



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 068**

51 Int. Cl.:
C07D 225/06 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02757908 .5**
86 Fecha de presentación : **28.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1373215**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Derivado de geldanamicina útil para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **30.03.2001 US 280078 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **THE UNITED STATES OF AMERICA,
represented by THE SECRETARY, DEPT. OF
HEALTH AND HUMAN SERVICES NATIONAL
INSTITUTES OF HEALTH
Suite 325, 6011 Executive Boulevard
Rockville, Maryland 20852, US**

72 Inventor/es: **Snader, Kenneth, M.;
Vishnuvajjala, B., Rao;
Hollingshead, Melinda, G. y
Sausville, Edward, A.**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Derivado de geldanamicina útil para el tratamiento del cáncer.

5 **Referencias cruzadas con solicitudes relacionadas**

Esta solicitud de patente reivindica la prioridad respecto de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 60/280.078 presentada el 30 de Marzo de 2001.

10 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la geldanamicina, y de manera más particular a nuevos derivados de geldanamicina, las composiciones farmacéuticas de los mismos, y a un procedimiento para usar dichos derivados para la profilaxis del tratamiento del cáncer.

15 **Antecedentes de la invención**

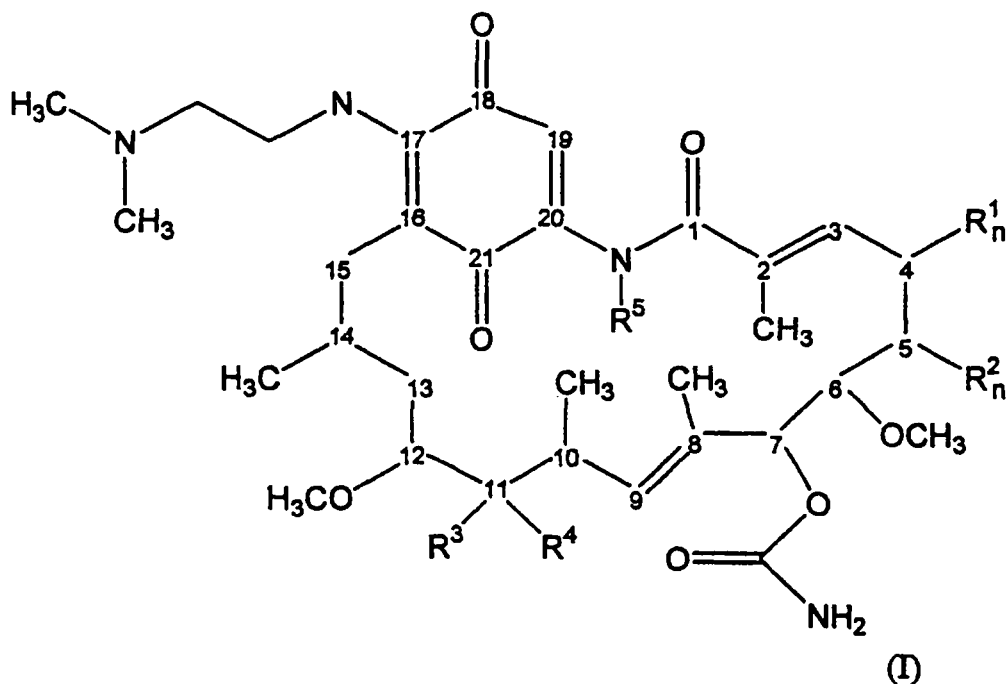
Se cree que el producto del gen ErbB2, que es un miembro de la familia ErbB de los receptores de las tirosina quinasas, juega un importante papel en la malignidad de las células tumorales. Los estudios han demostrado que la sobreexpresión de ErbB2 produce la transformación de las células y la tumorigénesis, y los experimentos *in vitro* han demostrado que se requiere ErbB2 para la inducción de la invasión de las células del carcinoma mediante otros miembros de la familia ErbB. La benzoquinona, ansamicina, geldanamicina, tienen actividad antitumoral *in vivo*, y se ha demostrado que producen el agotamiento rápido de los niveles de proteína ErbB2. La geldanamicina es un inhibidor específico de algunas proteínas de la chaperona entre las que se incluyen la proteína 90 del shock térmico (Hsp90) así como la proteína 94 regulada por la glucosa (Grp94), que se localiza en el retículo endoplásmico. Se cree que la geldanamicina actúa sobre la proteína ErbB2 mediante su inhibición de la proteína de la chaperona Hsp90, que se considera necesaria para la función adecuada de la proteína ErbB2. Se ha demostrado también que Hsp90 está ligada con la proliferación de células tumorales (véase L. Whitesell y col., *Inhibition of Heat Shock Protein HSP-90-pp60v-src Heteroprotein Complex Formation by Benzoquinone Ansamycins: Essential Role for Stress Proteins in Oncogenic Transformation*, 91 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8324-8328 (1994); T. W. Schulte y col., *Antibiotic Radicol Binds to the N-terminal Domain of Hsp90 and Shares Important Biologic Activities with Geldanamycin*, 3 Cell Stress and Chaperone Proteins 100-108 (1998); J. L. Johnson y col., *Binding of p23 and Hsp90 During Assembly with the Progesterone Receptor*, 9 Mol. Endocrinol. 670-678 (1995); W. Sullivan y col., *Nucleotides and two functional states of Hsp90*, 272 J. Biol. Chem. 8007-8012 (1997)).

Se han sintetizado análogos de geldanamicina en un intento de aumentar la biodisponibilidad y reducir la toxicidad asociada con el producto natural. Se describen derivados de geldanamicina, por ejemplo, en los Documentos US 4.261.989, WO 9501342 y en J. Med. Chem. 1995.38.3806. Entre los análogos más satisfactorios está la 17-alilaminogeldanamicina (17-AAG), que está actualmente en fase I de ensayos clínicos en el National Cancer Institute. Otros derivados de geldanamicina similares sustituidos en la posición 17^a se contemplan como posibles tratamientos del cáncer, tales como los que se describen en R. C. Schnur y col., *Inhibition of the Oncogene Product p185^{erbB-2} in Vitro and in Vivo by Geldanamycin and Dihydrogeldanamycin Derivatives*, 38 J. Med. Chem. 3806-3812 (1995). Aunque muchos de estos compuestos muestran una actividad relativamente significativa *in vitro*, pocos presentan actividad suficiente *in vivo* en los ensayos preliminares. De esta manera, estos compuestos resultan malos candidatos como medios potenciales de tratamiento terapéutico. De manera adicional, ningún compuesto conocido de geldanamicina o derivado de la misma ha mostrado actividad *in vivo* cuando se administra por vía oral.

De esta manera, sigue existiendo necesidad de otros compuestos anticancerosos efectivos y procedimientos para usar dichos compuestos. La presente invención pretende satisfacer dicha necesidad. Las ventajas concretas de la invención, así como las características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un compuesto de fórmula (I),

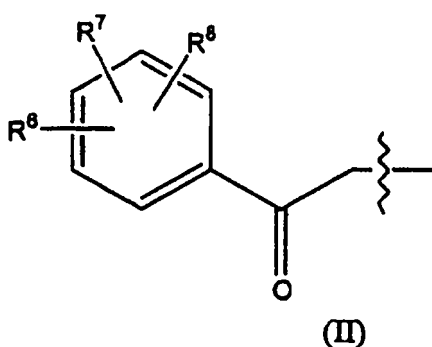


en la que $n = 0$ ó 1 y en la que, cuando $n = 1$, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, y, cuando $n = 0$, existe un doble enlace entre C_4 y C_5 ;

R^3 es hidrógeno o hidroxilo;

R^4 es hidrógeno o hidroxilo; en la que, cuando R^3 es hidrógeno, R^4 es hidroxilo, y cuando R^3 es hidroxilo, R^4 es hidrógeno; y

R^5 es hidrógeno o un grupo de fórmula (II)



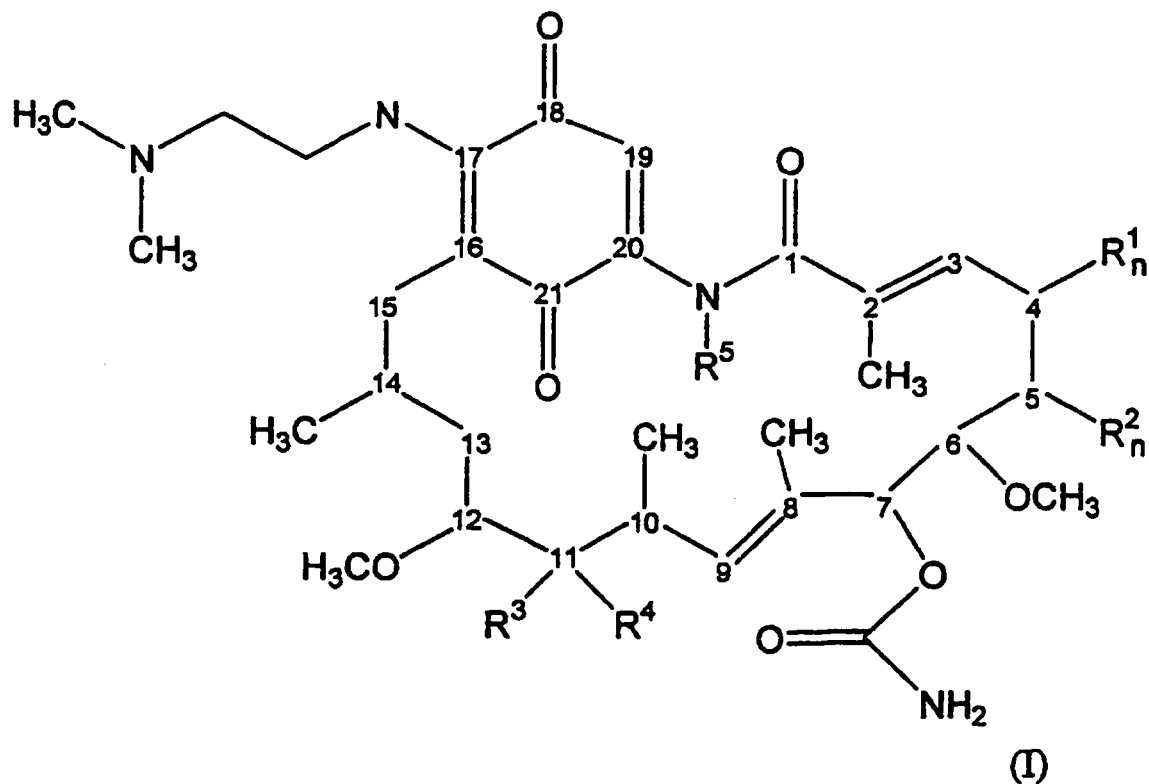
en la que cada uno de R^6 , R^7 , y R^8 se selecciona de manera independiente entre el grupo constituido por hidrógeno, halo, azido, nitro, un alquilo C_1 - C_8 , un alcoxilo C_1 - C_8 , arilo y ciano, y las sales de los mismos.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

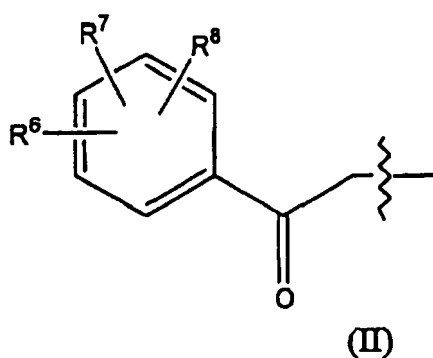
Se describe también un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer en un huésped. El procedimiento comprende administrar a un huésped el compuesto anteriormente descrito en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el cáncer en el huésped, con lo cual el cáncer del huésped se trata o previene.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un compuesto de fórmula (I),

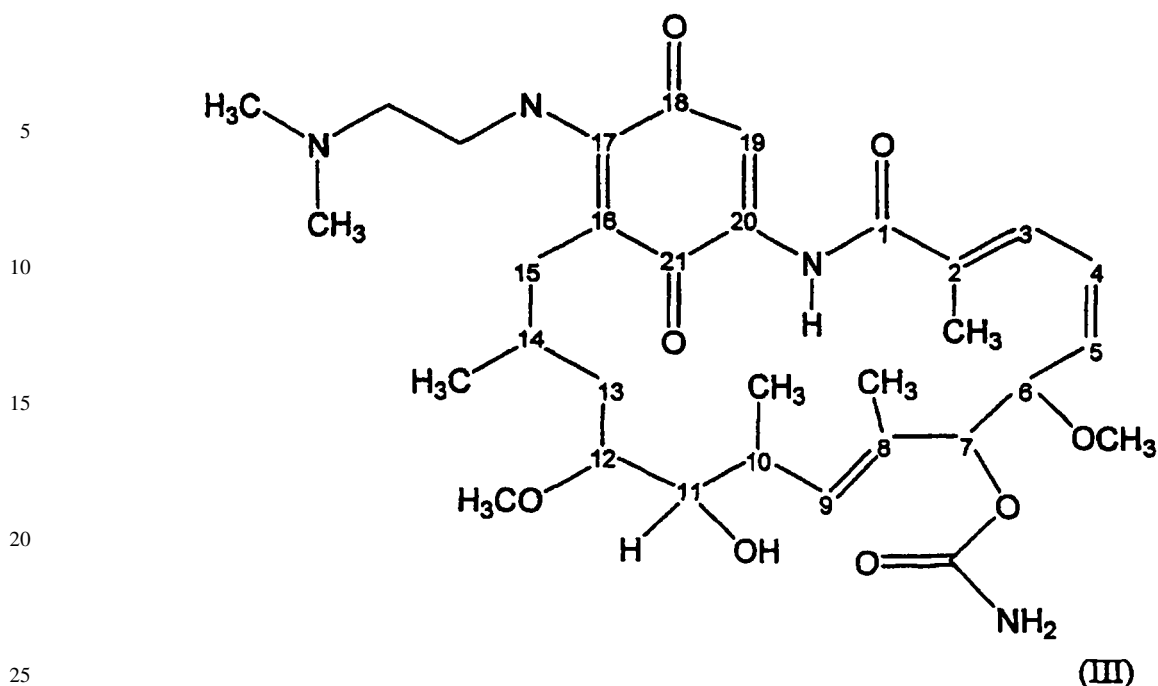


en la que $n = 0$ ó 1 . Cuando $n = 1$, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, y, cuando $n = 0$, existe un doble enlace entre C_4 y C_5 . R^3 y R^4 son cada uno de manera independiente hidrógeno o hidroxilo, en la que, cuando R^3 es hidrógeno, R^4 es hidroxilo, y cuando R^3 es hidroxilo, R^4 es hidrógeno. R^5 es hidrógeno o un grupo de fórmula (II)



en la que cada uno de R^6 , R^7 , y R^8 se selecciona de manera independiente entre el grupo constituido por hidrógeno, halo, azido, nitro, un alquilo C_1 - C_8 , un alcoxilo C_1 - C_8 , arilo y ciano. La invención proporciona también las sales de los compuestos de fórmula (I). Las posiciones indicadas por los números 1-21 en el anillo de benzoquinona ansamicina en las fórmulas (I) y (III) representan átomos de carbono.

En una forma de realización preferida de la presente invención, $n = 0$ y existe un doble enlace entre C_4 y C_5 . Se prefiere de manera particular el hidrógeno para R^5 . De esta manera, un compuesto particularmente preferido de la presente invención es un compuesto representado mediante la fórmula (III) (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxygeldanamicina).



Los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de una sal, que es de manera preferible una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico, y sulfúrico, y ácidos inorgánicos tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, tales como, por ejemplo, ácido p-toluénsulfónico.

De manera preferible, los compuestos de la presente invención tienen una solubilidad en agua mejorada en comparación con la Geldanamicina, y/o tienen la capacidad de formar sales (por ejemplo, sales ácidas) que tienen una solubilidad en agua mejorada en comparación con la Geldanamicina, reteniendo a la vez la actividad anticancerosa o antitumoral *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos preferidos de la presente invención tienen solubilidades en agua de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml o al menos de aproximadamente 1 mg/ml (por ejemplo, al menos de aproximadamente 1,5 mg/ml), de manera preferible al menos de aproximadamente 2 mg/ml (por ejemplo, al menos de aproximadamente 2,5 mg/ml). De manera más preferible, los compuestos de la presente invención tienen solubilidades en agua de al menos aproximadamente 3 mg/ml (por ejemplo, al menos de aproximadamente 3,5 mg/ml) o incluso al menos de aproximadamente 4 mg/ml (por ejemplo, al menos de aproximadamente 4,5 mg/ml) e incluso mayores solubilidades en agua (por ejemplo, al menos de aproximadamente 5 mg/ml). Se pueden determinar las solubilidades en agua usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Aunque los compuestos de la presente invención, de manera preferible, tienen una solubilidad en agua mejorada, se pueden usar técnicas conocidas en la técnica en conjunción con la presente invención para mejorar de manera adicional la solubilidad al agua de estos compuestos. Por ejemplo, se puede ajustar el pH de una formulación que comprende el compuesto para optimizar la solubilidad en agua del compuesto. También, se pueden incorporar diversos aditivos en una formulación que comprende un compuesto de la presente invención. Entre los aditivos útiles se incluyen cosolventes (por ejemplo, polietilén glicol), agentes activos superficiales, agentes complejantes, agentes emulsificantes, compuestos anfífilicos, liposomas, y micro y nanopartículas, que pueden mejorar la solubilidad de un compuesto de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención han demostrado tener una actividad *in vivo* significativa en comparación con los compuestos de estructura similar. Se puede medir la actividad *in vivo* mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Entre los procedimientos adecuados se incluyen, por ejemplo, un ensayo de fibra hueca (HFA) y o el ensayo del injerto heterólogo. Un procedimiento preferido para determinar la actividad *in vivo* usado en conjunción con la presente invención es un ensayo de fibra hueca, tal como se describe en M. G. Hollingshead y col., *In Vivo Cultivation of Tumor Cells in Hollow Fibers* (57)2 Life Sci. 131-141 (1995). Normalmente, se usa un ensayo de fibra hueca como un filtro preliminar para identificar compuestos que tienen actividad anticancerosa moderada o importante. De manera general, se considera que los compuestos que presentan resultados positivos significativos tienen actividad anticancerosa moderada o importante. Se puede usar el HFA en conjunción con otros procedimientos de ensayo, tal como el ensayo del injerto heterólogo, para proporcionar más evidencia de la actividad anticancerosa *in vivo* de los compuestos y, de esta manera, su adecuación para el tratamiento de una enfermedad concreta.

Se ha encontrado también de manera inesperada que los compuestos de la presente invención producen actividad oral *in vivo* significativa cuando se administran a un huésped. Por actividad oral *in vivo* significativa se entiende que se puede administrar el compuesto por vía oral a un huésped para producir una puntuación HFA de tal manera que hace necesario más ensayos. Se deberá señalar que no se ha demostrado que otra clase de compuestos de geldanamicina o

derivados de los mismos tengan dicha actividad oral *in vivo* significativa. Por tanto, se preferirán los compuestos de la presente invención sobre otras opciones de tratamiento debido a los medios menos invasivos por los cuales se puede administrar el compuesto de manera efectiva.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende los compuestos de geldanamicina de fórmula (I) descritos en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender de manera adicional más de un ingrediente activo. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender más de un compuesto de la presente invención, ésta puede comprender un compuesto de la presente invención en combinación con otro agente o fármaco farmacéuticamente activo y similares.

La composición farmacéutica puede comprender también un vehículo adecuado. De manera preferible, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el vehículo puede ser cualquiera de los usados de manera convencional para fabricar una composición farmacéutica. La elección del vehículo farmacéuticamente aceptable está únicamente limitada por consideraciones químico físicas, tales como la solubilidad y la ausencia de reactividad con los compuesto(s) activo(s), y por la ruta de administración. Se apreciará por una persona experta en la técnica que, de manera adicional a la siguiente composición farmacéutica descrita, se pueden formular los compuestos de los presentes procedimientos inventivos en forma de complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión en ciclodextrina, o liposomas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, coadyuvantes, excipientes, y diluyentes, son bien conocidos por aquellos que sean personas expertas en la técnica, y están fácilmente disponibles. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte respecto del compuesto(s) activo(s) y que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad bajo las condiciones de uso.

La elección del vehículo se determinará en parte por el compuesto concreto, así como por el procedimiento concreto usado para administrar la composición. De acuerdo con esto, existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente invención. Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, interperitoneal, rectal, y vaginal son ejemplares y no son en modo alguno limitantes.

Las formulaciones inyectables están entre aquellas formulaciones que se prefieren de acuerdo con los presentes procedimientos inventivos. Son conocidos por aquellas personas normalmente expertas en la técnica los requerimientos de los vehículos farmacéuticamente efectivos para las composiciones inyectables (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds, páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)). Se prefiere que dichas composiciones inyectables se administren por vía intravenosa o, en el contexto del tratamiento del cáncer, intratumoralmente (en el interior del tumor) o peritumoralmente (próxima a la parte externa del tumor).

Son bien conocidas por aquellas personas expertas en la técnica las formulaciones tópicas. Dichas formulaciones son particularmente adecuadas en el contexto de la presente invención para la aplicación a la piel.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir de (a) soluciones líquidas tales como una cantidad efectiva del compuesto disuelta en diluyentes, tales como agua, solución salina o jugo de naranja; (b) cápsulas, sobrecillos, comprimidos, pastillas, grageas, contenido cada una una cantidad predeterminada de ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, y los polietilén alcoholes, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser de ordinario de tipo gelatina con cubierta dura o blanda, conteniendo, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes, y rellenos inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz. Las formas de comprimido puede incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes desintegrantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, y excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla puede comprender el ingrediente activo en un aroma, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, emulsiones, geles, y similares que contienen, además del ingrediente activo dichos excipientes tal como se conocen en la técnica.

Se puede fabricar el presente compuesto inventivo, sólo o en combinación con otros componentes adecuados en formulaciones de aerosol para ser administradas mediante inhalación. Se pueden colocar estas formulaciones de aerosol en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Se pueden formular también en forma de composiciones farmacéuticas para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o un atomizador. Se pueden usar también dichas formulaciones en spray para rociar la mucosa.

Entre las formulaciones adecuadas para la administración parenteral se incluyen soluciones para inyección isotónica estéril, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del huésped deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden

incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. Se puede administrar el presente compuesto inventivo en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como en un líquido o mezcla de líquidos estériles, entre los que se incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones relacionadas con azúcares, un alcohol, tal como etanol, isopropanol, o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilén glicol o polietilén glicol, dimetilsulfóxido, glicerol cetales, tal como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, tales como poli (etilénglicol) 400, un aceite, un éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente suspensor, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsificantes y otros coadyuvantes farmacéuticos.

Los aceites que se puede usar en formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animal, vegetal, o sintéticos. Entre los ejemplos específicos de aceites se incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina, y mineral. Entre los ácidos grasos adecuados par uso en las formulaciones parenterales se incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplo de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio, y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil alquil amonio, y haluros de alquil piridinio (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo, y olefina; sulfatos y sulfosuccinatos de alquilo, olefina, éter, y monoglicérido, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasa, alcanolamidas de ácido graso, y copolímeros de polioxietilénpolipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-b-aminopropionatos, y sales de 2-alquil-imidazolina amonio cuaternario y (e) las mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contendrán normalmente entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 25% en peso del ingrediente activo en solución. Se pueden usar conservantes y tapones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el emplazamiento de la inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de entre aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones oscilará normalmente entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 15% en peso. Entre los tensioactivos adecuados se incluyen ésteres de ácido graso de polietilén sorbitán, tales como monooleato de sorbitán y aductos de óxido de etileno de alto peso molecular con una base hidrófoba, formada por la condensación de óxido de propileno con propilén glicol. Se pueden presentar las formulaciones parenterales en contenedores sellados de dosis unitarias o multidosis, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en condición de criopreservación (lío-filizados) requiriendo solo la adición de excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para la inyección, inmediatamente antes del uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones extemporáneas a partir de polvos, gránulos, y comprimidos estériles del tipo anteriormente descrito.

De manera adicional, se pueden fabricar los presentes compuestos inventivos o composiciones que contienen aquellos compuestos en supositorios por mezcla con una variedad de bases, tales como bases emulsificantes o bases solubles en agua. Se pueden presentar las formulaciones adecuadas para administración vaginal en forma de pesarios, tapones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas en spray que contienen, de manera adicional al ingrediente activo, se conocen dichos vehículos en la técnica por ser apropiados.

Tal como se ha descrito anteriormente, los derivados de geldanamicina, tales como los que se describen en el presente documento, inhiben algunas proteínas de la chaperona entre las que se incluyen la proteína 90 del shock térmico (Hsp90) así como la proteína 94 regulada por la glucosa (Grp94). Se ha demostrado que la Hsp90 es necesaria para el funcionamiento correcto de la ErbB2. De manera adicional, se ha demostrado que la Hsp90 está relacionada con la proliferación de células tumorales y se cree que la ErbB2 juega un papel importante en la malignidad de las células tumorales. A este respecto, la presente invención describe de manera adicional un procedimiento para el tratamiento o prevención del cáncer en un huésped. El procedimiento comprende la administración de un compuesto de la presente invención a un huésped en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el cáncer en el huésped, con lo cual se trata o previene el cáncer del huésped.

Se puede mejorar el procedimiento de tratamiento del cáncer usando el compuesto de la presente invención administrando uno o más de otros compuestos anticancerosos junto con uno o más de otros compuestos de la presente invención. Estos otros compuestos anticancerosos incluyen, pero no se limitan a, los compuestos anticancerosos conocidos aprobados en los Estados Unidos y los que serán aprobados en el futuro. Véanse, por ejemplo, la Tabla 1 y la Tabla 2 de Boyd, *Current Therapy in Oncology*, Sección I. Introduction to Cancer Therapy (J. E. Niederhuber, ed), Capítulo 2, por B. C. Decker, Inc., Filadelfia, 1993, pp. 11-22. De manera más particular, entre los compuestos anticancerosos que se usan de manera preferible con los derivados de la geldanamicina descritos en el presente documento de acuerdo con la invención se incluyen doxorubicina, bleomicina, vincristina, vinblastina, VP-16, VW-26, cisplatina, carboplatina, procarbazona y taxol para los tumores sólidos en general; los agentes alquilantes, tales como BCNU, CCNU, metil CCNU y DTIC, para los cánceres de cerebro o riñón; y antimetabolitos tales como 5-FU y metotrexato para el cáncer de colon.

Un compuesto de la presente invención, de manera deseable, se administra a una célula que expresa la ErbB2 en ausencia del compuesto de la presente invención, o a un huésped que incluye dichas células, en una cantidad suficiente para reducir o eliminar la expresión de la proteína ErbB2. La cantidad de derivado de geldanamicina de la

presente invención que se administra es una cantidad suficiente para reducir la expresión de la ErbB2 en al menos aproximadamente un 20%, hasta completamente, en comparación con la expresión de la ErbB2 en ausencia de los derivados de geldanamicina de la presente invención. Se apreciará por aquellas personas expertas en la técnica que una reducción en la expresión de la ErbB2 de al menos aproximadamente un 30%, de al menos aproximadamente un 40%, de al menos aproximadamente un 50%, de al menos aproximadamente un 60%, de al menos aproximadamente un 70%, de al menos aproximadamente un 80%, o de al menos aproximadamente un 90% en comparación con la expresión de la ErbB2 en ausencia del derivado de geldanamicina de la presente invención es también beneficiosa para el huésped.

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para medir los niveles de expresión de la ErbB2 en conjunción con la presente invención. Entre los procedimientos adecuados se incluyen, por ejemplo, exposición diferencial, análisis en serie de la expresión del gen (SAGE), reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción inversa cuantitativa (QRT-PCR), clonación por sustracción, macromatrices y micromatrices (por ejemplo, chips de ADN). Se pueden medir los niveles de expresión de la ErbB2 antes de la administración del compuesto, con el fin de determinar los regímenes de dosificación apropiados, así como durante y después de la administración del compuesto con el fin de determinar la biodisponibilidad del compuesto y la eficacia *in vivo*.

Una persona experta en la técnica apreciará que estén disponibles los procedimientos adecuados para administrar los derivados de geldanamicina de la presente invención, y las composiciones que comprenden los derivados de geldanamicina de la presente invención en un animal, tal como un mamífero, de manera particular un ser humano. Aunque se puede usar más de una ruta para administrar un compuesto concreto, una ruta concreta puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta. De acuerdo con esto, los procedimientos descritos en el presente documento son ejemplares y no limitantes en modo alguno.

La dosis administrada a un animal, tal como un mamífero, de manera particular un ser humano, debería ser suficiente para prevenir el cáncer, retardar su inicio, o retardar (o detener) su progresión. Una persona experta en la técnica reconocerá que la dosificación dependerá de una variedad de factores entre los que se incluyen la fuerza de un compuesto concreto empleado, así como la edad, la especie, la dolencia, y el peso corporal del animal. Se determinará también el tamaño de la dosis mediante la ruta, el calendario, y la frecuencia de administración así como la existencia, naturaleza, y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar la administración de un compuesto particular y el efecto fisiológico deseado.

Se pueden determinar las dosis y regímenes de dosificación adecuados mediante técnicas de búsqueda de intervalo convencionales conocidas por aquellas personas expertas en la técnica. De manera general, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después de eso, se incrementa la dosificación mediante pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. El presente procedimiento inventivo implicará normalmente la administración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg de uno o más de los compuesto descritos anteriormente por kg de peso corporal.

40 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran de manera adicional la presente invención, pero, por supuesto no se construyen de ningún modo para limitar su alcance. Dos compuestos de la presente invención (es decir, los Compuestos A y B) y un compuesto comparativo (es decir, el Compuesto C) se prepararon tal como se describe a continuación. Cada uno de estos compuestos se usó de manera posterior en un ensayo de fibra hueca para determinar si el compuesto produjo suficiente actividad *in vivo* de tal manera que el ensayo garantizara la necesidad de ensayos adicionales.

Compuesto A

50 Preparación de la 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxygeldanamicina

Una mezcla de geldanamicina (1,5 g, 2,68 mmol) (NCI, Lote N° 3059-25-1) y N,N-dimetiletildiamina (1,5 mL, 13,7 mmol) (Aldrich, Lote N° 04216AL) en cloruro de metileno seco (30 mL) (Burdick & Jackson, Lote N° BH516) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y se vertió de manera subsiguiente en agua helada (50 mL). Después que la capa orgánica y la capa acuosa llegaron a separarse visualmente, se extrajo la capa acuosa con cloruro de metileno (2 X 10 mL). Se lavó la solución de cloruro de metileno combinado con agua (2 X 10 mL), se secó sobre MgSO₄ (J. T. Baker, Lote N° E01098) y se evaporó en un aspirador. Se purificó el residuo restante mediante cromatografía en gel de sílice (30 g) (EM Science, Lote N° 325TA509634) eluyendo con metanol al 10% (Chempure, Lote N° M178KMDH) en cloruro de metileno. Se combinaron las fracciones que contenían el producto y se concentraron en un aspirador. A continuación se disolvió el residuo en cloruro de metileno caliente (3 mL), se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con hexano (60 mL) (Chempure, Lote N° M148KMRC). A continuación se agitó esta mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se formó un polvo púrpura y se recogió mediante filtración, se lavó con hexano (2 X 10 mL) y se secó a 55°C/0,1 mm de Hg (0 N/m²) durante 6 horas para dar el compuesto diana puro. Se aislaron aproximadamente 1,59 g de 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxygeldanamicina (96%) y se usaron en el Ejemplo 1.

65

*Compuesto B**Preparación del clorhidrato de (17-dimetoxi-17-[[2-(dimetilamino)etil]amino]geldanamicina*

Una mezcla de geldanamicina (15 g, 26, 75 mmol) (SAIC-Frederick, Lote N° 3155-28-1) y N,N-dimetil-etilén-diamina (15 mL, 37,83 mmol) (Aldrich, Lote N° HN04216AL) en cloruro de metileno seco (300 mL) (Mallinckrodt, Lote N° 4881KVJP) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se vertió de manera subsiguiente en agua helada (500 mL). Después que la capa orgánica y la capa acuosa llegaran a separarse visualmente, se extrajo la capa acuosa con cloruro de metileno (2 X 100 mL). Se lavó con agua la solución de cloruro de metileno combinado (2 X 100 mL), se secó MgSO₄ (Spectrum, Lote N° HJ302), y se evaporó en una bomba de diafragma. Se disolvió el residuo restante (16,5 g, 26,75 mmol) en cloruro de metileno (130 mL). Se añadió el cloruro de hidrógeno (1,1 eq, 29,43 mmol) (Matheson, Lote N° T410242) en dioxano (Aldrich, Lote N° 16619CQ) a la solución resultante en precipitación inmediata. Tras agitar durante 30 minutos, se recogieron los sólidos, se enjuagaron con cloruro de metileno (50 mL) y se secaron al aire durante 18 horas para dar la sal de clorhidrato cruda (17,2 g). Se calentó a reflujo una solución del producto crudo (17,2 g) en alcohol acuoso (50% v/v, 200 mL) (Aaper Alcohol, Lote N° 97A28UARAT), se filtró, y se dejó enfriar durante 30 minutos. Tras enfriar en hielo durante 30 minutos más, se recogieron los sólidos, se lavaron con alcohol anhidro frío (50 mL), y se secaron al aire durante 1 hora. Se secó el producto de manera adicional a 70°C/0,1 mm de Hg (0 N/m²) durante 17 horas para dar el compuesto diana puro. Se aislaron aproximadamente 13,4 g de clorhidrato de 17-demetoxi-17-[[2 (dimetilamino) etil] amino] geldanamicina (82%) como un sólido cristalino violeta y se usó en los Ejemplos 1 y 2.

*Compuesto C**Preparación de la 17-dimetiaminopropilamino-17-demetoxigeldanamicina*

Una mezcla de geldanamicina (1,5 g, 2,68 mmol) (NCI, Lote N° 3059-25-1) y 3-dimetilaminopropilamina (1,5 mL, 11,9 mmol) (Aldrich, Lote N° 08103CF) en cloruro de metileno seco (30 mL) (Burdick & Jackson, Lote N° BH516) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se vertió de manera subsiguiente en agua helada (50 mL). Después que la capa orgánica y la capa acuosa llegaran a separarse visualmente, se extrajo la capa acuosa con cloruro de metileno (2 X 100 mL). Se lavó con agua la solución de cloruro de metileno combinado (2 X 100 mL), se secó con MgSO₄ (J. T. Baker, Lote N° E01098) y se evaporó en un aspirador. Se purificó el residuo restante mediante cromatografía en gel de sílice (30 g) eluyendo con metanol al 10% en cloruro de metileno. Se combinaron las fracciones que contenían el producto y se concentraron en un aspirador. A continuación se disolvió el residuo en cloruro de metileno caliente (3 mL), se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con hexano (60 mL) (Chempure, Lote N° M148KMRC). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se formó un polvo púrpura y se recogió mediante filtración, se lavó con hexano (2 X 10 mL) y se secó a 55°C/0,1 mm de Hg (0 N/m²) durante 5 horas para dar el compuesto diana puro. Se aislaron aproximadamente 1,64 g de 17-dimetilaminopropilamino-17-demetoxigeldanamicina (97%) y se usaron en el Ejemplo 1.

Los ensayos HFA y MTT

Se ensayaron los compuestos A-C en un ensayo de fibra hueca respecto de la actividad *in vivo*. Se ensayó cada compuesto frente a un panel estándar de 12 líneas de células tumorales humanas que incluían NCI-H23, NCI-H522, MDA-MB-231, MDA-MB-435, SW-620, COLO 205, LOX IMVI, UACC-62, OVCAR-3, OVCAR-5, U251 y SF-295. Se cultivaron las líneas de células en RPMI-1640 que contenía FBS al 10% y glutamina 2 mM. Un día antes de la preparación de la fibra hueca, se proporcionó a las células un suplemento de medio fresco para mantener el crecimiento en fase logarítmica. Para la preparación de la fibra, se cosecharon las células mediante la técnica de tripsinización estándar y se resuspendieron a la densidad celular deseada. Se lavaron las suspensiones de células en 1 mm de fibras huecas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (PM de exclusión 500.000 Da) y se sellaron de manera subsiguiente mediante calor a intervalos de 2 cm. Se colocaron las muestras generadas a partir de estos sellos en medio de cultivo de tejido y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 24-48 horas antes del implante. Se prepararon un total de 3 líneas de células tumorales diferentes por cada experimento, de tal manera que cada ratón recibió 3 implantes intraperitoneales (1 de cada línea de células tumorales) y 3 implantes subcutáneos (1 de cada línea de células tumorales). Se llevaron a cabo un total de 4 experimentos en cada ratón (3 líneas de células/experimento X 4 experimento = 12 líneas de células).

El día del implante, se cuantificaron las muestras de cada línea de células tumorales respecto de la masa de células viable mediante un ensayo MTT de punto final estable, de tal manera que se conocía la masa de células en el tiempo 0. En el ensayo MTT se incubaron las fibras en placas con 6 pocillos (1-6 fibras/pocillo) con 3 mL de medio completo precalentado (37°C) que contenía MTT (1 mg/mL) (Sigma) durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Se aspiró la solución de MTT y se lavaron las fibras con 2 mL de solución salina que contenía sulfato de protamina al 2,5%, y se mantuvieron las fibras a 4°C durante un mínimo de 2 horas. A continuación, se retiraron las fibras del sulfato de protamina, se limpiaron individualmente, se colocaron en placas de 24 pocillos (1 fibra/pocillo), se cortaron por la mitad y se secaron durante la noche en una campana de bioseguridad. Para extraer el formazan, se añadió DMSO (0,25 mL) a cada pocillo y se giraron las placas durante 4 horas a temperatura ambiente. Se transfirieron las muestras extraídas a placas con 96 pocillos y se determinó la OD a 540 nm. Se evaluaron las capacidades citostática y citocidal de los compuestos de ensayo a partir de estas medidas espectrofotométricas.

Tras la implantación de las fibras huecas, se trataron los ratones con uno de los compuestos, tal como se relaciona en la Tablas 1 y 2 comenzando el día 3 ó 4 tras la implantación de la fibra, y continuando una vez al día durante un total de 4 dosis. Se evaluó cada compuesto tanto mediante inyección intraperitoneal (Ejemplo 1) como mediante administración oral (Ejemplo 2) a 2 niveles de dosis con 3 ratones/dosis/experimento. Los controles del vehículo estuvieron constituidos por 6 ratones que recibieron únicamente el compuesto diluyente. Se recogieron las fibras de los ratones en el día siguiente al tratamiento con el cuarto compuesto y se sometieron a un ensayo MTT de punto final estable. Se determinó la densidad óptica de cada muestra espectrofotométricamente a 540 nm, y se calculó la media de cada grupo de tratamiento. Se determinó el porcentaje neto de crecimiento celular en cada grupo de tratamiento y se comparó con el porcentaje neto de crecimiento celular en los controles tratados del vehículo.

En el contexto de los siguientes ejemplos, se seleccionaron los compuestos para ensayo adicional (por ejemplo, estudios de exposición tiempo/dosis, estudios farmacológicos preliminares, estudios de eficacia del injerto heterólogo subcutáneo) en función de diversos criterios de ensayo de fibra hueca, que incluyen (1) una reducción en el crecimiento celular neto del 50% o mayor en 10 de las 48 posibles combinaciones de ensayo; (2) una reducción en el crecimiento celular neto del 50% o mayor en un mínimo de 4 de las 24 combinaciones de emplazamientos distante (puntuación SC); y/o (3) muerte celular de una o más líneas de células en cualquier emplazamiento de implante (reducción en la masa de células viable por debajo del nivel presente al comienzo del experimento).

Para simplificar la evaluación, se adoptó un sistema de puntuación que permitió la revisión rápida de la actividad de un compuesto dado. Para esto, se asignó un valor de 2 por cada dosis de compuesto que dio como resultado una reducción del 50% o mayor en la masa de células viables. Las muestras intraperitoneales (IP) y subcutáneas (SC) se puntuaron de manera separada de tal manera que los criterios (1) y (2) se evaluaran de manera independiente.

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra la actividad *in vivo* de los compuestos de la presente invención, en comparación con un derivado de geldanamicina de similar estructura.

Se llevó a cabo un ensayo de fibra hueca con los Compuestos A-C, tal como se ha descrito anteriormente. Se mezclaron los Compuestos A y B con solución salina y tween 80 (0,05%) para obtener dos niveles de dosis de 75 mg/kg/dosis y 50 mg/kg/dosis, de manera respectiva. Se mezcló también el Compuesto C con solución salina y tween 80 (0,05%) para obtener dos niveles de dosis de 20 mg/kg/dosis y 13,4 mg/kg/dosis, de manera respectiva. Se determinaron los niveles de dosificación óptimos a partir de los estudios de toxicidad previa, y por tanto, las dosificaciones usadas representan el intervalo superior que se puede administrar a un huésped sin inducir efectos tóxicos. Se administraron los tres compuestos una vez al día durante cuatro días mediante inyección intraperitoneal. Tras cuatro días, se retiraron las fibras huecas de los ratones y se les sometió al ensayo MTT tal como se ha descrito anteriormente. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento celular $[(1-(\% \text{ de crecimiento neto tratado} / \% \text{ crecimiento neto del control})) * 100]$ y se asignó una puntuación HFA a cada compuesto en función de este cálculo, tal como se indica en la Tabla 1.

TABLA 1

Compuesto	Ruta de Administración	Dosis / Unidades (mg/kg/dosis)	Puntuación IP	Puntuación SC	Puntuación HFA Total
A	IP	75	20	10	30
	IP	50			
B	IP	75	24	18	42
	IP	50			
C	IP	20	14	2	16
	IP	13,4			

ES 2 268 068 T3

Tal como se indica por los resultados, los compuestos de la presente invención (por ejemplo, los Compuestos A y B) pueden producir puntuaciones HFA significativamente mayores y, de esta manera, actividad anticancerosa *in vivo* significativamente mayor, que un compuesto, que un compuesto que no es de la presente invención (por ejemplo, Compuesto C).

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la actividad oral *in vivo* de un compuesto de la presente invención.

Se llevó a cabo un ensayo de fibra hueca con el Compuesto B de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente. Se mezcló el Compuesto B con agua para obtener dos niveles de dosificación de 75 mg/kg/dosis y 50 mg/kg/dosis, de manera respectiva. A continuación se administró el Compuesto B por vía oral (PO) una vez al día durante cuatro días. Tras cuatro días, se retiraron las fibras huecas de los ratones y se sometieron al ensayo MTT tal como se ha descrito anteriormente. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento celular $[(1-(\% \text{ crecimiento neto tratado}/\% \text{ crecimiento neto del control})) * 100]$ y se asignó una puntuación HFA a cada compuesto en función de este cálculo, tal como se indica en la Tabla 2

TABLA 2

Compuesto	Ruta de Administración	Dosis / Unidades (mg/kg/dosis)	Puntuación IP	Puntuación SC	Puntuación HFA Total
B	PO	75	10	10	20
	PO	50			

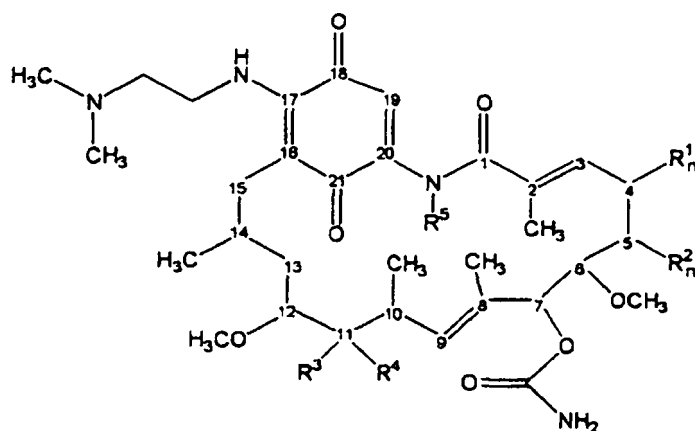
Basándose en los resultados indicados anteriormente, el Compuesto B de la presente invención presentó una significativa actividad anticancerosa *in vivo* mediante la administración oral.

Todas las referencias citadas en el presente documento, entre las que se incluyen patentes, solicitudes de patente, y publicaciones, se incorporan por la presente en su totalidad como referencia.

Aunque se ha descrito esta invención con énfasis hacia las formas de realización preferidas, se pueden usar variaciones de las formas de realización preferidas, y se pretende que se puede practicar la invención de otras maneras que las descritas de manera específica en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de geldanamicina que tiene la estructura:

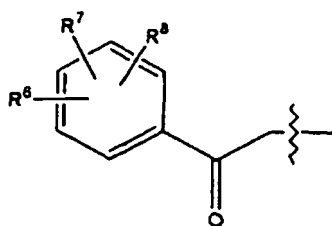


en la que $n = 0$ ó 1 y en la que, cuando $n = 1$, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, y, cuando $n = 0$, existe un doble enlace entre C_4 y C_5 ;

R^3 es hidrógeno o hidroxilo;

R^4 es hidrógeno o hidroxilo; en el que, cuando R^3 es hidrógeno, R^4 es hidroxilo, y cuando R^3 es hidroxilo, R^4 es hidrógeno; y

R^5 es hidrógeno o un grupo de fórmula

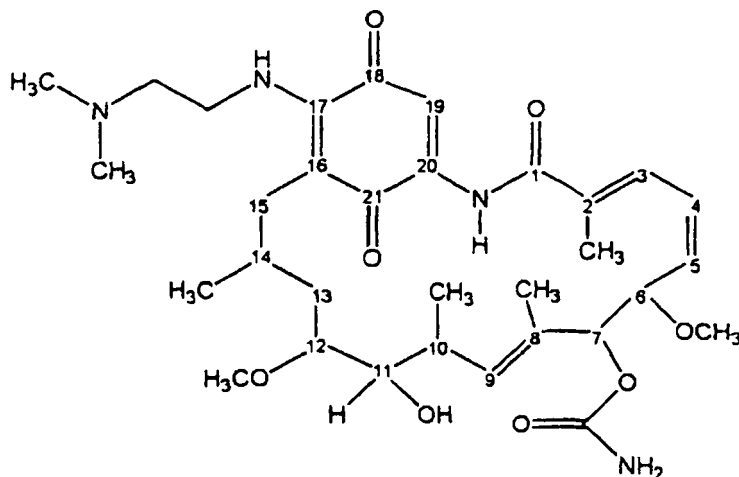


en la que cada uno de R^6 , R^7 , y R^8 se selecciona de manera independiente entre el grupo constituido por hidrógeno, halo, azido, nitro, un alquilo C_1 - C_8 , un alcoxilo C_1 - C_8 , arilo y ciano,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que $n = 0$

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el compuesto tiene la estructura



ES 2 268 068 T3

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. El uso de un compuesto de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el compuesto es para administrarse por vía oral.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el compuesto es para administrarse por vía intravenosa.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el huésped es un mamífero.

10. El uso de acuerdo en la reivindicación 9, en el que el mamífero es un ser humano.

11. El uso de un compuesto de la reivindicación 3 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto es para administrarse por vía oral.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto es para administrarse por vía intravenosa.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el huésped es un mamífero.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el mamífero es un ser humano.