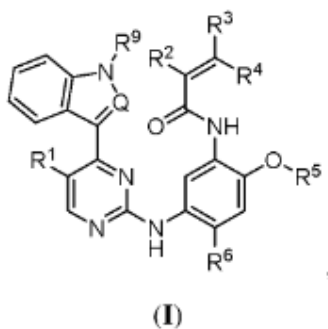
La Figura 1 ilustra una comparación de Grupos de Señales de BLI

de Tumores Cerebrales entre el tratamiento con **1-Ms** y un control excipiente.

La Figura 2 ilustra porcentajes de índices de supervivencia por grupo, comparando el tratamiento con **1-Ms** con un control excipiente.

Descripción Detallada de la Invención

En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar el cáncer cerebral en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I):



o una sal, solvato, profármaco o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ se selecciona de hidrógeno, halógeno, metilo, trifluorometilo y ciano;

R², R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno y trifluorometilo;

R⁵ se selecciona de alquilo inferior, heterociclilo de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido, R⁷R⁸N-(alquilo inferior) y R⁷R⁸N-(cicloalquilalquilo), en donde R⁷ y R⁸ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

R⁶ se selecciona de alcoxi inferior y alquilo inferior; y

Q es C-R¹⁰ o N

R⁹ es alquilo de C₁-C₄ o haloalquilo de C₁-C₄; y

R¹⁰ es H o CH₃.

En una realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), Q es C-R¹⁰.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R⁵ se selecciona de alquilo de C₁-C₆, azetidínilo sustituido o no sustituido, pirrolidínilo sustituido o no sustituido, piperidínilo sustituido, R⁷R⁸N-(CH₂)_n- (n = 1 a 5), R⁷R⁸N-(cicloalquilo de C₃-C₆)-(CH₂)_m- (m = 1 a 3), en donde R₇ y R₈ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo inferior.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R⁵ se selecciona de metilo, R⁷R⁸N-(CH₂)_n- (n = 2 o 3), 1-(dimetilamino)-ciclopropilmetilo, 3-

(dimetilamino)ciclobutilo, 1-metilazetidin-3-ilo, (R)-1-metilpirrolidin-3-ilo, (S)-1-metilpirrolidin-3-ilo y 1-metilpiperidin-4-ilo.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R⁵ es 2-dimetilamino-etilo[(CH₃)₂NCH₂CH₂-].

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R¹ es hidrógeno o halógeno, o metilo.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R¹ es hidrógeno.

En otro aspecto de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R² es hidrógeno o halógeno.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R⁴ es hidrógeno.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I):

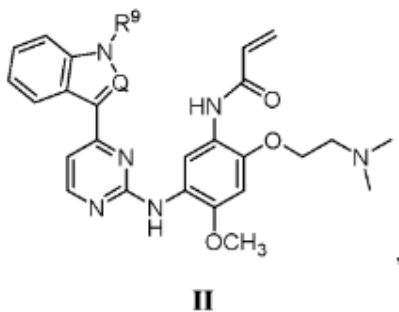
R² es hidrógeno, F, o Cl;

R³ es hidrógeno, F, Cl, o -CF₃; y

R⁴ es hidrógeno.

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (I), R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son todos hidrógeno.

En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) también se caracteriza por una estructura de la fórmula (II):



en donde:

Q es C- R^{10} o N

R^9 es CH_3 o CH_2CH_2F ; y

R^{10} es H o CH_3 .

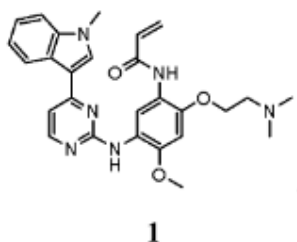
En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (II), Q es C- R^{10} .

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (II), R^9 es CH_3 .

En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (II), Q es CH.

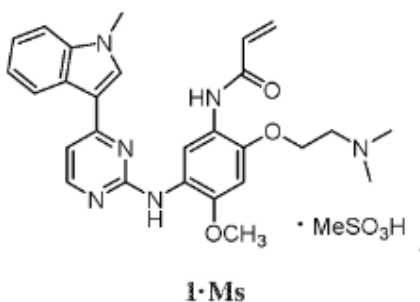
En una realización preferida de este aspecto, el compuesto de la

fórmula (I) también se caracteriza por la estructura de la fórmula:

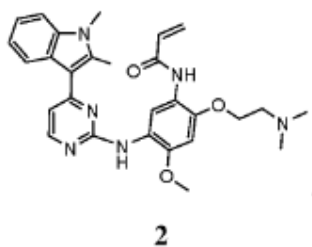


En otra realización preferida de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto 1.

En otra realización preferida de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) es una sal del ácido metanosulfónico del compuesto 1, es decir, 1-Ms.

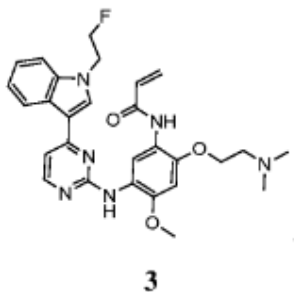


En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) también se caracteriza por una estructura de la fórmula:

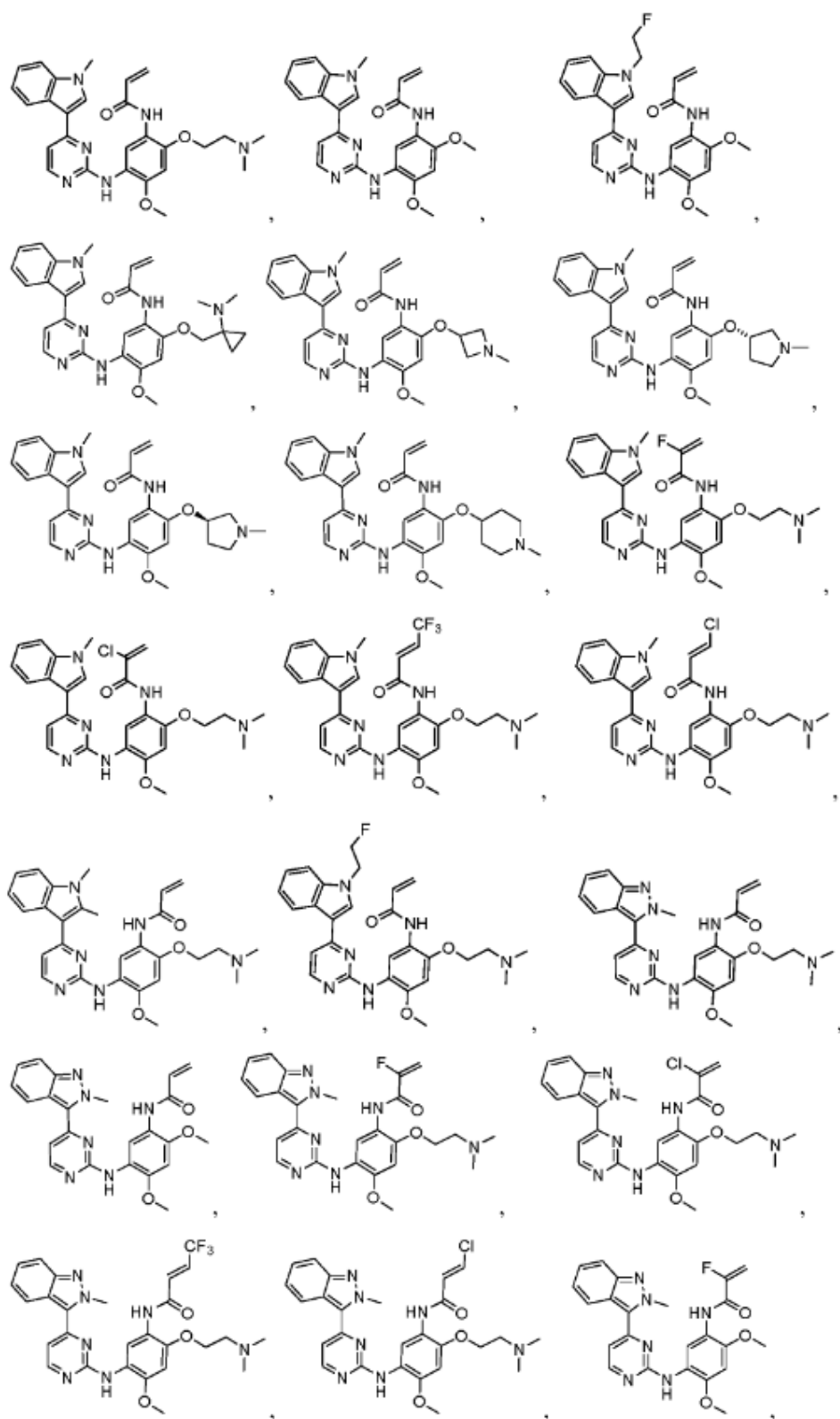


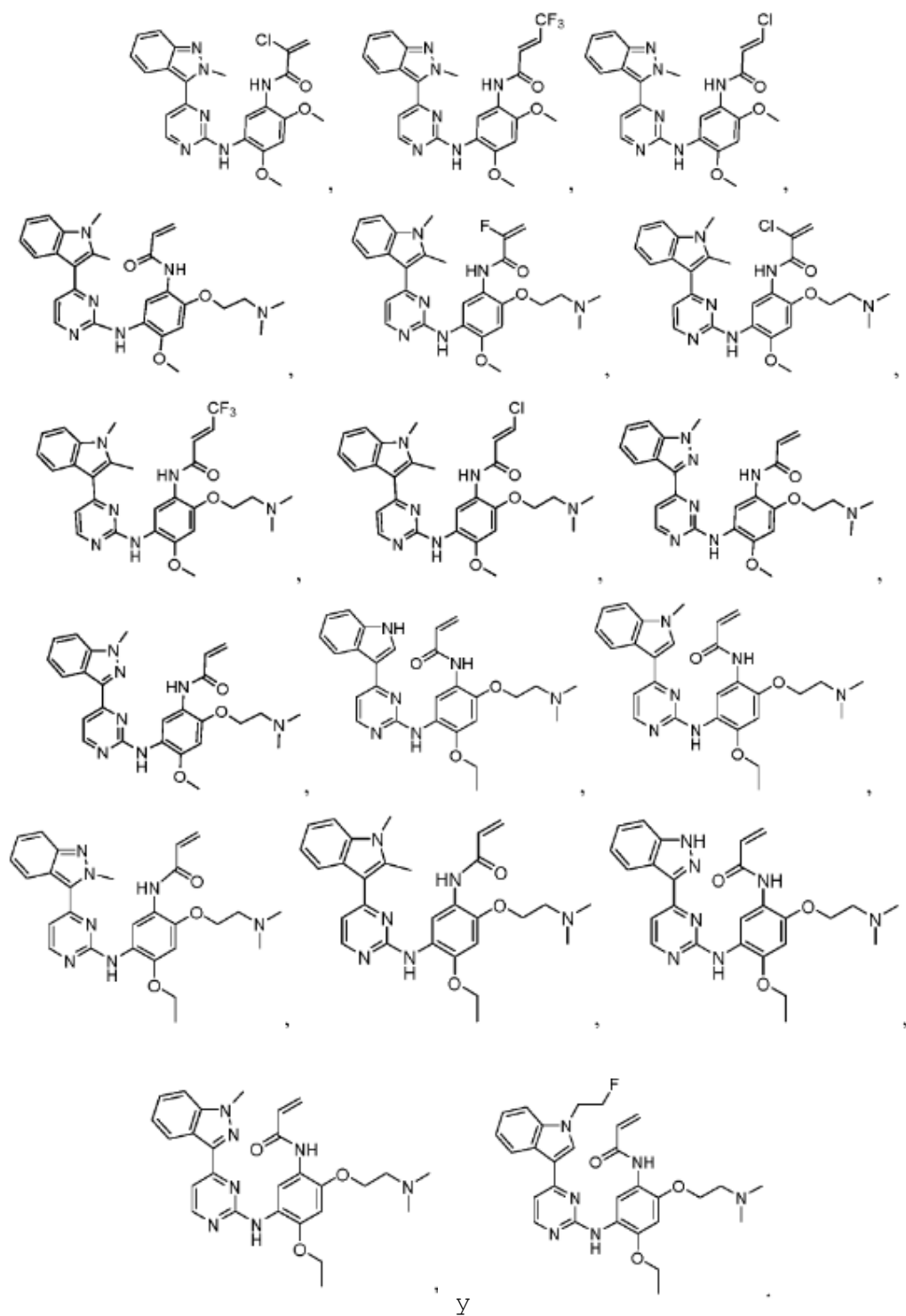
En otra realización de este aspecto, en el compuesto de la fórmula (II), R^9 es $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$.

En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) también se caracteriza por una estructura de la fórmula:



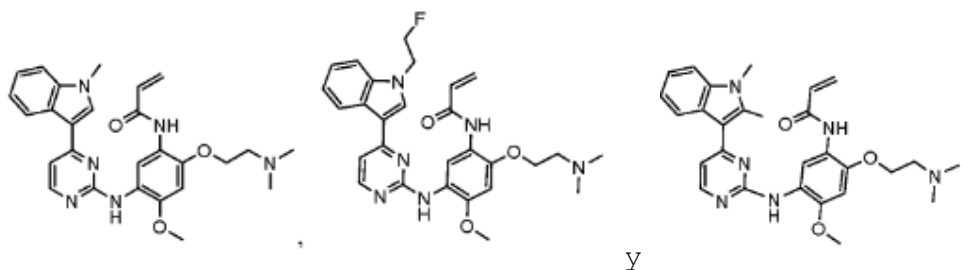
En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:





y

En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:



En otra realización de este aspecto, el método comprende administrar al sujeto un segundo agente terapéutico.

En otra realización de este aspecto, el segundo agente terapéutico es un modulador de EGFR diferente.

En otra realización de este aspecto, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

En otra realización de este aspecto, dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral metastásico.

En una realización preferida de este aspecto, dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral metastásico desarrollado a partir de un cáncer mediado por EGFR.

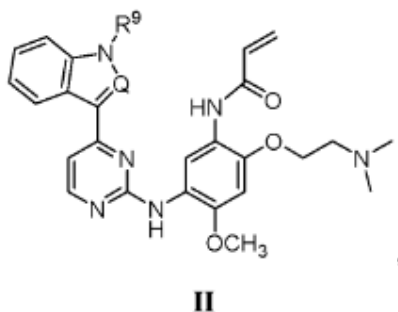
En otra realización preferida de este aspecto, dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral metastásico desarrollado a partir del cáncer pulmonar de células no pequeñas mediado por EGFR.

En otra realización de este aspecto, el método de acuerdo con cualquier realización descrita anteriormente comprende administrar al sujeto, una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de la fórmula (I) o (II), o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es el compuesto 1.

En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es la sal del ácido metanosulfónico del compuesto 1 (1-Ms).

En otro aspecto, la presente invención provee el uso de un compuesto de la fórmula (I), o una sal, solvato, profármaco o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer cerebral:



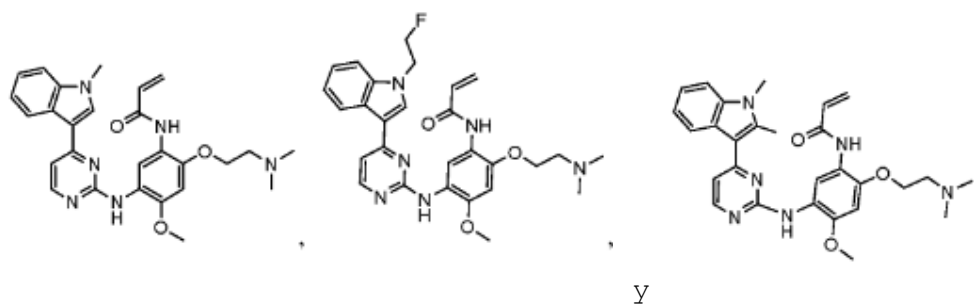
en donde:

Q es C-R¹⁰ o N

R⁹ es CH₃ o CH₂CH₂F; y

R¹⁰ es H o CH₃.

En otra realización de este aspecto, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:



En otra realización de este aspecto, el cáncer cerebral es un cáncer cerebral metastásico.

En otra realización de este aspecto, el cáncer cerebral es un cáncer cerebral metastásico desarrollado a partir de un cáncer pulmonar de células no pequeñas mediado por EGFR.

Otros aspectos o realizaciones de la presente invención incluyen aquellos que se muestran y se suscriben sustancialmente y todas las combinaciones posibles de dos o más cualquiera de las realizaciones descritas en la presente.

Los términos que aparecen en la presente solicitud de patente, si no se definen específicamente, tienen sus definiciones comunes que comprenderían los expertos en el arte.

Como se usa en la presente, el término "halo" o "halógeno" se refiere a F, Cl o Br.

El término "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo ramificado o de cadena recta que tiene de uno a siete átomos de carbono, preferentemente de uno a cuatro y más preferentemente de uno a dos átomos de carbono.

El término "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi (-OR) que tiene de uno a siete, preferentemente de uno a cuatro y más preferentemente de 1 a dos átomos de carbono.

El término "ciano" se refiere a -CN.

El término “farmacéuticamente aceptable”, como se usa en la presente, se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación, reacción alérgica, u otro problema o complicación excesiva, conmensurable con una relación riesgo-beneficio razonable y son efectivos para su uso deseado.

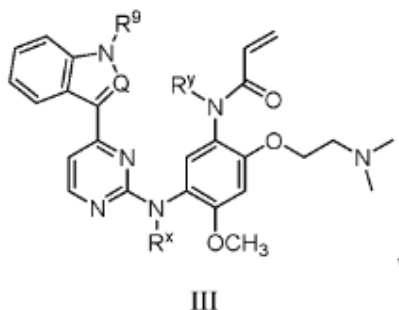
Como se usa en la presente, el término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida y similares y son conmensurables con una relación de riesgo-beneficio razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Ejemplos de sales de adición ácidas no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, son sales del grupo amino formado con sales inorgánicas tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido nucleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos

usados en el arte tales como intercambio de iones. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurilo, malato, maleato, malonato, mentanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 2-fenilpropionato, fosfato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares.

Por el término "solvato", como se usa en la presente, se entiende una asociación física de un compuesto de la presente invención con una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de moléculas de solventes. Por ejemplo, una molécula del compuesto se asocia con una o más, preferentemente de una a tres, moléculas de solvente. También es posible que varias moléculas (por ejemplo, dos) moléculas del compuesto comparten una molécula de solvente. La asociación física puede incluir un enlace de hidrógeno. En determinados casos, los solvatos son capaces de

aislamiento como un sólido cristalino. Las moléculas de solvente del solvato pueden estar presentes en una disposición regular y/o en una disposición no ordenada. Ejemplos de solvatos incluyen, en forma no taxativa, hidratos, etanolatos, metanolatos e isopropanolatos. Los métodos de solvatación generalmente se conocen en el arte.

El término "profármaco", como se usa en la presente, se refiere a un derivado de un compuesto que se puede transformar in vivo para producir el compuesto parental, por ejemplo, mediante la hidrólisis en la sangre. Los ejemplos comunes incluyen, en forma no taxativa, formas de éster y de amida de un compuesto ácido carboxílico activo; o viceversa, un éster de un compuesto alcohol activo o una forma de amida de un compuesto amina activa. Dicho compuesto profármaco de amida o de éster se puede preparar de acuerdo con métodos convencionales conocidos en el arte. Por ejemplo, un profármaco de un compuesto de la fórmula II de la presente invención puede estar en la forma de la siguiente fórmula III:



en donde R^x y R^y son independientemente H y $-C(O)-R$, en donde R es alquilo de C_1-C_4 , preferentemente metilo etilo y más preferentemente metilo. Otros profármacos de la presente invención se pueden preparar en forma similar.

Cuando es posible que, para su uso en terapia, se pueden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la presente invención, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, se pueden administrar como el compuesto químico en crudo, es posible presentar el ingrediente activo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la invención además provee composiciones farmacéuticas, que incluyen todos los compuestos de la presente invención, o las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos y uno o más, preferentemente de uno a tres, portadores, diluyentes, u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El portador(es), diluyente(s), u otro excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el sujeto al que se está tratando.

Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse en formas de dosis que contienen una cantidad predeterminada del ingrediente activo por dosis unitaria. Normalmente, las composiciones

farmacéuticas de la presente invención se administran de 1 a 5 veces por día o alternativamente, como una infusión continua. Dicha administración se puede usar como una terapia crónica o aguda. La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con los materiales de portadores para producir una sola forma de dosificación varía según la condición que se esté tratando, la gravedad de la condición, el horario de administración, la vía de administración, el índice de excreción del compuesto empleado, la duración del tratamiento y la edad, el género, el peso y la condición del paciente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria, como se menciona en la presente, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones pequeñas sustancialmente menores que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosificación se incrementa mediante pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo en esas circunstancias. En general, el compuesto se administra más preferentemente a un nivel de la concentración que generalmente alcanza resultados efectivos sin producir efectos colaterales dañinos o perjudiciales sustanciales.

Cuando las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de un compuesto de la presente invención y uno o

más, preferentemente uno o dos, agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional habitualmente presentes a niveles de dosificación de entre el 10% y el 150% y más preferentemente entre el 10% y el 80% de la dosificación que se administra normalmente en un régimen de monoterapia.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por la vía oral (que incluye bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (que incluye bucal, sublingual, o transdérmica), vaginal, o parenteral (que incluye inyecciones o infusiones subcutánea, intracutánea, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa, o intradérmica). Dichas formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido en el arte de la farmacia, por ejemplo, asociando el ingrediente activo con el portador(es) o excipiente(s). Se prefiere la administración oral o la administración mediante inyección.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas o tabletas; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos

comestibles; emulsiones líquidas de aceite en agua o de agua en aceite.

Por ejemplo, para la administración oral en la forma de una tableta o cápsula, el componente farmacológico activo se puede combinar con un portador inerte oral, farmacéuticamente aceptable y no tóxico, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclando con un portador farmacéutico triturado en forma similar tal como un carbohidrato comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. También pueden estar presentes un agente saborizante, conservante, dispersante y colorante.

Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla de polvos, como se describe anteriormente, y rellenando cápsulas de gelatina formadas. Se pueden agregar deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, o polietilenglicol sólido, a la mezcla de polvo antes de la operación de rellenado. Se puede agregar también un agente de desintegración o de solubilización tal como agar-agar, carbonato de calcio, o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

Además, cuando se desee o sea necesario, se pueden incorporar en la mezcla, ligantes, lubricantes, agentes de desintegración y agentes colorantes. Los ligantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de almidón, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegradores incluyen, en forma no taxativa, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, goma xántica y similares. Las tabletas se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o deformando, agregando un lubricante y un desintegrador y prensándola en tabletas. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, triturado adecuadamente, con un diluyente o una base como se describe anteriormente y opcionalmente, con un ligante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinil pirrolidona, un retardante de la solución tal como parafina, un acelerador de la resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín, o fosfato de dicalcio. La mezcla de polvo se puede granular humedeciéndola con un ligante tal como un jarabe, una pasta de almidón, mucílago de acacia, o una solución de materiales celulósicos o poliméricos y empujando a través de un tamiz. Como una alternativa a la

granulación, la mezcla de polvo se puede realizar a través de la máquina de fabricación de tabletas y el resultado son pedazos formados rotos en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para impedir que se adhieran a las matrices para la formación de tabletas mediante el agregado de ácido esteárico, una sal de estearato, talco, o aceite mineral. La mezcla lubricada luego se comprime en tabletas. Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar con un portador inerte que fluye libremente y se pueden comprimir en tabletas directamente sin pasar por los pasos de granulación o deformación. Se puede proveer un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en un recubrimiento sellador de laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento de pulido de cera. Se pueden agregar sustancias colorantes a estos recubrimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Se pueden preparar líquidos orales tales como solución, jarabes y elíxires en una forma de dosificación unitaria de manera tal que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Se pueden preparar jarabes disolviendo el compuesto en una solución acuosa saborizada adecuadamente, mientras que se preparan elíxires a través del uso de un excipiente no tóxico. Se pueden agregar solubilizantes y emulsionantes tales como

alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de sorbitol de polioxietileno, aditivos saborizantes tales como aceite de menta verde o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales y similares.

Cuando corresponda, se pueden microencapsular formulaciones de dosificación unitaria para la administración oral. La formulación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación como por ejemplo recubriendo o insertando el material particulado en polímeros, cera, o similares.

Se debe comprender que además de los ingredientes mencionados en forma particular anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en el arte con respecto al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

El término "paciente" o "sujeto" incluye tanto humanos como otros mamíferos.

El término "mamífero" o "animal mamífero" incluye, en forma no taxativa, humanos, perros, gatos, caballos, cerdos, vacas, monos, conejos y ratones. Los mamíferos preferidos son los humanos.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un compuesto o composición que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” puede variar según, entre otros, el compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, u otros factores del sujeto a quien se debe tratar. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que derivan en el efecto terapéutico, ya sea que se administren en combinación, en serie, o en forma simultánea.

El término “tratar” o “tratamiento” se refiere a: (i) inhibir la enfermedad, el trastorno, o la condición, es decir, detener su evolución; (ii) aliviar la enfermedad, el trastorno, o la condición, es decir, producir la regresión de la enfermedad, el trastorno y/o la condición; o (iii) impedir que una enfermedad, un trastorno o una condición ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, el trastorno y/o la condición pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene. Por lo tanto, en una realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a mejorar una enfermedad o un trastorno, que puede incluir mejorar uno o

más parámetros físicos, aunque puede no ser discernible por el sujeto a quien se está tratando. En otras realizaciones, “tratar” o “tratamiento” incluye modular la enfermedad o el trastorno, físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible) o fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico) o ambos. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” incluye retardar el inicio de la enfermedad o el trastorno.

Cuando el término “aproximadamente” se aplica a un parámetro, tal como una cantidad, una temperatura, un tiempo, o similares, se indica que el parámetro puede variar habitualmente $\pm 10\%$, preferentemente dentro de $\pm 5\%$ y más preferentemente dentro de $\pm 2\%$. Como lo comprendería una persona experta en el arte, cuando un parámetro no es crítico, un número provisto en los Ejemplos se suele dar solamente con propósitos ilustrativos, en lugar de taxativos.

El término “un”, “una”, “el” o “la”, como se usa en la presente, representa las formas en singular, así como en plural. En general, cuando se usa la forma en singular o en plural de un sustantivo, indica las formas en singular, así como en plural del sustantivo.

Los siguientes Ejemplos no taxativos también ilustran determinados aspectos de la presente invención.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

N-(2-(2-(Dimetilamino)etoxi)-4-metoxi-5-((4-(1-metil-1H-indol-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acrilamida metanosulfonato (**1-Ms**; $C_{27}H_{30}N_6O_3 \cdot 1,06 CH_3SO_3H$, Peso molecular = 486,58, FW = 588,45, pureza = 100%) se formuló en un excipiente de 1% de polisorbato 80 en agua. Se agregó el excipiente completo al compuesto pesado previamente para lograr 5 mg/mL de una solución de material, adecuado para el tratamiento del nivel de dosis de 50 mg/kg. La mezcla se revolvió durante aproximadamente 1 minuto, lo cual deriva en una solución de color amarillo claro con un valor del pH de 7. La solución de dosificación se preparó diariamente nueva.

Animales

Se usaron ratones Desnudos Envigo hembra (Hsd: *Foxn1^{nu}* Desnudo Atómico). Tenían 6-7 semanas el Día 1 del experimento. Se alimentó a los animales con Dieta para Roedores Harlan 2918.15 irradiada y con agua espontáneamente. Se alojó a los animales en

jaulas estáticas con lechos Bed-O'Cobs™ en el interior de Ambientes Limpios que proveen aire filtrado Particulado de Alta Eficiencia (H.E.P.A., por su sigla en inglés) dentro del ambiente de burbuja a 100 cambios de aire completos por hora. Todos los tratamientos, determinaciones del peso corporal y mediciones de tumores se llevaron a cabo en el ambiente de burbuja. El ambiente se controló a un rango de temperatura de $21,1^{\circ}\text{C} \pm -16^{\circ}\text{C}$ y un rango de humedad del 30-70%.

Preparación de Células

Se obtuvieron células NCI-H1975-Luc de Clovis. Se cultivaron en el medio de RPMI 1640 que se modificó con 1 mM piruvato de Na + 2 mM L-glutamina + 10 mM HEPES + 2,5 g/L de glucosa + 5 $\mu\text{g/mL}$ de blasticidina y se complementó con 10% Suero Bovino Fetal (FBS) no inactivado por calor y 1% 100X Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina (PSG). El medio de crecimiento se mantuvo en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 55 a 37°C . Cuando la dilatación fue completa, las células (pasaje 4) se trató con tripsina usando 0,25% de solución de tripsina-EDTA. Después de la separación de las células, la tripsina se inactivó mediante la dilución con el medio de cultivo completo y todos los grumos de células se separaron mediante una pipeta. Las células se centrifugaron a 200 rcf durante 8 minutos a 4°C , el sobrenadante

se aspiró y la pelotilla se suspendió nuevamente en Solución Salina con Tampón de Fosfato de Dulbecco (DPBS) frío mediante una pipeta. Se diluyó una alícuota de la suspensión de células homogénea en una solución de azul de tripsina y se contó usando un contador de células automático Luna para determinar la viabilidad de las células antes de la implantación. La suspensión de células se centrifugó a 200 rcf durante 8 minutos a 4°C. el sobrenadante se aspiró y la pelotilla de células se suspendió nuevamente en el medio sin suero frío para generar una concentración final de $1,00E+08$ células/mL que excluye tripan. La suspensión de células se mantuvo sobre hielo húmedo durante la implantación. Después de la implantación, se diluyó una alícuota de las células remanentes con una solución de azul de tripan y se contó para determinar la viabilidad de las células después de la implantación.

Implantación intracraneal

Se implantó a los ratones del ensayo en forma intracraneal el Día 0 con $1,00E+06$ células por cada 10 μ L según el protocolo (Apéndice 1). Para la implantación quirúrgica aséptica, se inyectó a los ratones con 0,2 mg/kg de buprenorfina y se los anestesió usando 2% de isoflurano en aire. Los ratones luego se aseguraron en un marco estereotáxico (ASI Instruments, Inc.)

usando barras para las orejas sin ruptura. Se aplicó un ungüento ocular a los ojos de los ratones para impedir el secado durante la cirugía. Se usó un tampón calentado con agua a 37°C recirculante para mantener la temperatura corporal del animal durante el procedimiento de implantación. Una vez que estaba en el marco estereotáxico, el cráneo se limpió con un tapón alternando la solución de clorhexidina y 70% de tapones saturados con etanol para desinfectar la superficie de la piel y prepararlo para la incisión. Se hizo una incisión longitudinal de 1 cm en el centro sobre el bregma del cráneo usando un bisturí N°15 BD. La incisión se retrajo usando serrefines aserrados, pequeños. La capa delgada del tejido conectivo que cubre la superficie del cráneo se extirpó usando tapones de algodón secos bajo leve presión. Los vasos sangrantes se cauterizaron para impedir la pérdida de sangre. Una broca de 0,9 mm luego se centró sobre el bregma, se movió 2 mm hacia la derecha, 1 mm anterior a la sutura coronal y se bajó para cortar la superficie del cráneo usando el brazo manipulador de electrodos estereotáxicos. La broca se retiró del marco estereotáxico y el barreo a través del cráneo hacia la superficie de la dura madre se terminó manualmente. La suspensión de células (almacenada sobre hielo húmedo) se mezcló y se arrastró hacia una jeringa Hamilton hermética para los gases de 50 µL. Una aguja de 27g normal se llenó con la suspensión de células para eliminar los bolsillos de aire y la punta láser de

la jeringa se insertó en el cubo de la aguja. La jeringa se aseguró a un soporte para jeringas hecho a medida (ASI Instruments, Inc.) y se montó sobre el brazo manipulador de marco estereotáxico. La aguja de la jeringa se centró sobre el barreno y se bajó hasta que la punta biselada estaba a nivel con el lado inferior del cráneo en la superficie de la dura madre. La aguja luego se bajó 3 mm en el cerebro y se retrajo 1 mm y formó un "depósito" para la deposición de la suspensión de células. Luego se inyectaron 10 μL de la suspensión de células (1×10^6 células/ratón), lentamente en el tejido cerebral con una ligera fuga (típica de los implantes intracraneales) que se está absorbiendo con un tapón de algodón seco. Después de la inyección, la aguja se retiró y el barreno se selló inmediatamente con cera ósea para minimizar la pérdida de células implantadas. La superficie del cráneo luego se limpió alternando tapones de algodón secos y aturados con 70% de etanol para eliminar las células extrañas y detener el crecimiento del tumor extracraneal. El ratón se retiró del marco estereotáxico y la incisión se cerró usando una pinza para heridas de acero inoxidable. Una vez que el ratón recuperó la conciencia y la inclinación dorsal, se lo devolvió a su jaula.

Tratamiento

Todos los ratones se clasificaron en grupos de tratamiento basado en la estimación de la carga de tumores mediante imágenes de bioluminiscencia. Los ratones se distribuyeron para asegurar que la carga promedio de tumores para todos los grupos estuviera dentro del 10% de la carga de tumores promedio total para la población del estudio. El tratamiento comenzó el Día 5.

Grupo 1: Control Excipiente (1% de polisorbato 80), 0,2 mL/20g, PO, QDx11 (una vez por día los Días 5-15).

Grupo 2: 1-Ms, 50 mg/kg, PO, QDx14 (una vez por día los Días 5-18)

Imágenes de Bioluminiscencia

Se realizaron imágenes de bioluminiscencia in vivo usando un aparato para imágenes óptico IVIS 50 (Xenogen, Alameda, CA). Se tomaron imágenes de los animales de a tres por vez con 1-2% anestesia de gas isoflurano. Se inyectó a cada uno de los ratones IP con 150 mg/kg de D-luciferina y se tomaron imágenes en la posición postrada, 10 minutos después de la inyección. Se usó la colocación en cajones grandes de pedazo del chip de CCD y se ajustó el tiempo de exposición (de 2 segundos a 2 minutos) y se obtuvieron por lo menos varios centenares de cuentas desde los tumores metastásicos que se pudieron observar en cada uno de los

ratones de la imagen y para evitar la saturación del chip de CCD. Se recogieron imágenes de BLI los Días 5, 8, 11, 13, 15 y 18. Las imágenes se analizaron usando el software Living Image versión 4.3.1 (Xenogen, Alameda, CA). Se colocaron ROI de volumen fijo para abarcar el tumor principal sobre imágenes apaisadas para cada uno de los animales y se los marcó basado en la identificación de los animales. Se calculó el flujo total (fotones/segundo) y se lo exportó para todas las ROI para facilitar los análisis entre los grupos.

Mediciones y puntos finales

Se usó el porcentaje de T/C de la carga de tumores principal (estimada mediante BLI) como el punto final principal del estudio. El porcentaje de T/C se define como la señal mediana de BLI del grupo tratado dividida por la señal mediana de BLI del grupo control x 100. El Día 13 se usó el porcentaje de T/C para el análisis porque fue el último día en que se realizaron las imágenes y más del número mediano de animales del grupo control permaneció en el estudio. La extensión de la vida se usó como un punto final secundario en este estudio. Una respuesta completa (CR) se define como una reducción en la masa del tumor (basado en las imágenes de bioluminiscencia) a una señal no confiable (por debajo de $2,0E+05$ fotones/segundo). Los niveles de fondo

para la BLI normalmente están en el rango de $1E+03$ – $1E+04$ fotones/segundo. Una respuesta parcial 50% en la señal de BLI de tumor desde aquella del primer tratamiento. Las PR son excluyentes de las CR.

Resultados de Eficacia

Grupo 2: 1-Ms, 50mg/kg, PO, QDx14 (una vez por día los Días 5~18).

El tratamiento con 1-Ms produjo una actividad anticáncer significativa ($P<0,05$) basado en el porcentaje de T/C del Día 13 obtenida de BLI (1%; Figura 1). La vida mediana fue 29,0 días (107% de ILS o aumento de 15 días en la vida) ($p<0,001$). El Día 18, el 100% de los animales tuvo regresiones parciales del tumor y ninguno tuvo regresiones completas (Figura 2).

El compuesto 1 también inhibe efectivamente el dominio de quinasa del mutante doble T790M además de las mutaciones activantes y, en consecuencia, supera la resistencia observada con la terapia usada actualmente de los inhibidores reversibles. Dado que el papel del EGFR en el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) está bien establecido (Ohashi, K.; et al. *J. Clin. Oncol.* 2013, 31, 1070), 1 representa un agente terapéutico

potencial para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas.

El compuesto 1 alcanza niveles terapéuticos de concentración en el cerebro cuando se dosifica por vía oral en la rata (Tabla 1). Además, 1 fue eficaz contra tumores cerebrales implantados en forma intracraneal en ratones. En consecuencia, 1 representa un agente terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer cerebral metastásico mediado por EGFR.

El tratamiento con 1-Ms se toleró bien y produjo una actividad anticáncer significativa ($P < 0,05$) basado en el % de T/C de BLI del Día 13 y la vida. Si bien todos los ratones finalmente murieron de la enfermedad, la vida fue más del doble con el tratamiento con 1-Ms.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos (PK) para 1-Ms en ratas SD machos dosificados PO a 5 mg/kg usando un 0,5% de excipiente de metilcelulosa

Parámetro	Plasma	Cerebro
C _{max} (ng/mL o ng/g)	96,3	606
T _{max} (h)	2,00	2,00
T _{1/2} (h)	1,97	2,01
T _{último} (h)	18,0	18,0

AUC _{0-último} (ng•h/mL o ng•h/g)	535	5047
AUC _{0-inf} (ng•h/mL o ng•h/g)	538	5085
MRT _{0-último} (h)	5,01	5,95
MRT _{0-inf} (h)	5,10	6,07
AUC _{Extra} (%)	0,593	0,746
AUMC _{Extra} (%)	2,42	2,57
Relación de ^d AUC	--	9,44

Los ejemplos precedentes o las realizaciones preferidas se proveen con fines ilustrativos y no están destinados a limitar la presente invención. Se pueden utilizar numerosas variantes y combinaciones de las características expuestas anteriormente sin apartarse de la presente invención expuesta en las reivindicaciones.