

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 863**

51 Int. Cl.:

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2012 E 12821445 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2754441**

54 Título: **Composición para la prevención y el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, que contiene derivados de pirazino-triazina**

30 Prioridad:

09.08.2011 KR 20110079314
03.11.2011 US 201161555428 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2016

73 Titular/es:

JW PHARMACEUTICAL CORPORATION (100.0%)
2477 (Secho-dong) Nambusunhwan-ro
Secho-gu, Seoul 137-864, KR

72 Inventor/es:

CHA, JOO-YOUNG;
LEE, KWAN-HOO y
JUNG, JI-EUN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 577 863 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

Composición para la prevención y el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, que contiene derivados de pirazino-triazina

Antecedentes de la invención

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición para la prevención y tratamiento de NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), que comprende un derivado de pirazino-triazina.

[Técnica anterior]

2. Descripción de la técnica relacionada

10 El cáncer de pulmón primario, que se origina en el pulmón como implica el término, se clasifica ampliamente en cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) según el tipo histológico. Representando más del 80 % de los cánceres de pulmón, el cáncer de pulmón de células no pequeñas es la principal causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos, con una tasa de curación inferior al 15 % y un período medio de supervivencia de 8~10 meses. Una vez que el cáncer ha evolucionado más allá de las primeras etapas, no se permiten los métodos quirúrgicos, y el único recurso es la quimioterapia. Sin embargo, el NSCLC tiene baja sensibilidad a los agentes anticáncer, ya que es muy heterogéneo, y consiste en diferentes tipos de células.

Por esta razón, se utiliza predominantemente la terapia doblete de fármacos citotóxicos para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Entre los fármacos citotóxicos utilizados para la terapia doblete para el NSCLC están carboplatino, paclitaxel, docetaxel, etopósido, cisplatino, doxorubicina, y similares, siendo la combinación preferente paclitaxel y carboplatino. Además, el inhibidor de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKI), una terapéutica dirigida que inhibe el factor de crecimiento epidérmico (EGF), está comercialmente disponible bajo los nombres registrados de Tarceva® e Irresa® como fármacos para el NSCLC.

Al causar una toxicidad importante, la terapia doblete de estos fármacos citotóxicos se aplica de manera limitada a los pacientes que son físicamente débiles, tales como los pacientes seniles. Además, esta terapia no puede garantizar ni una buena eficacia anticáncer, ni una baja tasa de recaídas en los pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas en una fase muy temprana o en una fase avanzada. Por lo tanto, existe la necesidad de un régimen de quimioterapia nuevamente establecido dirigido al NSCLC centrado en agentes anticáncer terapéuticamente excelentes y no tóxicos.

Los compuestos terapéuticos dirigidos, tales como el inhibidor de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKI), sólo son aplicables a los pacientes con cáncer que expresan factores objetivos específicos. Por ejemplo, un informe clínico ha comunicado que Tarceva® o Irresa® tienen altos efectos terapéuticos particularmente para algunos de los pacientes que tienen una mutación en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (mutación activa de EGFR (L858R, delE746_A750)), en comparación con los pacientes que tienen EGFR natural (WT). Esta respuesta clínica es atribuible al aumento de la afinidad de unión de EGFR TKI para el EGFR mutado (Science Vol. 304,4, june 2004). Sin embargo, a pesar de la excelente actividad anticáncer del EGFR TKI en pacientes con la mutación activa, muchos de los pacientes tratados con EGFR TKI en 2005 han recaído en quimiorresistencia al EGFR TKI, y un análisis epigenético ha demostrado que el aminoácido guardián en EGFR TKI, treonina 790, se transforma en metionina (T790M) en el 50 % de los pacientes con recaídas (Figuras 1 y 2). El análisis cristalográfico demuestra que la mutación T790M produce resistencia al fármaco por disminución de la afinidad de unión debido al impedimento estérico en la posición de unión entre Tarceva® y el residuo de metionina (NEJM Vol. 352, 8, Feb. 2005). Además de la mutación T790M, también se han comunicado otras mutaciones, incluyendo L747S, D761Y y T854A, pero representan menos del 10 % de las recaídas y por lo tanto son menos importantes (Nature reviews cancer Vol. 10, 2010). No hay datos suficientes sobre cuál es el tratamiento adecuado para los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas que tienen tanto la mutación de activación como la mutación T790M (exón 20) (British Journal of Cancer 105 (1), 1-8, 2011).

Existe por lo tanto la necesidad de un agente que presente un excelente efecto terapéutico sobre el cáncer de pulmón de células no pequeñas en los pacientes que tienen una mutación activa sobre EGFR, así como en los pacientes que tienen EGFR natural y para los pacientes con recaída en la quimiorresistencia al EGFR TKI.

El documento US 2004/072831 se refiere a derivados de pirazino-triazina para uso en el tratamiento del cáncer. Al mismo tiempo, los documentos WO12/050393, WO10/120112, WO09/05197 y WO09/148192 describen una serie de compuestos en la forma de derivados de pirazino-triazina que muestran actividad anticáncer. Los efectos terapéuticos que tienen los compuestos mencionados anteriormente sobre el cáncer de pulmón de células no pequeñas no se menciona en ninguna parte en los documentos de la técnica anterior. Entre ellos, se encontró

sorprendentemente por los presentes inventores que los derivados de los compuestos representados por la fórmula química 1 tienen efectos terapéuticos sobre el NSCLC resistente al EGFR TKI.

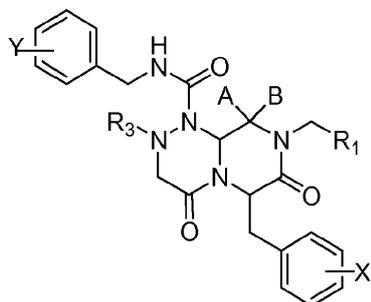
Sumario de la invención

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para la prevención y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que comprende un derivado de pirazino-triazina.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para el tratamiento de NSCLC, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición a un sujeto que lo necesite.

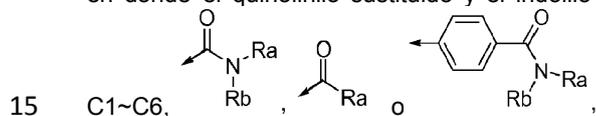
10 De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención proporciona una composición para la prevención o tratamiento del NSCLC, que comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un compuesto representado por la siguiente fórmula química 1 y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula química 1]



en donde R₁ es quinolinilo, indolilo, quinolinilo sustituido o indolilo sustituido,

en donde el quinolinilo sustituido y el indolilo sustituido tienen al menos un sustituyente seleccionado de alquilo



en donde Ra y Rb pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo C₁~C₆, piridinilo, o piridinilo sustituido con amino, y pueden estar condensados juntos para formar un anillo;

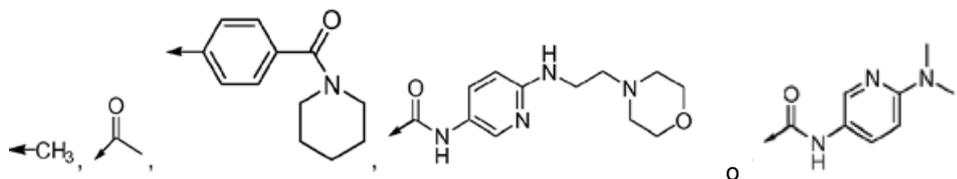
R₃ es metilo o propenilo;

uno o ambos de A y B es hidrógeno;

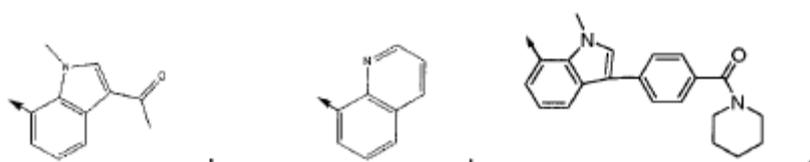
20 X es -O-PO₃H₂ o -OH; e

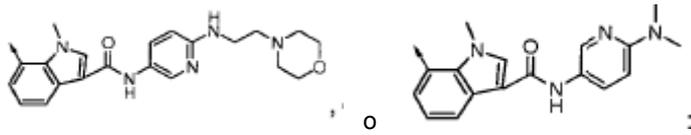
Y es hidrógeno.

En una realización adicional de la presente invención, el quinolinilo sustituido o el indolilo sustituido pueden tener al menos un sustituyente seleccionado de



En una realización adicional de la presente invención, R₁ es





R₃ es o metilo;

uno o ambos de A y B es hidrógeno;

X es -O-PO₃H₂ o -OH; e

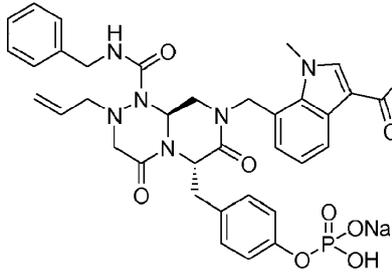
5 Y es hidrógeno.

En una realización adicional más de la presente invención, el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 2 a 7, y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

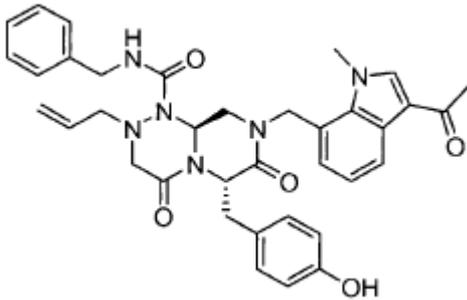
Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
2		7	
3		4	
5		6	

10 En una realización adicional más de la presente invención, el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 1-1 y 1-1P y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

[Fórmula química 1-1]



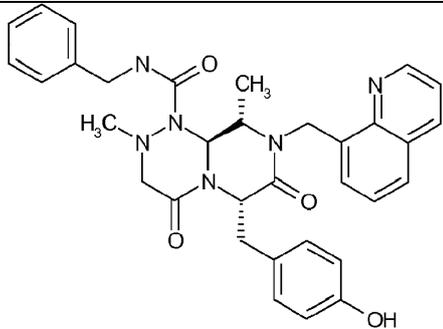
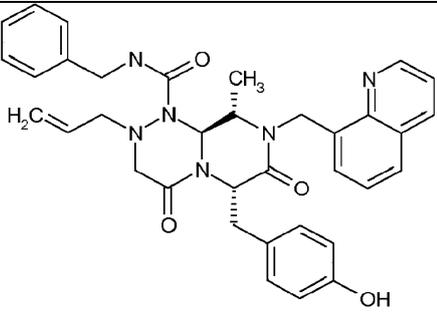
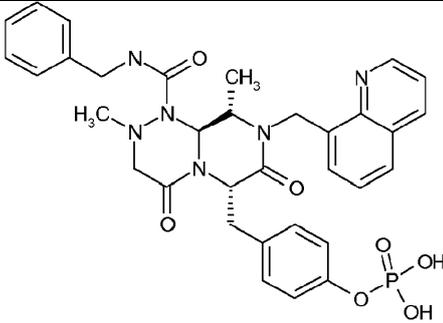
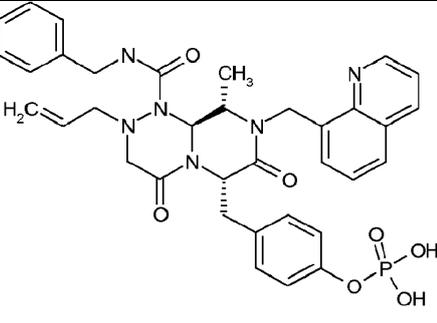
[Fórmula química 1-1P]



5 En otra realización más de la presente invención, el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 1-2 a 1-7 y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
1-2		1-3	
1-4		1-5	
1-6		1-7	

En aún otra realización adicional de la presente invención, el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 2-1 a 2-4 y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
2-1		2-3	
2-2		2-4	

5 Según una realización de la presente invención, el NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) puede presentarse en un paciente que tiene EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial) WT (natural) o que tiene una mutación activa en el EGFR.

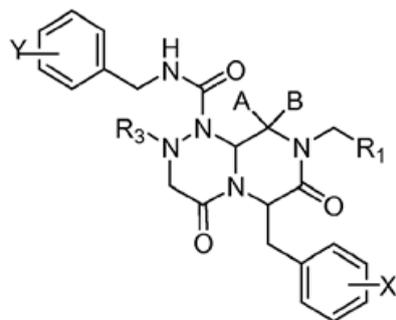
Según otra realización de la presente invención, el NSCLC puede ser resistente al EGFR TKI y el cáncer puede ser cáncer de pulmón.

10 Según una realización adicional de la presente invención, el cáncer resistente al EGFR TKI puede presentarse en un paciente que tiene EGFR mutante.

Según otra realización adicional más de la presente invención, el EGFR mutante puede tener mutaciones dobles de L858R y T790M.

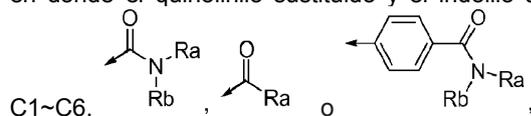
15 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar el NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la siguiente fórmula química 1, un isómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que lo necesite:

[Fórmula química 1]



en donde R₁ es quinolinilo, indolilo, quinolinilo sustituido o indolilo sustituido,

en donde el quinolinilo sustituido y el indolilo sustituido tienen al menos un sustituyente seleccionado de alquilo



en donde Ra y Rb pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo C1~C6, piridinilo, o piridinilo sustituido con amino, y pueden estar condensados juntos para formar un anillo;

5 R₃ es metilo o propenilo;

uno o ambos de A y B es hidrógeno;

X es -O-PO₃H₂ o -OH; e

Y es hidrógeno.

10 La composición de la presente invención es eficaz en el tratamiento del NSCLC, y particularmente en el tratamiento y prevención del NSCLC resistente al EGFR TKI.

Breve descripción de los dibujos

Los objetivos anteriores y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que:

15 La FIG.1 es un diagrama esquemático de la estructura del gen EGFR y locus de mutación;

La FIG.2 muestra una estructura tridimensional de un EFGR en el que se ha producido una mutación secundaria, y un gráfico que representa la tasa de mutaciones secundarias en un gen EGFR;

20 La FIG.3 es un gráfico en el que se representan los volúmenes medios de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1) a una dosis baja (100 mg/kg), frente a los días después de la inoculación celular (eje horizontal);

La FIG.4 es un gráfico en el que se representan los pesos corporales (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1) a una dosis baja (100 mg/kg), frente a los días después de la inoculación celular (eje horizontal), comparado con el peso corporal el D8 (día 8);

25 La FIG.5 es un gráfico en el que se representan los volúmenes medios de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1) a una dosis alta (150 mg/kg), frente a los días después de la inoculación celular (eje horizontal);

La FIG.6 es un gráfico en el que se representan los pesos corporales (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1) a una dosis alta (150 mg/kg), frente a los días después de la inoculación celular (eje horizontal), comparado con el peso corporal el D8.

30 La FIG.7 es un gráfico en el que se representan los tamaños de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1), frente a los días después del tratamiento (eje horizontal);

35 La FIG.8 es un gráfico en el que se representan los pesos corporales (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1), frente a los días después del tratamiento (eje horizontal).

La FIG.9 es un gráfico en el que se representan los tamaños de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1), frente a los días después de la inoculación (eje horizontal);

40 La FIG.10 es un gráfico en el que se representan los tamaños de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-1), frente a los días después de la inoculación (eje horizontal);

La FIG.11 es un gráfico en el que se representan los tamaños de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (sal bisódica del compuesto de la fórmula química 2-2), frente a los días después de la inoculación (eje horizontal);

La FIG.12 es un gráfico en el que se representan los pesos corporales (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (sal bisódica del compuesto de la fórmula química 2-2) frente a los días después del tratamiento (eje horizontal);

5 La FIG.13 es un gráfico en el que se representan los tamaños de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se han administrado los derivados de pirazino-triazina (compuestos de las fórmulas químicas 1-3 y 1-5) frente a los días después de la inoculación (eje horizontal);

La FIG.14 es un gráfico en el que se representan los pesos corporales (eje vertical) de los grupos a los que se han administrado los derivados de pirazino-triazina (compuestos de las fórmulas químicas 1-3 y 1-5), frente a los días después del tratamiento (eje horizontal); y

10 La FIG.15 es un gráfico en el que se representan los tamaños de los tumores (eje vertical) de los grupos a los que se ha administrado el derivado de pirazino-triazina (compuesto de la fórmula química 1-7), frente a los días después de la inoculación (eje horizontal).

Descripción de las realizaciones preferidas

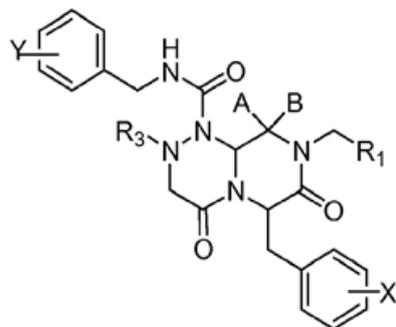
15 La presente invención se refiere a una composición para la prevención o el tratamiento del NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), que comprende un derivado de pirazino-triazina como ingrediente activo.

Los presentes inventores encontraron y demostraron que el derivado de pirazino-triazina de la presente invención es eficaz en el tratamiento y profilaxis del cáncer que presenta quimiorresistencia, lo que culminó en la presente invención.

20 Como se utiliza en este documento, el término "derivado de pirazino-triazina" se refiere a un compuesto representado por la siguiente fórmula química 1.

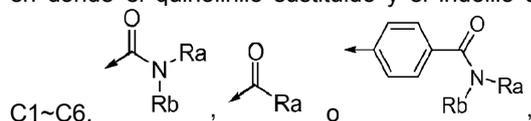
En detalle, el derivado de pirazino-triazina de la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en un compuesto representado por la siguiente fórmula química 1 y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pero sin limitarse a ellos:

[Fórmula química 1]



25 en donde R₁ es quinolinilo, indolilo, quinolinilo sustituido o indolilo sustituido,

en donde el quinolinilo sustituido y el indolilo sustituido tienen al menos un sustituyente seleccionado de alquilo



30 en donde Ra y Rb pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo C1~C6, piridinilo, o piridinilo sustituido con amino, y pueden estar condensados juntos para formar un anillo;

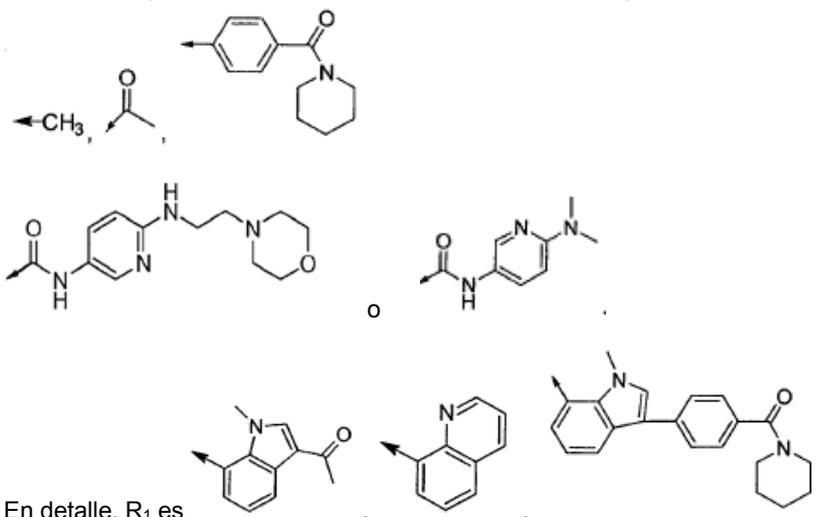
R₃ es metilo o propenilo;

uno o ambos de A y B es hidrógeno;

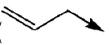
X es -O-PO₃H₂ o -OH; e

Y es hidrógeno.

Además, el quinolinilo sustituido o el indolilo sustituido pueden tener al menos un sustituyente seleccionado de,



5

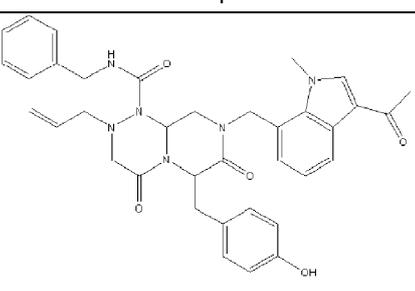
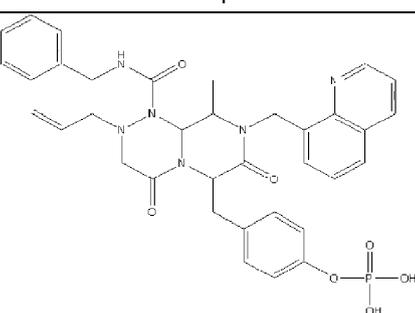
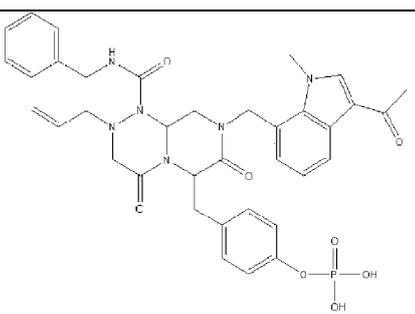
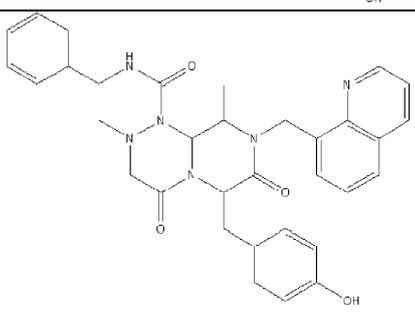
En la fórmula química 1, R₃ es metilo o propenilo ().

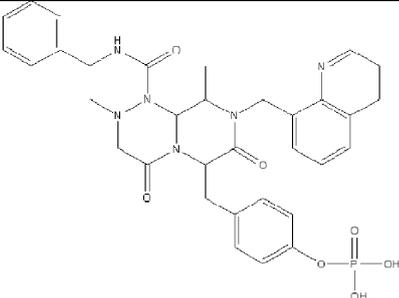
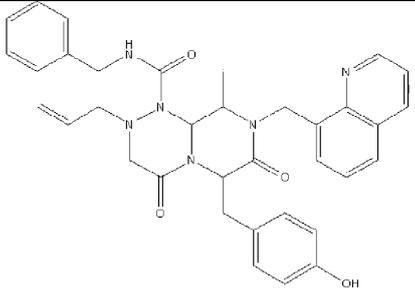
En la fórmula química 1, uno o ambos de A y B es hidrógeno.

En la fórmula química 1, X es -O-PO₃H₂ o -OH.

En la fórmula química 1, Y es hidrógeno.

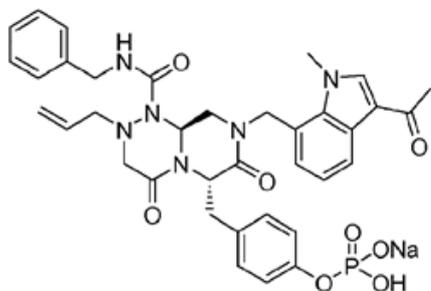
- 10 En mayor detalle, el derivado de pirazino-triazina de la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en el compuesto representado por una de las siguientes fórmulas químicas 2 a 7 y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
2		7	
3		4	

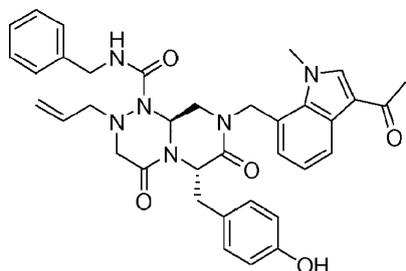
Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
5		6	

El derivado de pirazino-triazina de la presente invención puede ser el compuesto representado por la siguiente fórmula química 1-1 o 1-1P:

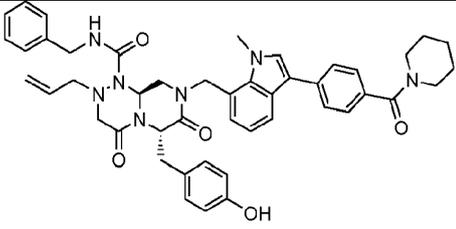
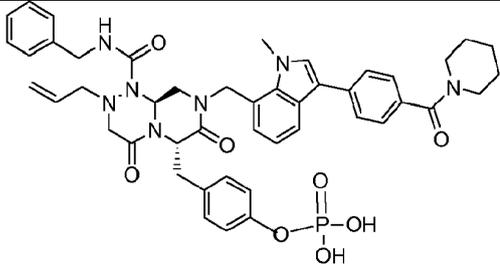
[Fórmula química 1-1]

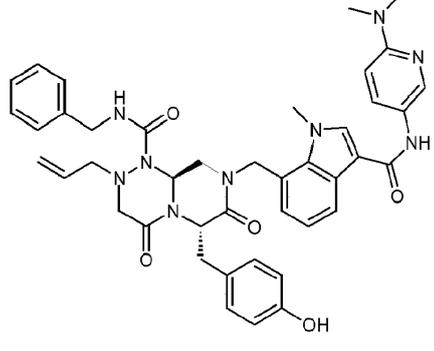
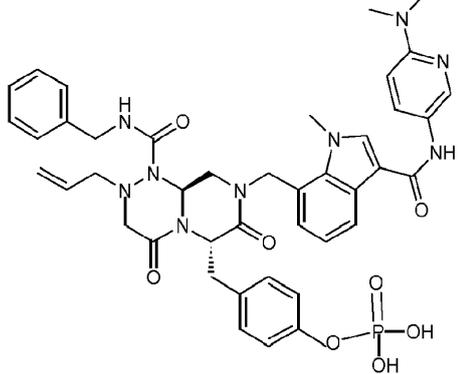
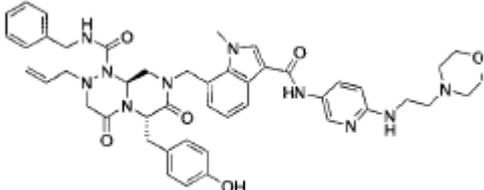
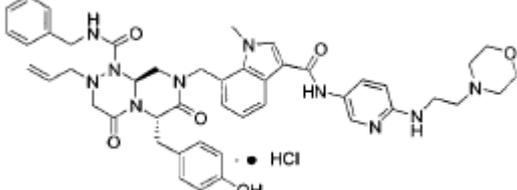


5 [Fórmula química 1-1P]

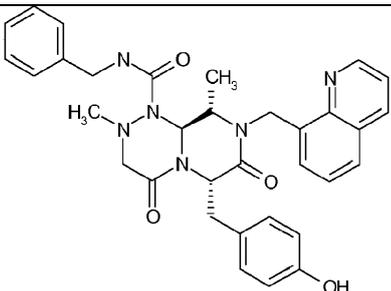
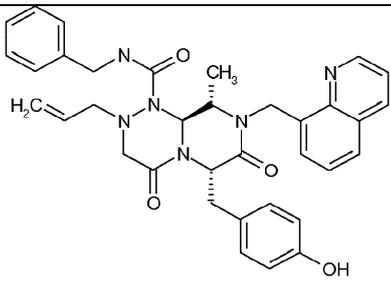
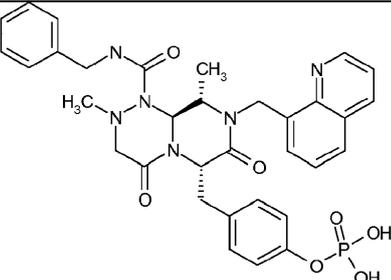
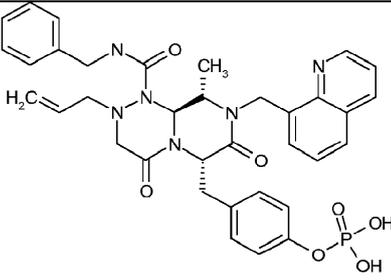


También, el derivado de pirazino-triazina de la presente invención puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 1-2 a 1-7, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

Nº.	Fórmula química	Nº.	Fórmula química
1-2		1-3	

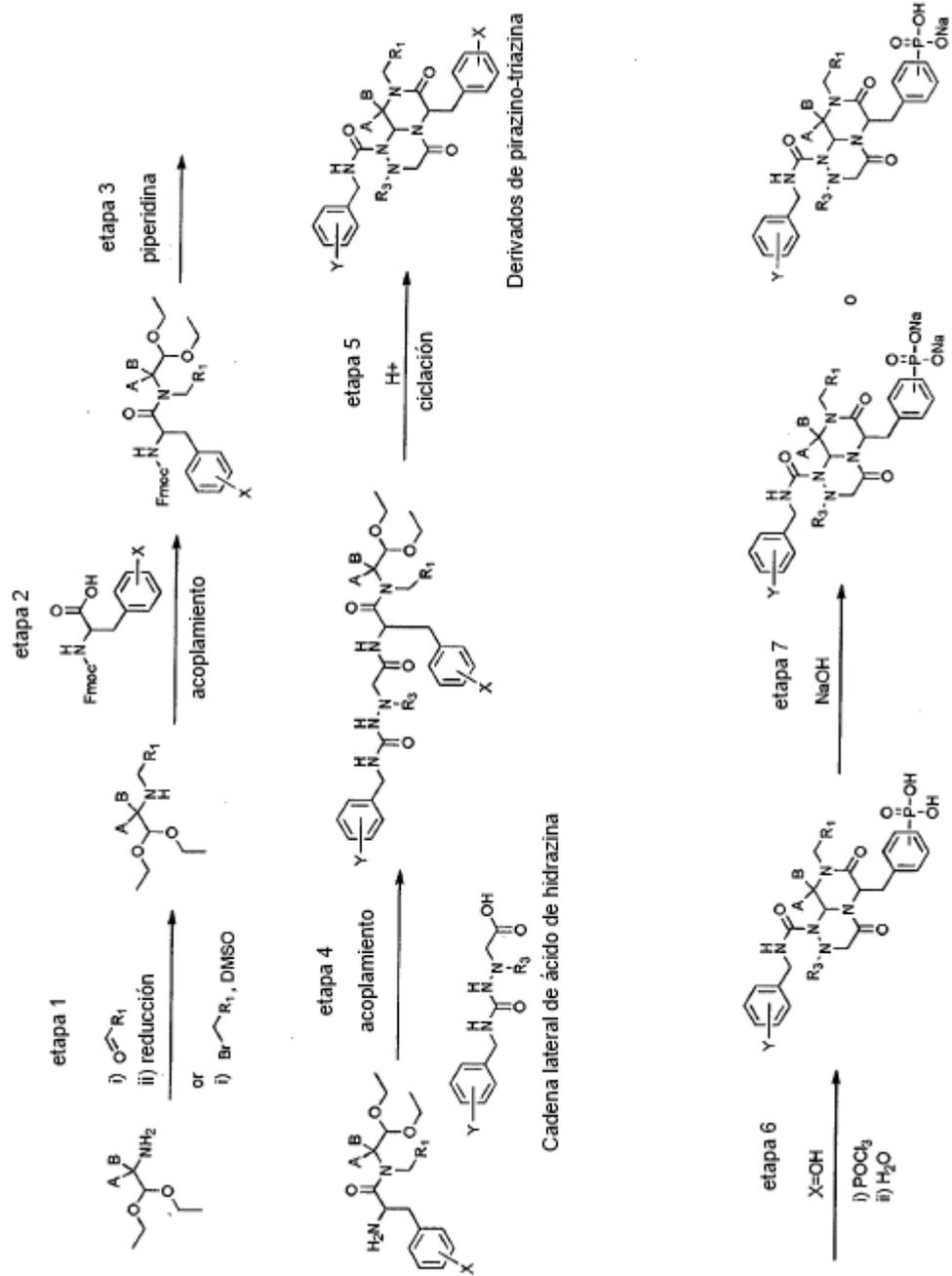
Nº.	Fórmula química	Nº.	Fórmula química
1-4		1-5	
1-6		1-7	

También, el derivado de pirazino-triazina de la presente invención puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 2-1 a 2-4, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
2-1		2-3	
2-2		2-4	

5 El derivado de pirazino-triazina de la presente invención se puede preparar según el siguiente Esquema de reacción 1.

[Esquema de reacción 1]



en donde A, B, R₁, R₃, X, e Y son cada uno como se han definido anteriormente.

Como se ve en el Esquema de reacción 1, el derivado de pirazino-triazina de la presente invención se puede preparar en las siguientes etapas secuenciales:

Etapas 1: se hace reaccionar el aminoacetal sustituido con aldehído o halógeno-alquilo;

5 Etapas 2: el aminoacetal sustituido resultante de la etapa 1, se acopla con un aminoácido para formar un péptido;

Etapas 3: el péptido de la etapa 2, es desprotegido con una sal;

Etapas 4: el péptido desprotegido de la etapa 3, se acopla con una cadena lateral de ácido de hidrazina;

Etapas 5: el péptido resultante de la etapa 4, se cicla en condiciones ácidas para formar un derivado de pirazino-triazina;

10 Etapas 6: se introduce un grupo fosfato en el derivado de pirazino-triazina de la etapa 5 cuando X es hidroxilo;

Etapas 7: el grupo fosforilato introducido en la etapa 6, se convierte en una sal mono- o disódica.

Como se utiliza en este documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que se usa normalmente en el campo farmacéutico. Ejemplos de sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales de sodio, sales hidrocioruro, sales de magnesio, sales de calcio y sales de potasio, pero no se limitan a ellas. Se prefiere una sal de sodio o una sal hidrocioruro.

15 La composición de la presente invención puede ser útil para tratar o prevenir el NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas).

El NSCLC puede presentarse en un paciente que tiene el EGFR natural (WT) o que tiene una mutación activa en el EGFR.

20 También, el NSCLC puede ser un cáncer que se presenta en un paciente que tiene una mutación activa en el EGFR. La mutación activa se puede seleccionar entre delección de L858R, delección de E746, delección de A750 y una combinación de las mismas. El cáncer que se presenta en un paciente que tiene una mutación activa en EGFR puede ser un cáncer sensible a EGFR TKI. En la presente invención, el término "EGFR TKI" es una abreviatura de inhibidor de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, que inhibe la actividad del EGF (factor de crecimiento epidérmico), pero engloba todos los agentes que tienen tal actividad. En la presente invención, el término "cáncer sensible a EGFR TKI" significa el cáncer en el que un EGFR TKI muestra particularmente altos efectos terapéuticos.

30 Además, el NSCLC puede ser un cáncer resistente al EGFR TKI. Tal como se utiliza en este documento, el término "cáncer resistente a EGFR TKI" pretende incluir el cáncer que muestra quimiorresistencia a EGFR TKI. Puede ser un cáncer causado por una mutación en el EGFR. La mutación puede tener además una mutación seleccionada de T790M, L747S, D761Y, T854A y una combinación de las mismas, en adición a la mutación activa anterior. Se prefiere una mutación doble de L858R y T790M.

El cáncer resistente a EGFR TKI abarca también el cáncer que ha sufrido una recidiva después de la administración de EGFR TKI, y el cáncer que se presenta en individuos que tienen un EGFR mutante resistente a EGFR TKI.

35 Además, el NSCLC tratado por la presente invención puede tener KRAS natural o KRAS mutante.

Por consiguiente, la composición de la presente invención produce excelentes efectos terapéuticos en pacientes con NSCLC tanto si tienen EGFR natural como si tienen una mutación activa en EGFR o presentan resistencia a EGFR TKI.

40 La composición de la presente invención puede comprender además aditivos farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes para ajustar el pH, antioxidantes y solubilizantes, dentro del intervalo en el que los efectos de la presente invención no se vean afectados.

45 Además, la composición de la presente invención se puede formular en una forma de liberación retardada, junto con un polímero entérico, un polímero insoluble en agua, un compuesto hidrófobo y un polímero hidrófilo. El polímero entérico se refiere a un polímero que es insoluble o estable en condiciones ácidas de pH inferior a 5, y que se disuelve o se degrada en condiciones específicas de pH, de pH 5 o superior.

Además, la formulación de la presente invención puede contener opcionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables tales como diversos aditivos seleccionados de un colorante y una fragancia.

La variedad de aditivos que se pueden utilizar en la presente invención no se limita a los aditivos mencionados antes, y el aditivo se puede utilizar en una dosis convencional que puede ser seleccionada adecuadamente por los expertos en la técnica.

5 Utilizando un método convencional, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en formas farmacéuticas orales tales como polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes y aerosoles, aplicaciones externas, supositorios o inyecciones estériles.

Según otro aspecto más de la misma, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar el NSCLC, que comprende administrar a un sujeto, incluyendo un mamífero, la composición que comprende el compuesto de la presente invención.

10 El término "administración", como se utiliza en este documento, se refiere a la introducción de la composición para la prevención y tratamiento del NSCLC de la presente invención, en un sujeto de una manera apropiada. Con tal de que la composición de la presente invención llegue a un tejido diana, se puede elegir cualquier vía de administración. Ejemplos de la vía a través de la cual se puede administrar la composición para la prevención y el tratamiento de NSCLC según la presente invención, incluyen las vías oral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intranasal, intrapulmonar, intrarrectal, intravesicular, e intradural, pero no se limitan a ellas.

La composición para la prevención o tratamiento del NSCLC según la presente invención, se puede administrar una vez al día o dos veces al día a intervalos regulares.

20 Los niveles de dosificación de los compuestos de la presente invención varían dependiendo de diversos factores, incluyendo el peso del paciente, edad, sexo, estado de salud y la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la gravedad de la enfermedad, etc. El ingrediente activo se puede administrar a una dosis de 0,1 a 300 mg/kg/día y, preferiblemente, a una dosis de 0,5 a 200 mg/kg/día, pero la cantidad puede variar dependiendo de la edad y el sexo del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de NSCLC, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención a un paciente que lo necesite.

En una realización preferida de la presente invención, el método de tratamiento de la presente invención puede comprender administrar la composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención, en combinación con uno o más fármacos anticáncer.

30 Uno de los agentes anticáncer conocidos puede ser el paclitaxel. La cantidad farmacéuticamente eficaz del agente anticáncer conocido también es conocida en la técnica y el régimen de dosificación final será determinado por el médico prescriptor, a la vista de varios factores, incluyendo la coadministración junto con la composición de la presente invención. Cuando se co-administra junto con un agente anticáncer convencional, la composición de la presente invención puede conferir un efecto terapéuticamente sinérgico además de reducir los efectos secundarios del agente anticáncer. El agente anticáncer convencional se puede administrar como una formulación de combinación o simultáneamente con la composición de la presente invención, o por separado a intervalos de tiempo diferentes de la administración de la composición de la presente invención.

Una mejor comprensión de la presente invención se puede obtener a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero que no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

40 Para la preparación de los compuestos utilizados en la presente invención, se puede hacer referencia al Esquema de reacción 1, o a los documentos WO12/050393, WO10/120112, WO09/051397 o WO09/148192.

Ejemplo experimental 1: Efecto terapéutico del compuesto de la fórmula química 1-1 sobre el NSCLC de células resistentes a EGFR TKI (NCI-H1975)

1) Objetivo

45 Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los derivados de pirazino-triazina (fórmula química 1-1) de la presente invención, en animales trasplantados con células NCI-H1975, una especie de células de NSCLC resistentes a los agentes dirigidos al EGFR.

2) Métodos

50 La NCI-H1975 (ATCC, CRL-5908), derivada de pacientes con NSCLC, es una línea de células de NSCLC que tiene una doble mutación de EGFR, T790M y L858R, que es altamente resistente a EGFR TKI (Tarceva®, Iressa®). Estas células se utilizaron para evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los compuestos de la presente invención. En este

contexto, las células NCI-H1975 se cultivaron a gran escala, y se trasplantaron por vía subcutánea a una densidad de 5×10^6 células en 0,2 ml de HBSS por cabeza en la región axilar derecha de ratones (ratones lampiños Balb/c). Tres a cinco días después del trasplante, se observaron masas tumorales. Desde el Día 8 (D8) hasta el Día 22 (D22) después del trasplante, se administraron a seis grupos de los ratones trasplantados con NCI-H1975, un compuesto de la fórmula química 1-1 y/o paclitaxel tal como se resume en la Tabla 1, que sigue.

Tabla 1

Grupo	Sustancia administrada y cantidad de la misma
1	Vehículo_Solución salina
2	1-1_ 100 mg/kg
3	1-1_ 150 mg/kg
4	1-1_100 mg/kg + Paclitaxel_7,5 mg/kg
5	1-1_150 mg/kg + Paclitaxel_7,5 mg/kg
6	Paclitaxel_7,5 mg/kg

Como control, se inyectó intravenosamente solamente vehículo una vez al día para alcanzar un total de diez inyecciones durante un período de dos semanas (cinco veces por semana, D8~12, 15~19) (Grupo 1).

El compuesto de la fórmula química 1-1 se disolvió en solución salina y se inyectó intravenosamente a una dosis de 100 y 150 mg/kg una vez al día para alcanzar un total de diez inyecciones durante un período de dos semanas (cinco veces por semana, D8~12, 15~19) (grupos 2 y 3, respectivamente).

El paclitaxel se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 7,5 mg/kg una vez al día para alcanzar un total de dos inyecciones durante dos semanas (una vez a la semana, D8 y D5) (Grupo 6).

El compuesto de la fórmula química 1-1 se inyectó a una dosis de 100 mg/kg y 150 mg/kg a los ratones a los que se había administrado paclitaxel a una dosis de 7,5 mg/kg de la misma manera que se ha descrito anteriormente (grupos 4 y 5).

3) Resultados

i. Cambios en el peso corporal y en el tamaño del tumor y evaluación de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI)

Los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los ratones se midieron dos o tres veces por semana durante el experimento.

Las medidas de los pesos corporales y los tamaños de los tumores fueron asignadas aleatoriamente para $n = 7$ por grupo utilizando el software interno de asignación aleatoria. El tamaño del tumor se calculó a partir de las medidas del eje más largo (longitud, mm) y el eje más corto (anchura, mm) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño del tumor (mm}^3\text{)}: \text{Anchura (mm)} \times \text{Anchura (mm)} \times \text{Altura (mm)} / 2$$

El D8 (día 8), los ratones tenían un tamaño medio del tumor de 63 mm^3 (intervalo = $42 \sim 103 \text{ mm}^3$), con un peso corporal medio de 18,6 g.

El D22 (día 22), como se puede ver en la Tabla 3, el control al que se había administrado vehículo tenía un tamaño final del tumor de $995 \pm 131 \text{ mm}^3$, mientras que el tumor en el grupo al que se administró la fórmula química 1-1 (P1) se redujo significativamente.

Por lo tanto, los datos indican que el compuesto de la presente invención muestra una excelente actividad anticáncer en las líneas de células de NSCLC resistentes a EGFR TKI que tienen una doble mutación de L858R y T790M.

Se evaluó la actividad anticáncer dependiente de la administración, por la inhibición del crecimiento tumoral, (TGI, %) calculada según las siguientes fórmulas.

Cuando el tamaño del tumor del grupo al que se administró el fármaco es mayor que el tamaño inicial del tumor:

$$\% \text{ TGI} = 100 * (1 - (\text{volumen del tumor}_{\text{Día X}} - \text{volumen del tumor}_{\text{inicial para el grupo tratado}}) / (\text{volumen del tumor}_{\text{Día X}} - \text{volumen del tumor}_{\text{inicial para el grupo del vehículo}}))$$

Cuando el tamaño del tumor del grupo al que se administró el fármaco es más pequeño que el tamaño inicial del tumor:

$$\% \text{ TGI} = 100 + 100 * 1 - (\text{volumen del tumor del grupo tratado}_{\text{Día X}} / \text{volumen del tumor del grupo tratado}_{\text{inicial}})$$

La administración de la fórmula química 1-1 produjo una TGI del 74 % a una dosis de 100 mg/kg y una TGI del 109 % a una dosis de 150 mg/kg, demostrando una actividad anticáncer de una manera dependiente de la dosis.

Estos resultados son, con diferencia, mucho mayores que los obtenidos por el paclitaxel, cuya medida fue de una TGI del 28 % a una dosis de 7,5 mg/kg.

- 5 Además, en los grupos a los que se administró una combinación de la fórmula química 1-1 (100, 150 mg/kg) y paclitaxel (7,5 mg/kg), se midió que la TGI era del 94 % y del 175 %, respectivamente, lo que demuestra un efecto sinérgico logrado por su administración combinada.

Los resultados se resumen en la Tabla 2 y se representan en las figuras 3 a 6.

ii. Mortalidad y pérdida máxima de peso corporal (MBL)

- 10 En este documento, la mortalidad indica las muertes que resultan de la administración del fármaco. Durante y después de este experimento, no se observó ningún caso de muerte en ningún grupo.

En este documento, la pérdida máxima de peso corporal (MBL) significa la mayor pérdida de peso corporal causada por la administración del fármaco y es un factor importante para determinar la dosis máxima tolerable (MTD). El cambio de peso corporal se expresó como porcentaje del peso corporal justo antes de la administración del fármaco (D1). Como regla general, la dosis a la que se perdió el 10 % o más del peso corporal se determinó como la dosis máxima tolerable.

- 15

Las medidas se resumen en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Grupo	Mortalidad	Tamaño del tumor @ D 22) (Media ± S.E.mm ³)	TGI (%)	MBL (%)
			D22	
1	0/7	995 ± 131	-	-
2	0/7	307 ± 97	74	-
3	0/7	57 ± 22	109	-
4	0/7	120 ± 32	94	-
5	0/7	16 ± 5	175	3 (D16)
6	0/7	736 ± 79	28	-

- 20 **Ejemplo experimental 2:** Efecto terapéutico del compuesto de la fórmula química 1-1 sobre el NSCLC de células resistentes a EGFR TKI (NCI-H460)

1) Objetivo

Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los derivados de pirazino-triazina (fórmula química 1-1) de la presente invención en modelos animales trasplantados con células NCI-H460, un tipo de células de NSCLC resistentes a los agentes dirigidos al EGFR.

25 2) Métodos

- 30 La NCI-H460 (ATCC, HTB-177), derivada de pacientes con NSCLC, es una línea de células de NSCLC con EGFR natural y KRAS mutante, que es altamente resistente a EGFR TKI (Tarceva®, Iressa®). Estas células se utilizaron para evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los compuestos de la presente invención. A este respecto, las células NCI-H460 se cultivaron a gran escala, y se trasplantaron por vía subcutánea a una densidad de 5×10^6 células en 0,2 ml de HBSS por cabeza en la región axilar derecha de ratones (ratones lampiños Balb/c). Tres a cinco días después del trasplante, se observaron masas tumorales. Desde el Día 6 (D1) hasta el Día 18 (D12) después del trasplante, se administraron a tres grupos de los ratones trasplantados con NCI-H460 el compuesto de la fórmula química 1-1 o paclitaxel tal como se resume en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3.

Grupo	Sustancia administrada y cantidad de la misma
1	Vehículo_ Solución salina
2	1-1_ 150 mg/kg
3	paclitaxel_20 mg/kg

Como control, se inyectó intravenosamente solamente solución salina una vez al día para alcanzar un total de seis inyecciones durante un período de dos semanas (tres veces por semana, D1, 3, 5, 8, 10, 12) (Grupo 1).

5 El compuesto de la fórmula química 1-1 se disolvió en solución salina y se inyectó intravenosamente a una dosis de 150 mg/kg una vez al día para alcanzar un total de seis inyecciones durante un período de dos semanas (tres veces a la semana, D1, 3, 5, 8, 10, 12) (Grupo 2).

El paclitaxel se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 20 mg/kg una vez al día para alcanzar un total de dos inyecciones durante un período de dos semanas (tres veces a la semana, D1, 3, 5, 8, 10, 12) (Grupo 3).

3) Resultados

i. Cambios en el peso corporal y en el tamaño del tumor y evaluación de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI)

10 Los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los ratones se midieron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1 y se calculó también la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, %). El volumen medio de los tumores antes del experimento (volumen medio de partida del tumor) fue de 136 mm³.

Las medidas se resumen en la Tabla 4 y se representan en las figuras 7 y 8.

ii. Mortalidad y pérdida máxima de peso corporal (MBL)

15 La mortalidad y la MBL se evaluaron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1, y los resultados se resumen en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4

Grupo	Mortalidad	Tamaño del tumor @ D 12 (media ± S.E. mm ³)	TGI %	MBL (%)
			D12	
1	0/6	1554 ± 285	-	4 (@ D11)
2	0/6	1196 ± 247	25	4 (@ D2)
3	0/6	1339 ± 260	15	13 (@ D12)

Ejemplo experimental 3: Efecto terapéutico del compuesto de la fórmula química 1-1 sobre el NSCLC de células sensibles al EGFR TKI (HCC827)

20 1) Objetivo

Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los derivados de pirazino-triazina (fórmula química 1-1) de la presente invención en modelos animales trasplantados con células HCC827, un tipo de células de NSCLC hiper-sensibles a los agentes dirigidos al EGFR.

2) Métodos

25 La HCC827 (ATCC, CRL-2868), derivada de pacientes con NSCLC, es una línea de células de NSCLC que tiene una mutación por delección en el exón 19 (E746-A750), que es sensible a EGFR TKI (Tarceva®, Iressa®). Estas células se utilizaron para evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los compuestos de la presente invención. A este respecto, las células HCC827 se cultivaron a gran escala, y se trasplantaron por vía subcutánea a una densidad de 5x10⁶ células en 0,2 ml de HBSS por cabeza en la región axilar derecha de ratones (ratones lampiños Balb/c).
30 a cinco días después del trasplante, se observaron masas tumorales. Desde el Día 8 hasta el Día 32 después del trasplante, se administraron a seis grupos de los ratones trasplantados con HCC827 el compuesto de la fórmula química 1-1 y/o paclitaxel tal como se resume en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5

Grupo	Sustancia administrada y cantidad de la misma
1	Vehículo_Solución salina
2	1-1_ 100 mg/kg
3	1-1_ 150 mg/kg
4	1-1_100 mg/kg + paclitaxel_10 mg/kg
5	1-1_150 mg/kg + paclitaxel_10 mg/kg
6	paclitaxel_10 mg/kg

Como control, se inyectó intravenosamente solamente solución salina una vez al día para alcanzar un total de 20 inyecciones durante un período de cuatro semanas (tres veces por semana, D8-12, D15-19, D22-26 y D29-32) (Grupo 1).

5 El compuesto de la fórmula química 1-1 se disolvió en solución salina y se inyectó intravenosamente a una dosis de 100 y 150 mg/kg una vez al día para alcanzar un total de 20 inyecciones durante un período de cuatro semanas (cinco veces por semana, D8-12, D15-19, D22-26 y D29-32) (Grupos 2 y 3, respectivamente).

El paclitaxel se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 10 mg/kg una vez al día para alcanzar un total de cuatro inyecciones durante cuatro semanas (una vez a la semana, D8, D15, D22, y D29) (Grupo 6).

10 El compuesto de la fórmula química 1-1 se inyectó a una dosis de 100 mg/kg y 150 mg/kg a los ratones a los que se había administrado paclitaxel a una dosis de 10 mg/kg de la misma manera que se ha descrito anteriormente (grupos 4 y 5).

3) Resultados

i. Cambios en el peso corporal y en el tamaño del tumor y evaluación de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI)

15 Los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los ratones se midieron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1 y se calculó también la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, %). El volumen medio de los tumores antes del experimento (volumen medio de partida del tumor) fue de 121 mm³.

Las medidas se resumen en la Tabla 6 y se representan en las figuras 9 y 10.

ii. Mortalidad y pérdida máxima de peso corporal (MBL)

20 La mortalidad y la MBL se evaluaron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1, y los resultados se resumen en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6

Grupo	Mortalidad	Tamaño del tumor @ D 33 (media ± S.E. mm ³)	TGI %	MBL (%)
			D33	
1	0/7	641 ± 56		1 (D11)
2	0/7	380 ± 29	50	1 (D11)
3	0/7	262 ± 30	68	1 (D11)
4	0/7	299 ± 63	65	1 (D11)
5	0/7	283 ± 23	73	5 (D11)
6	0/6	557 ± 83	18	2 (D11)

Los efectos terapéuticos del compuesto 1-1 sobre diversas líneas de células de NSCLC, evaluados en los ejemplos experimentales 1 a 3, se resumen en términos de inhibición del crecimiento del tumor (TGI) en la Tabla 7, a continuación.

25

Tabla 7

Línea de células de NSCLC	Comp. 1-1		1' Agente Paclitaxel	Combinación
	TGI %		TGI %	TGI %
NCI-H1975 (resistente a EGFR TKI)	100 %	>	30 %	171 % (sinergismo)
HCC827 (sensible a EGFR TKI)	78 %	>	18 %	68 %
NCI-H460 (resistente a EGFR TKI)	25 % (3 veces por semana)	>	15 %	No ensayada

El compuesto de la fórmula química 1-1 presenta una actividad anticáncer más alta en modelos animales trasplantados con líneas celulares de NSCLC, en comparación con el agente estándar paclitaxel, con un pico de actividad inhibitoria frente a la línea NCI-H1975 que tiene una mutación T790M de EGFR, que es causante de la

resistencia al EGFR TKI y un pico sinérgico con paclitaxel frente a NCI-H1975, demostrando que es él mismo un agente terapéutico potencial para los pacientes con NSCLC resistente a EGFR TKI.

Ejemplo experimental 4: Actividad anticáncer *in vitro* del compuesto 1-1P frente a varias líneas celulares de NSCLC

5 1) Objetivo

Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vitro* del derivado de pirazino-triazina (fórmula química 1-1P) de la presente invención en diversas líneas celulares de NSCLC.

2) Métodos

10 Se sembraron líneas de células de NSCLC a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se diluyeron seriadamente a $\frac{1}{2}$ el compuesto 1-1P y el fármaco de referencia, doxorubicina, en el intervalo de concentración de 0,001 μM a 1 μM y las células de cada pocillo se trataron con cada dilución por duplicado, seguido por incubación durante 72 horas en un incubador a 37 °C, 5 % de CO_2 . Se añadió CellTiter-Glo® (Ensayo luminiscente de viabilidad celular, # G7573, Promega) en una cantidad de 100 μL a cada pocillo y se agitó durante 2 min para lisar las células. Después de incubación durante 10 min a temperatura ambiente (25 °C), se analizó la luminiscencia de cada pocillo en un luminómetro (Envision (PerkinElmer).

3) Resultados

15 La actividad anticáncer dependiente de la administración del compuesto 1-1P se evaluó sobre siete líneas celulares de NSCLC diferentes, por la inhibición₅₀ del crecimiento celular (GI_{50}), una concentración necesaria para reducir el crecimiento de las células tratadas a la mitad del crecimiento de las células no tratadas, calculado según la siguiente fórmula. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

$$\text{GI}_{50} = (50 - (y_1 - ((y_1 - y_2) / (x_1 - x_2)) * x_1) / ((y_1 - y_2) / (x_1 - x_2)))$$

x_1, x_2 = concentraciones que provocan el 50 % de muerte o letalidad celular

y_1, y_2 = densidades de células a las concentraciones que provocan el 50 % de muerte o letalidad celular

Tabla 8

Tipo de cáncer	Línea celular	GI_{50} , nM, 72 horas
		Compuesto 1-1P
Pulmón	NCI-H23	67
	NCI-H1650	156
	NCI-H1975	111
	HCC827	115
	NCI-H460	272
	A549	372
	PC6	493

25 Las células NCI-H460, NCI-H23 y A549, que son líneas celulares de NSCLC que tienen EGFR natural y KRAS mutado, fueron detenidas al 50 % de crecimiento con concentraciones 272, 67 y 372 nM del compuesto, respectivamente.

30 La HCC827 es una línea celular de NSCLC que tiene una mutación por delección en el exón 19 de EGFR (E746-A750) y un gen KRAS mutante y es hipersensible a EGFR TKI. Se encontró que el compuesto 1-1P tenía una GI_{50} de 115 nM frente a HCC827.

La NCI-H1650 es una línea celular de NSCLC que tiene una mutación por delección en el exón 19 de EGFR (E746-A750) y una mutación de KRAS y es resistente a EGFR TKI. Se encontró que el compuesto 1-1P tenía una GI_{50} de 156 nM frente a NCI-H1650.

35 La NCI-H1975 es una línea celular de NSCLC que tiene una mutación T790M y es resistente a EGFR TKI. Su crecimiento fue detenido al 50 % a una concentración de 111 nM del compuesto 1-1P.

Ejemplo experimental 5: Efecto terapéutico de la sal bisódica del compuesto 2-2 sobre NSCLC de células resistentes a EGFR TKI (NCI-H1975)

1) Objetivo

Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vivo* del derivado de pirazino-triazina (sal bisódica de la fórmula química 2-2) de la presente invención en modelos animales trasplantados con células NCI-H1975, un tipo de células de NSCLC resistentes a los agentes dirigidos al EGFR.

5 2) Métodos

La NCI-H1975 (ATCC, CRL-5908), derivada de pacientes con NSCLC, es una línea celular de NSCLC que tiene una doble mutación de T790M y L858R del EGFR, que es hiper-resistente a EGFR TKI (Tarceva®, Iressa®). Estas células se utilizaron para evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los compuestos de la presente invención. En este contexto, las células NCI-H1975 se cultivaron a gran escala, y se trasplantaron por vía subcutánea a una densidad de 5×10^6 células en 0,2 ml de HBSS por cabeza en la región axilar derecha de ratones (ratones lampiños Balb/c). Tres a cinco días después del trasplante, se observaron masas tumorales. Desde el Día 11 (D11) hasta el Día 22 (D22) después del trasplante, se administró a tres grupos de los ratones trasplantados con NCI-H1975 una sal bisódica del compuesto de la fórmula química 2-2 o cisplatino, tal como se resume en la Tabla 9, a continuación.

Tabla 9

Grupo	Material administrado	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Administración
1	Vehículo	-	IV	Qdx5 (cada 5 días) durante 2 semanas
2	Sal 2Na del Compuesto 2-2	200	IV	Qdx5 (cada 5 días) durante 2 semanas
3	Cisplatino	25	IV	BIW (2 veces por semana) durante 2 semanas

15 3) Resultados

i. Cambios en el peso corporal y tamaño del tumor y evaluación de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI)

Se midieron los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los ratones de la misma manera que en el ejemplo experimental 1 y se calculó también la inhibición del crecimiento del tumor (TGI, %). El volumen medio de los tumores antes del experimento (volumen medio del tumor de partida) fue de 118 mm^3 .

20 ii. Mortalidad y pérdida máxima de peso corporal (MBL)

Se evaluaron la mortalidad y la MBL de la misma manera que en el ejemplo experimental 1, y los resultados se resumen en la Tabla 10 y se representan en las figuras 11 y 12.

Tabla 10

Grupo	Mortalidad	Tamaño del tumor @ D 22 (media \pm S.E. mm^3)	TGI %	MBL (%)
			D22	
1	0/7	947 \pm 92		sin pérdida
2	0/6	720 \pm 104	27	sin pérdida
3	0/6	750 \pm 53	23	1 (D20)

25 **Ejemplo experimental 6:** Efecto terapéutico de los compuestos 1-3 y 1-5 sobre NSCLC de células resistentes a EGFR TKI (NCI-H1975)

1) Objetivo

Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los derivados de pirazino-triazina (compuestos 1-3 y 1-5) de la presente invención en modelos animales trasplantados con células NCI-H1975, un tipo de células de NSCLC resistentes a los agentes dirigidos al EGFR.

30 2) Métodos

La NCI-H1975 (ATCC, CRL-5908), derivada de pacientes con NSCLC, es una línea de células de NSCLC que tiene una doble mutación de EGFR, T790M y L858R, que es hiper-resistente a EGFR TKI (Tarceva®, Iressa®). Estas células se utilizaron para evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los compuestos de la presente invención. En este contexto, las células NCI-H1975 se cultivaron a gran escala, y se trasplantaron por vía subcutánea a una densidad de 5×10^6 células en 0,2 ml de HBSS por cabeza en la región axilar derecha de ratones (ratones lampiños Balb/c).

Tres a cinco días después del trasplante, se observaron masas tumorales. Desde el Día 11 (D11) hasta el Día 22 (D22) después del trasplante, se administraron a cinco grupos de ratones trasplantados con NCI-H1975 los compuestos 1-3 y 1-5 tal como se resume en la Tabla 11, que sigue.

Tabla 11

Grupo	Material administrado	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Administración
1	Vehículo	-	IV	Qdx5 (cada 5 días) durante 2 semanas
2	Comp. 1-3	40	IV	
3	Comp. 1-5	30	IV	

5

3) Resultados

i. Cambios en el peso corporal y en el tamaño del tumor y evaluación de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI)

Los pesos corporales y tamaños de los tumores de los ratones se midieron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1 y se calculó también la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, %). El volumen medio de los tumores antes del experimento (volumen medio de partida del tumor) fue de 142 mm³.

10

ii. Mortalidad y pérdida máxima de peso corporal (MBL)

La mortalidad y la MBL se evaluaron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1, y los resultados se resumen en la Tabla 12 y se representan en las figuras 13 y 14.

Tabla 12

Grupo	Mortalidad	Tamaño del tumor @ D 22 (Media ± S.E. mm ³)	TGI %	MBL (%)
			D22	
1	0/6	1255 ± 133		sin pérdida
2	0/6	571 ± 38	62	4 (D19)
3	0/6	464 ± 45	71	5 (D12)

15 **Ejemplo experimental 7:** Efecto terapéutico del compuesto 1-7 sobre NSCLC de células resistentes a EGFR TKI (NCI-H1975)

1) Objetivo

Este experimento tiene como objetivo evaluar la actividad anticáncer *in vivo* del derivado de pirazino-triazina (compuesto 1-7) de la presente invención en modelos animales trasplantados con células NCI-H1975, un tipo de células de NSCLC resistentes a los agentes dirigidos al EGFR.

20

2) Métodos

La NCI-H1975 (ATCC, CRL-5908), derivada de pacientes con NSCLC, es una línea de células de NSCLC que tiene una doble mutación de EGFR, T790M y L858R, que es hiper-resistente a EGFR TKI (Tarceva®, Iressa®). Estas células se utilizaron para evaluar la actividad anticáncer *in vivo* de los compuestos de la presente invención. En este contexto, las células NCI-H1975 se cultivaron a gran escala, y se trasplantaron por vía subcutánea a una densidad de 5x10⁶ células en 0,2 ml de HBSS por cabeza en la región axilar derecha de ratones (ratones lampiños Balb/c). Tres a cinco días después del trasplante, se observaron masas tumorales. Desde el Día 11 (D11) hasta el Día 22 (D22) después del trasplante, se administró a dos grupos de ratones trasplantados con NCI-H1975 el compuesto 1-7 tal como se resume en la Tabla 13, que sigue.

25

Tabla 13

Grupo	Material administrado	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Administración
1	Vehículo	-	IV	BIW (2 veces por semana) durante 2 semanas
2	Comp. 1-7	60	IV	

30

3) Resultados

i. Cambios en el peso corporal y tamaño del tumor y evaluación de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI)

5 Los pesos corporales y tamaños de los tumores de los ratones se midieron de la misma manera que en el ejemplo experimental 1 y se calculó también la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, %). El volumen medio de los tumores antes del experimento (volumen medio de partida del tumor) fue de 86 mm³.

ii. Evaluación de la Mortalidad

La mortalidad se evaluó de la misma manera que en el ejemplo experimental 1, y los resultados se resumen en la Tabla 14 y se representan en la FIG.15.

Tabla 14

Grupo	Mortalidad	Tamaño del tumor @ D 22 (media ± S.E.mm ³)	TGI %
			D22
1	0/5	635 mm	
2	0/5	410 mm	41

10

Aplicabilidad Industrial

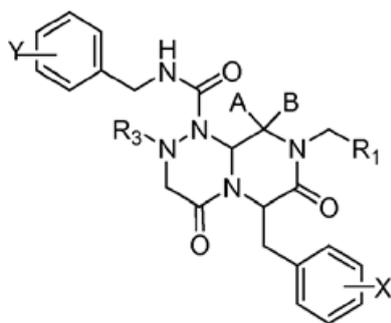
Como se ha descrito hasta ahora, los derivados de pirazino-triazina de la presente invención inhiben eficazmente el crecimiento de diversas líneas de células implicadas en el NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) *in vitro* e *in vivo*, y por lo tanto son adecuados para uso como agentes para tratamiento y profilaxis del NSCLC.

15

REIVINDICACIONES

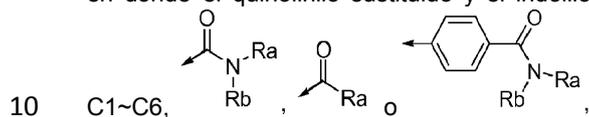
1. Una composición que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por la siguiente fórmula química 1 y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para uso en la prevención o el tratamiento del NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas):

[Fórmula química 1]



en donde R₁ es quinolinilo, indolilo, quinolinilo sustituido o indolilo sustituido,

en donde el quinolinilo sustituido y el indolilo sustituido tienen al menos un sustituyente seleccionado de alquilo



en donde Ra y Rb pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo C1~C6, piridinilo, o piridinilo sustituido con amino, y pueden estar condensados juntos para formar un anillo;

R₃ es metilo o propenilo;

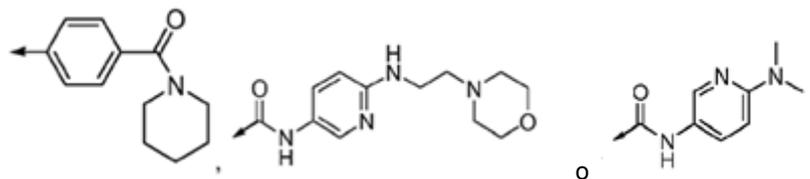
uno o ambos de A y B es hidrógeno;

15 X es -O-PO₃H₂ o -OH; e

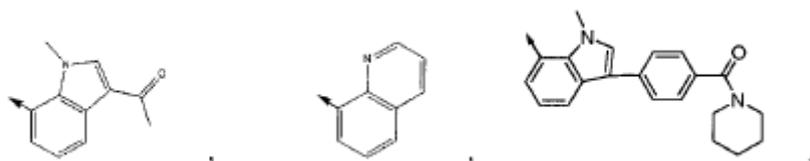
Y es hidrógeno.

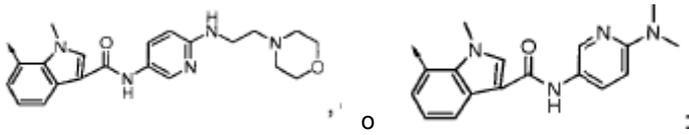
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el quinolinilo sustituido o el indolilo sustituido tiene al

menos un sustituyente seleccionado de



20 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde R₁ es





R₃ es o metilo;

uno o ambos de A y B es hidrógeno;

X es -O-PO₃H₂ o -OH; e

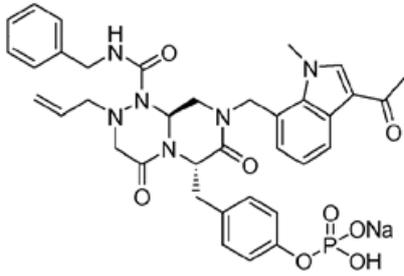
5 Y es hidrógeno.

4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por una de las siguientes fórmulas químicas 2 a 7 y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

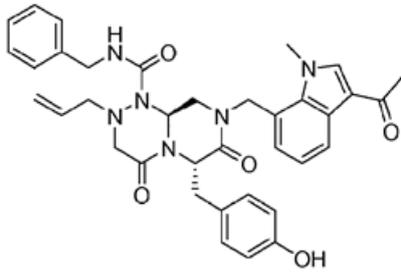
Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
2		7	
3		4	
5		6	

10 5. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas químicas 1-1 o 1-1P y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

[Fórmula química 1-1]



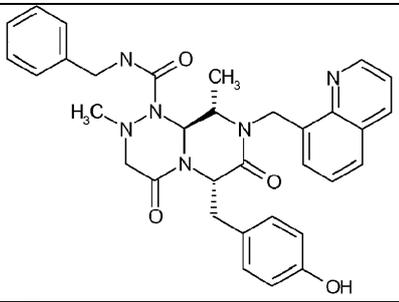
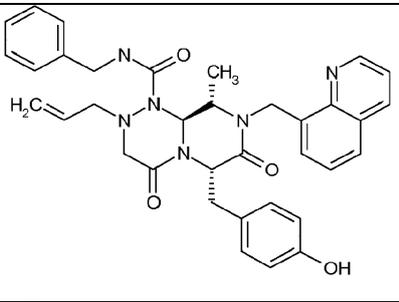
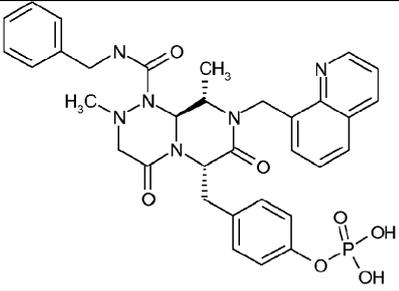
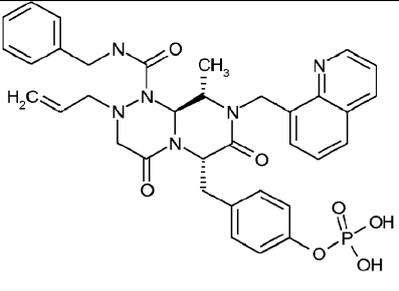
[Fórmula química 1-1P]



5 6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por una de las siguientes fórmulas químicas 1-2 a 1-7 y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
1-2		1-3	
1-4		1-5	
1-6		1-7	

7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos representados por una de las siguientes fórmulas químicas 2-1 a 2-4 y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

Nº	Fórmula química	Nº	Fórmula química
2-1		2-3	
2-2		2-4	

- 5 8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el NSCLC es un cáncer que se presenta en un paciente que tiene EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial) natural o una mutación activa en EGFR.
9. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el NSCLC es un cáncer resistente al EGFR TKI (inhibidor de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico).
- 10 10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en donde el cáncer resistente al EGFR TKI es un cáncer que se presenta en un paciente que tiene EGFR mutante.
11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en donde el EGFR mutante tiene una doble mutación de L858R y T790M.
- 15 12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición es para ser administrada en combinación con uno o más fármacos anticáncer, preferiblemente en donde el fármaco anticáncer es paclitaxel.
13. La composición para el uso de la reivindicación 12, en donde dicha composición y dichos uno o más fármacos anticáncer son para ser administrados como una formulación de combinación, o simultáneamente, o por separado.

FIG. 1

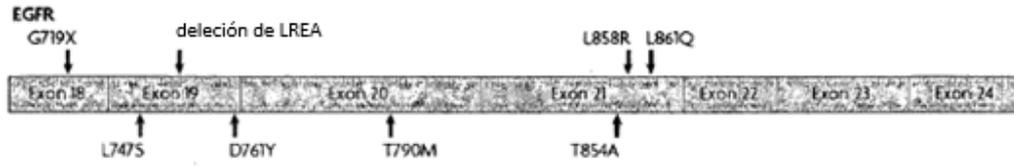


FIG. 2

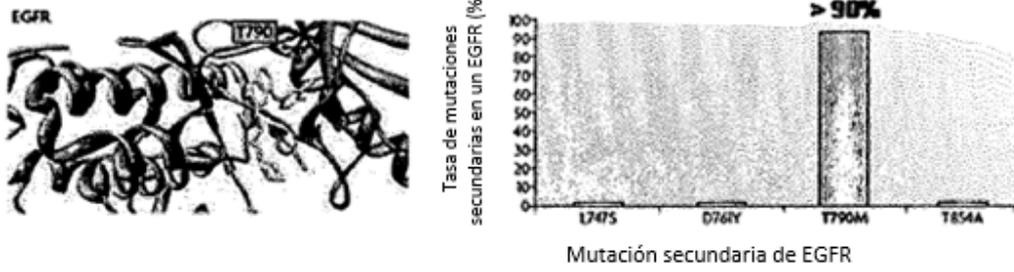


FIG.
3

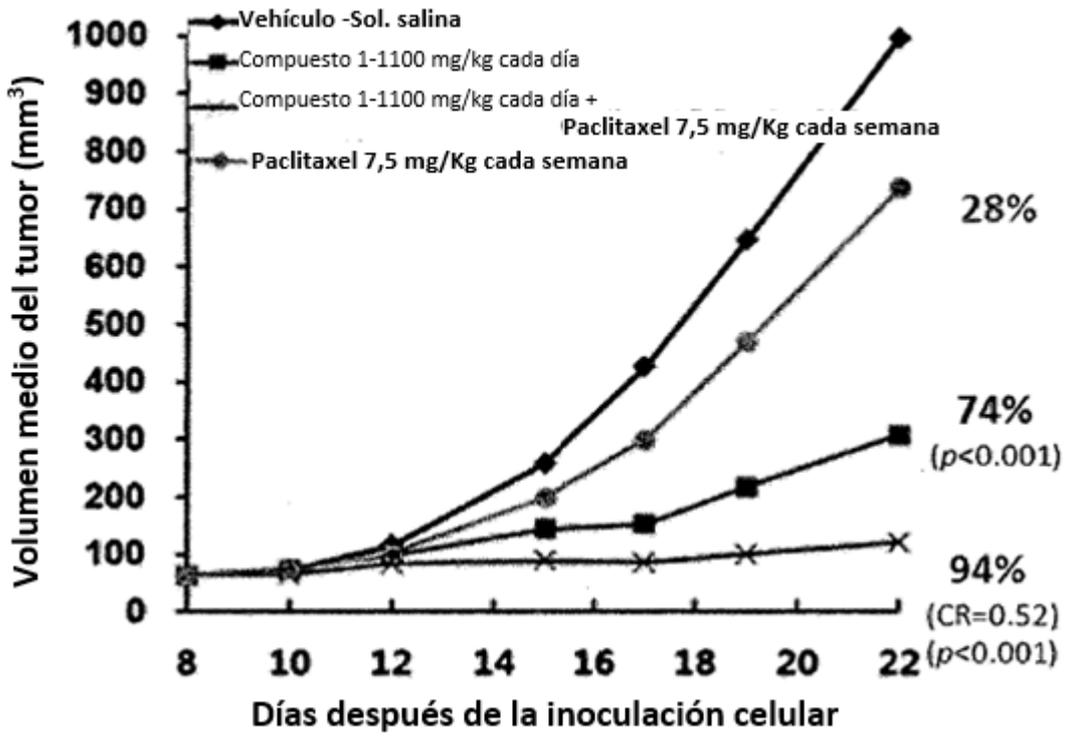


FIG. 4 **Días después de la inoculación celular**

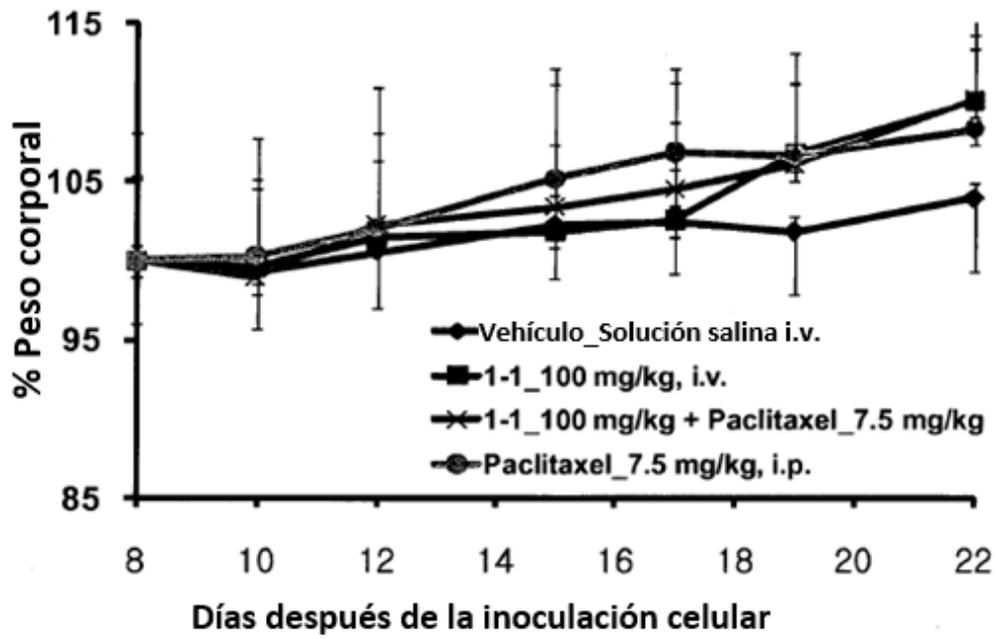


FIG. 5

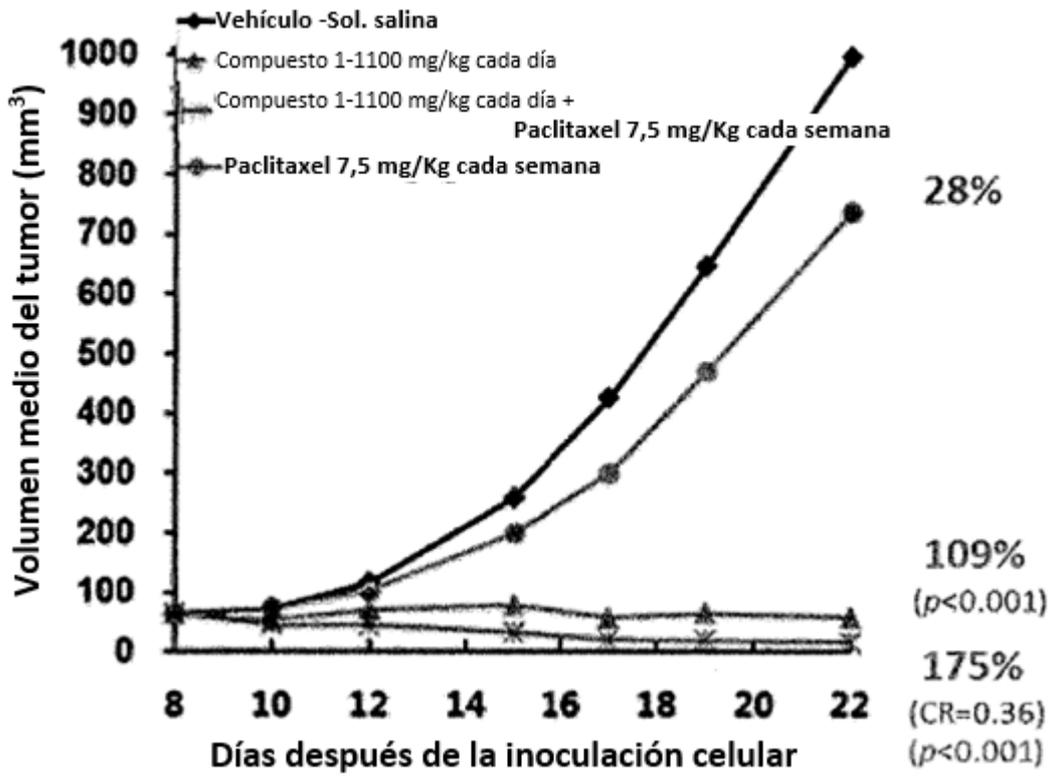


FIG. 6

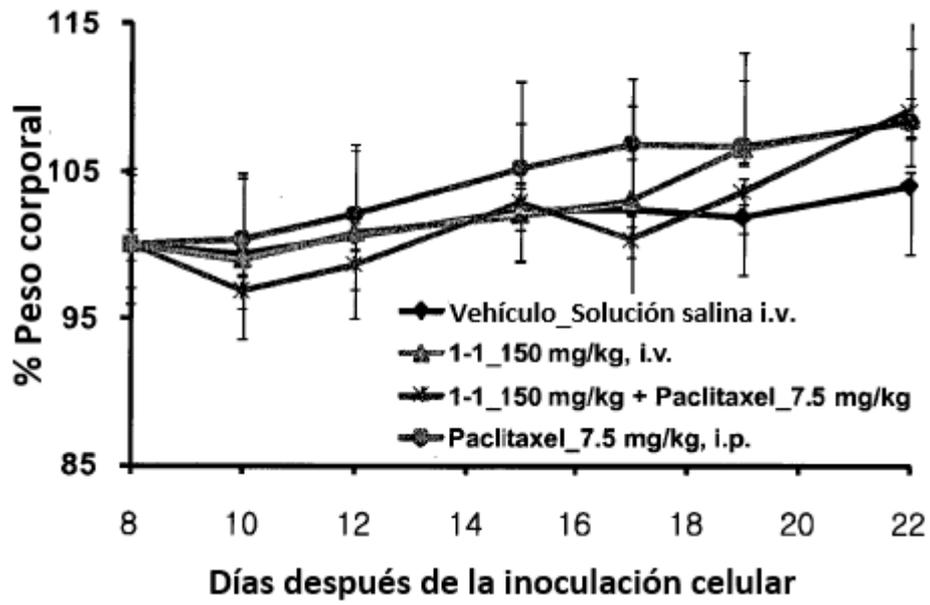


FIG. 7

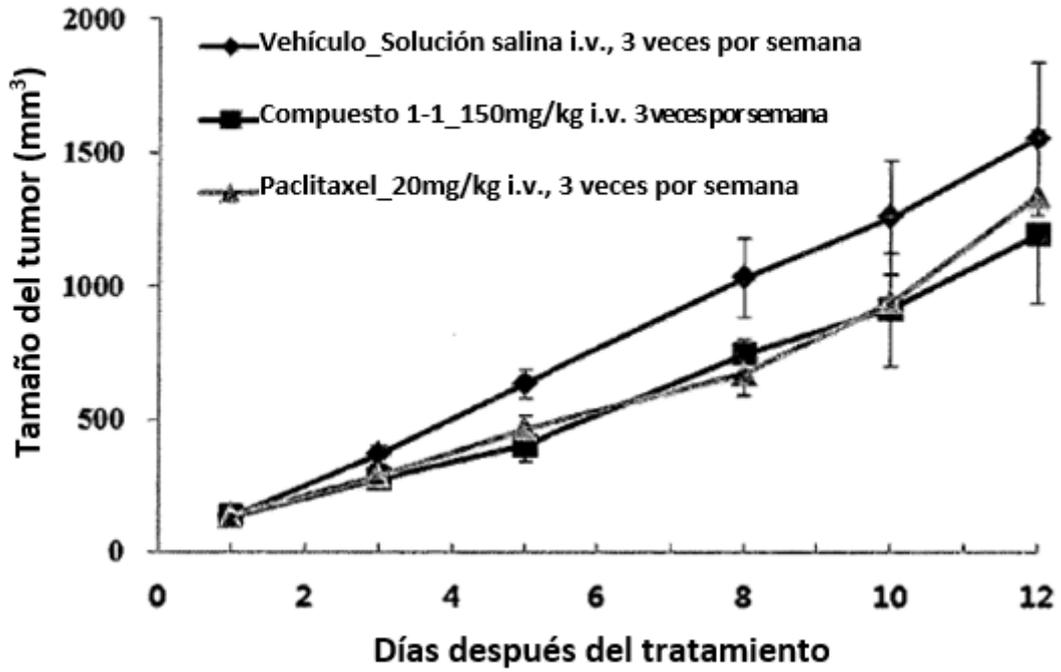


FIG. 8

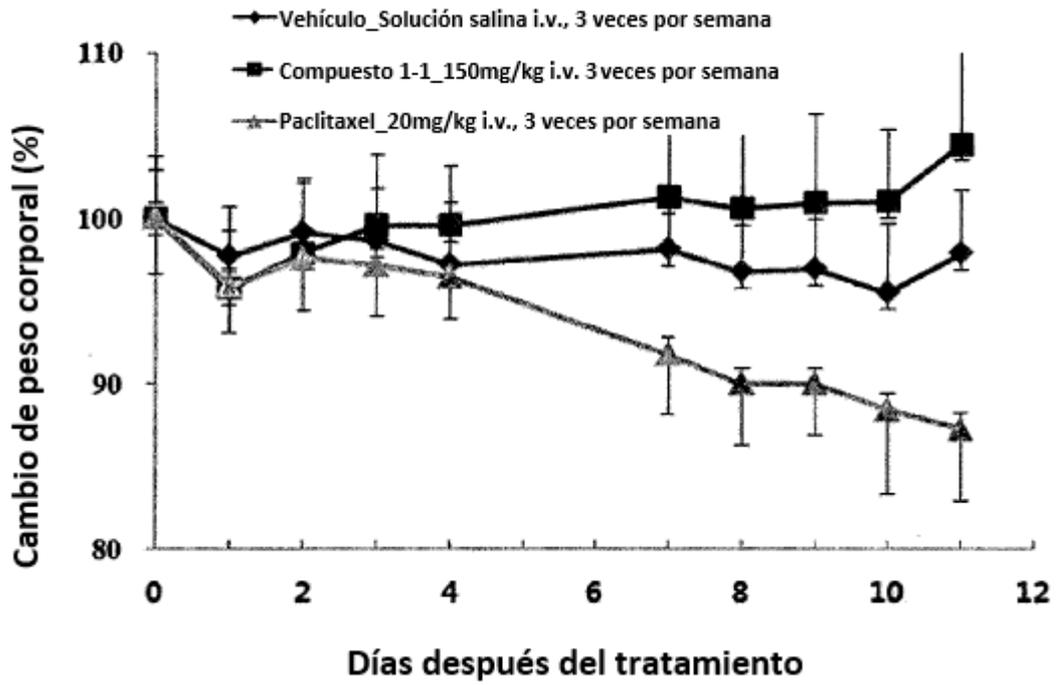


FIG. 9

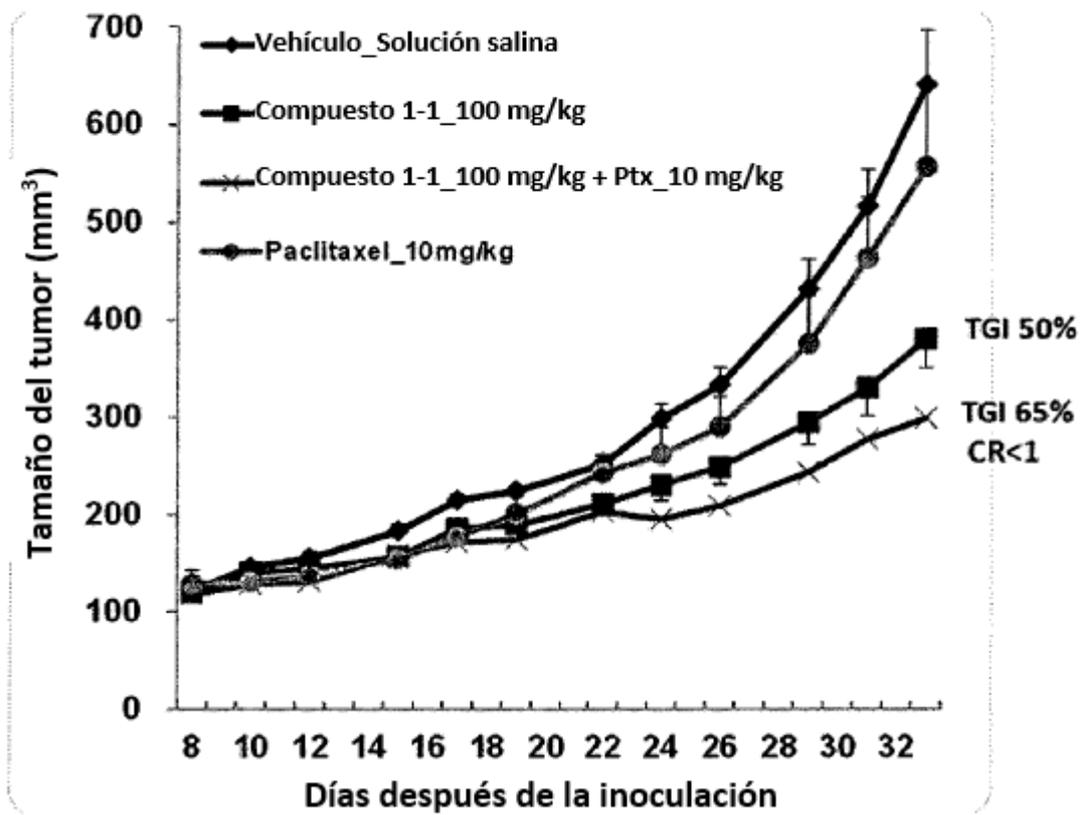


FIG.10

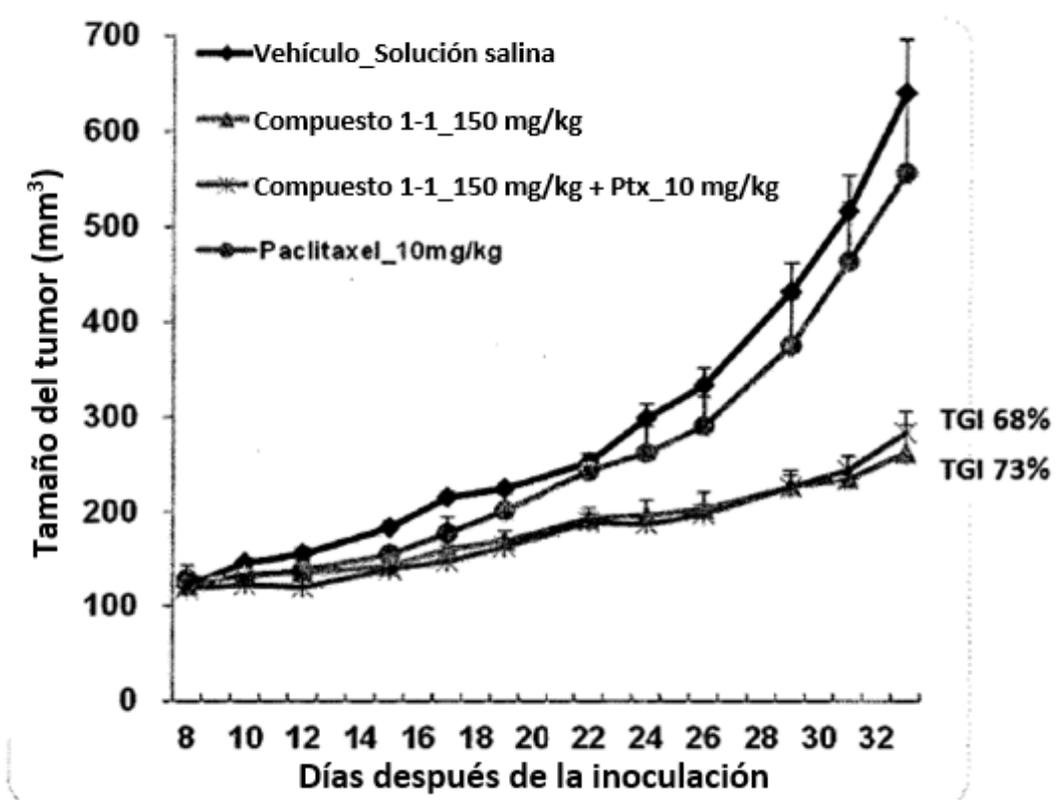


FIG.11

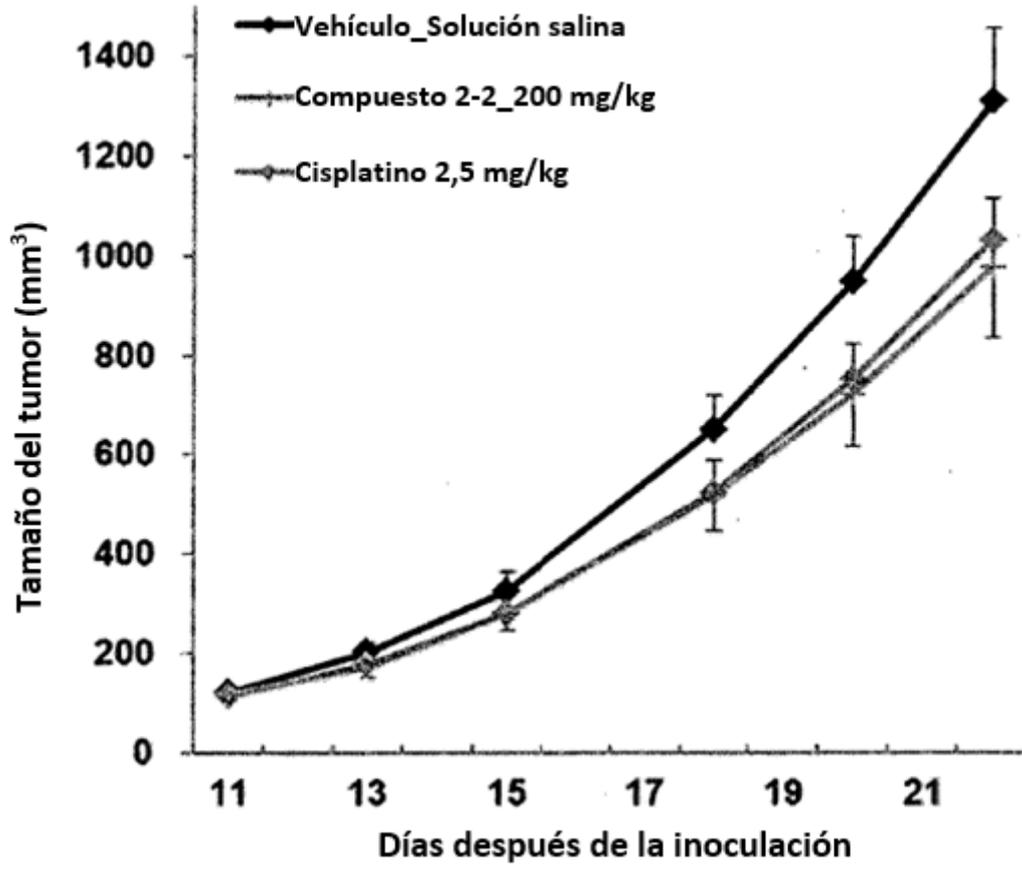


FIG.12

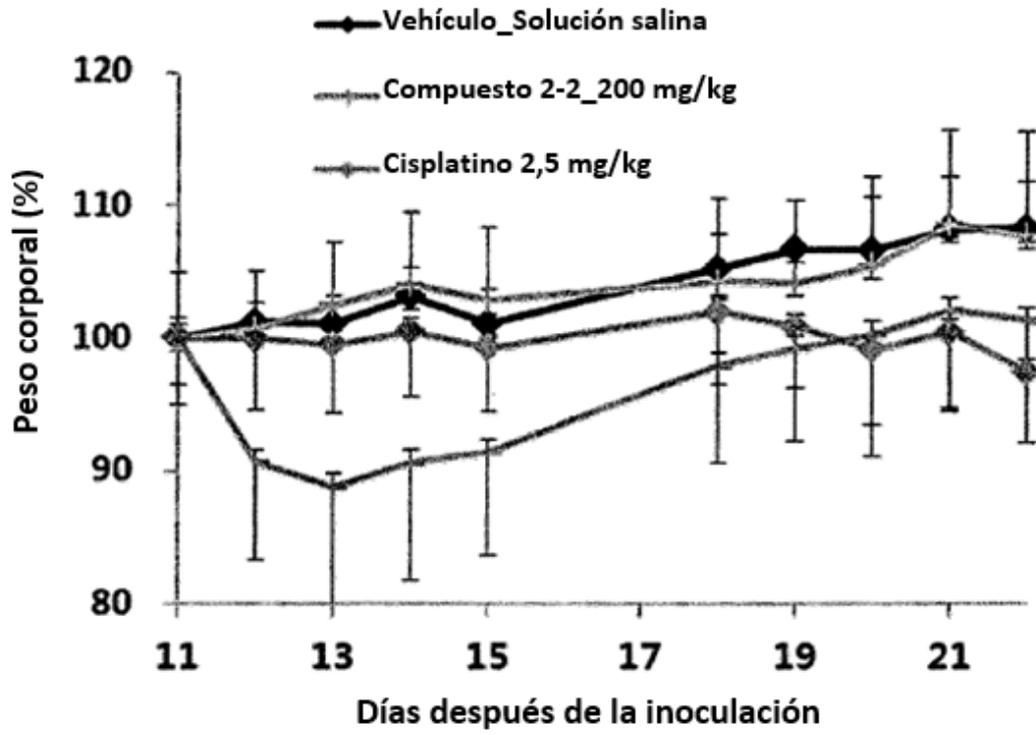


FIG.13

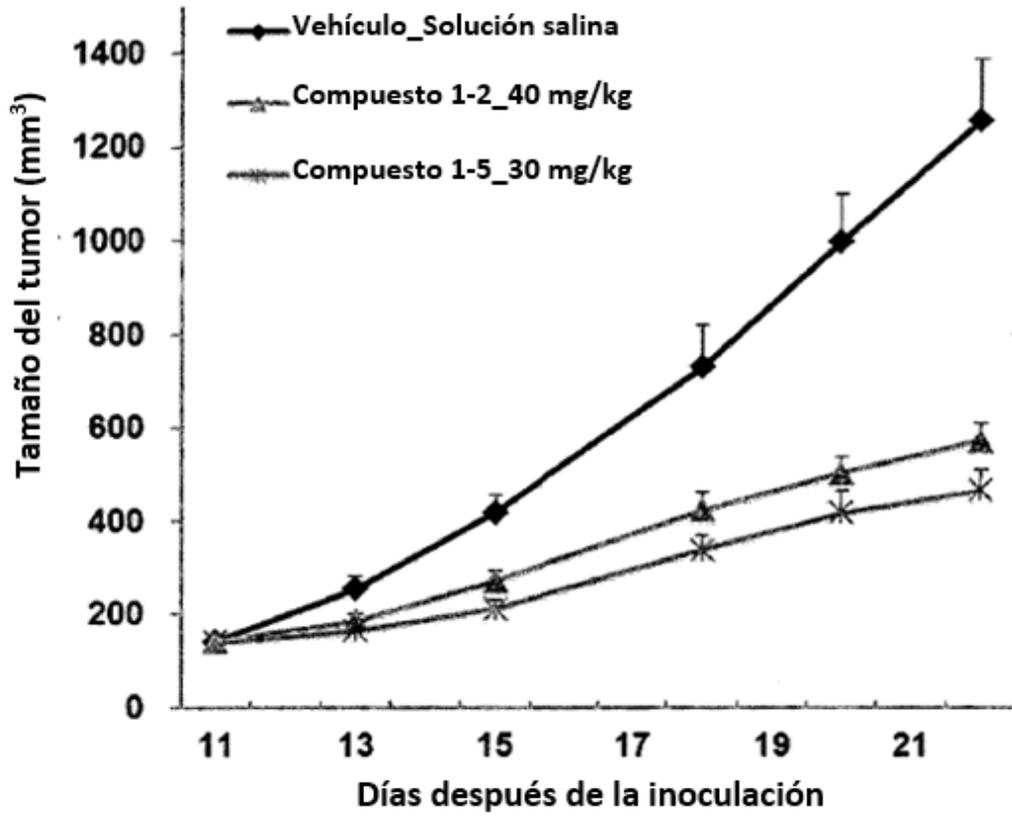


FIG.14

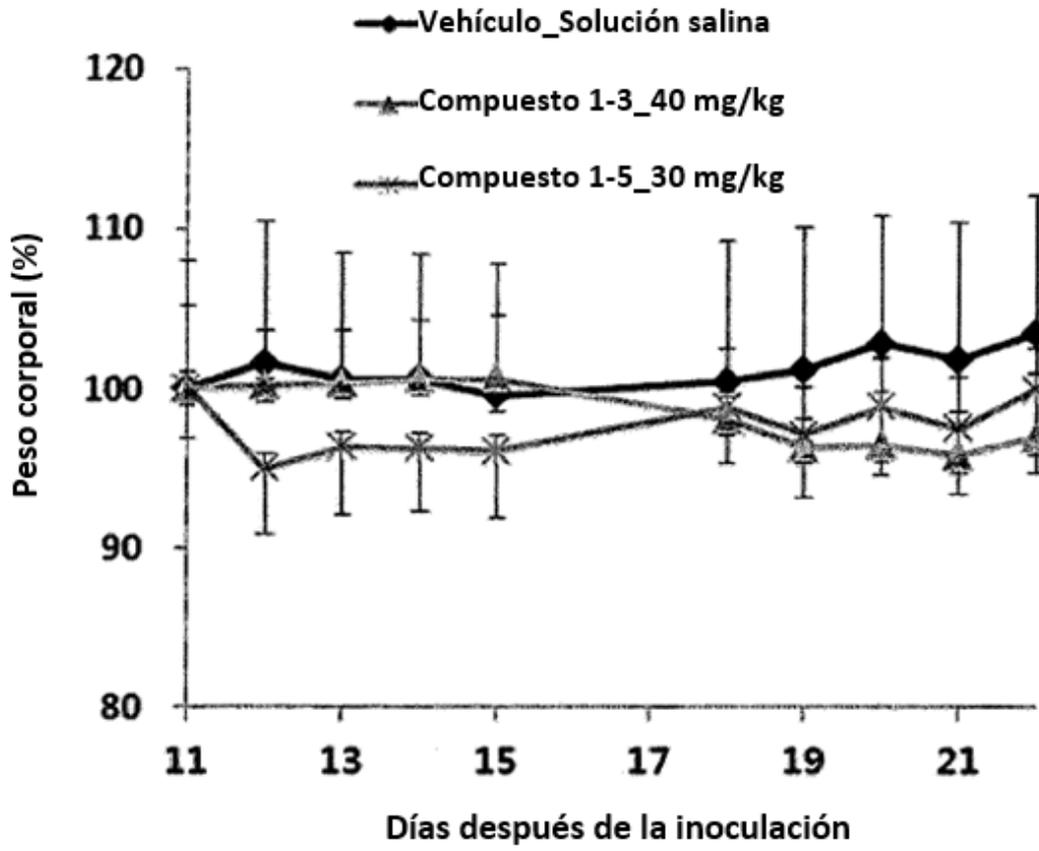


FIG.15

