



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 544**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07D 471/10 (2006.01) **C07D 239/42** (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01) **C07D 295/14** (2006.01)
C07D 307/68 (2006.01) **C07D 217/02** (2006.01)
C07D 207/09 (2006.01) **C07D 401/12** (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03711981 .5**

96 Fecha de presentación : **11.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1485099**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54 Título: **Inhibidores de histona-desacetilasas.**

30 Prioridad: **13.03.2002 US 363799 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2010

73 Titular/es: **Janssen Pharmaceutica N.V.**
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es: **Van Emelen, Kristof;**
Verdonck, Marc Gustaaf Celine;
Van Brandt, Sven Franciscus Anna;
Angibaud, Patrick Rene;
Meerpoel, Lieven y
Dyatkin, Alexey Borisovich

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 347 544 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de histona-desacetilasas.

5 Esta invención concierne a compuestos que tienen actividad enzimática inhibidora de histona-desacetilasas (HDAC). La misma se refiere adicionalmente a procesos para su preparación, a composiciones que comprenden los mismos, así como su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, para inhibir HDAC y como medicamento, por ejemplo como medicamento para inhibir condiciones proliferativas, tales como cáncer y psoriasis.

10 En todas las células eucariotas, el DNA genómico en la cromatina está asociada con histonas para formar nucleosoma. Cada nucleosoma consiste en un octámero proteínico constituido por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El DNA está enrollado alrededor de este núcleo proteínico, interaccionando los aminoácidos básicos de las histonas con los grupos fosfato del DNA cargados negativamente. La modificación más común posterior a la traducción de estas histonas del núcleo es la acetilación reversible de los grupos ϵ -amino de residuos lisina N-terminales fuertemente básicos conservados. El estado estacionario de la acetilación de las histonas se establece por el equilibrio dinámico entre la o las histona-acetiltransferasas y la o las histona-desacetilasas competidoras a las que se hace referencia en esta memoria como "HDAC". La acetilación y desacetilación de las histonas ha estado ligada desde hace mucho tiempo al control de la transcripción. La clonación reciente de los genes que codifican diferentes histona-acetiltransferasas e histona-desacetilasas ha proporcionado una posible explicación para la relación entre la acetilación de las histonas y el control de la transcripción. La acetilación reversible de las histonas puede dar como resultado remodelación de la cromatina y como tal actuar como mecanismo de control para la transcripción génica. En general, la hiperacetilación de las histonas facilita la expresión génica, mientras que la desacetilación de las histonas está correlacionada con la represión de la transcripción. Se ha demostrado que las histona-acetiltransferasas actúan como coactivadores de la transcripción, habiéndose encontrado en cambio que las histona-desacetilasas pertenecen a caminos de represión de la transcripción.

25 El equilibrio dinámico entre la acetilación y desacetilación de las histonas es esencial para el crecimiento normal de la célula. La inhibición de las histona-desacetilasas da como resultado parada del ciclo celular, diferenciación celular, apoptosis e inversión del fenotipo transformado. Por consiguiente, los inhibidores de HDAC pueden tener gran potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades o afecciones celulares proliferativas (Marks *et al.*, Nature Reviews: Cancer 1: 194-202, 2001).

30 El estudio de los inhibidores de histona-desacetilasas (HDAC) indica que de hecho estas enzimas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular. El inhibidor Tricostatina A (TSA) causa detención del ciclo celular en ambas fases G1 y G2, invierte el fenotipo transformado de diferentes líneas de células, e induce diferenciación de las células de la leucemia de Friend y otras. Se ha comunicado que TSA (y el ácido suberoilánilida-hidroxiámico, SAHA) inhiben el crecimiento celular, inducen diferenciación terminal, y previenen la formación de tumores en los ratones (Finnin *et al.*, Nature, 401: 188-193, 1999).

40 Se ha comunicado también que la tricostatina A es útil en el tratamiento de las fibrosis, v.g. fibrosis hepática y cirrosis hepática (Geerts *et al.*, Solicitud de Patente Europea EP 0827742, publicada el 11 de marzo de 1998).

45 La Solicitud de Patente WO 01/38322 publicada el 31 de mayo de 2001 describe entre otras cosas inhibidores de histona-desacetilasas de fórmula general $Cy-L^1-Ar-Y^1-C(O)-NH-Z$, proporcionando composiciones y métodos para tratamiento de enfermedades y afecciones celulares proliferativas.

50 La Solicitud de Patente WO 01/70675 publicada el 27 de septiembre de 2001 describe inhibidores de histona-desacetilasa de fórmula $Cy-X-Y^1-W$ y $Cy-S(O)_2-NH-Y^3-W$, y proporciona además composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones celulares proliferativas.

55 El problema a resolver estriba en proporcionar inhibidores de histona-desacetilasa, con actividad enzimática alta y que exhiben además propiedades ventajosas tales como actividad celular y biodisponibilidad incrementada, preferiblemente biodisponibilidad oral, y tienen pocos o ningún efecto secundario.

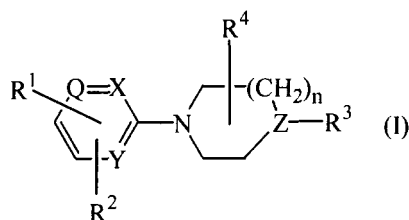
Los nuevos compuestos de la invención resuelven el problema arriba descrito. Los compuestos difieren de la técnica anterior en estructura.

60 Los compuestos de la presente invención exhiben una actividad enzimática excelente inhibidora de histona-desacetilasas *in vitro*. Los presentes compuestos tienen propiedades ventajosas en lo que respecta a actividad celular y propiedades específicas en lo que respecta a la inhibición de la progresión del ciclo celular en ambos puntos de control G1 y G2 (capacidad de inducción de p21). Los compuestos de la presente invención exhiben estabilidad metabólica satisfactoria y biodisponibilidad alta, y más particularmente exhiben biodisponibilidad oral.

65

ES 2 347 544 T3

La invención concierne a compuestos de fórmula (I)



15 las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isómeras de los mismos, en donde

n es 0, 1, 2, ó 3 y cuando n es cero se sobreentiende entonces un enlace directo;

20 cada Q es nitrógeno o $\text{—C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{=}$;

25 cada X es nitrógeno o $\text{—C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{=}$;

30 cada Y es nitrógeno o $\text{—C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{=}$;

35 cada Z es nitrógeno o $\text{—CH} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{—}$;

R^1 es —C(O)NH(OH) o —NHC(O)C_{1-6} alcanodiilSH;

R^2 es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometilo, di(C_{1-6} alquil)amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo;

R^3 es C_{1-6} alquilo, aril C_{2-6} alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C_{1-6} alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C_{1-6} alquil)aminosulfonilamino C_{1-6} alquilo, di(C_{1-6} alquil)amino C_{1-6} alquilo, C_{1-12} alquilsulfonilo, di(C_{1-6} alquil)aminosulfonilo, trihalo C_{1-6} alquilsulfonilo, di(aril) C_{1-6} alquilcarbonilo, tiofenil C_{1-6} alquilcarbonilo, piridinilcarbonilo o aril C_{1-6} alquilcarbonilo;

R^4 es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilo C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi, aril C_{1-6} alquilo, aminocarbonilo, hidroxycarbonilo, amino C_{1-6} alquilo, aminocarbonil C_{1-6} alquilo, hidroxycarbonil C_{1-6} alquilo, hidroxiaminocarbonilo, C_{1-6} alquiloxicarbonilo, C_{1-6} alquilamino C_{1-6} alquilo o di(C_{1-6} alquil)amino C_{1-6} alquilo;

cuando R^3 y R^4 están presentes en el mismo átomo de carbono, R^3 y R^4 pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula



55 en donde R^{10} es arilo;

cuando R^3 y R^4 están presentes en átomos de carbono adyacentes, R^3 y R^4 pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula



arilo en lo que antecede es fenilo, o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionado cada uno independientemente de halo, C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometilo, ciano o hidroxycarbonilo.

65 El término “inhibidor de histona-desacetilasas” o “inhibidor de histona-desacetilasa” se utiliza para identificar un compuesto, que es capaz de interactuar con una histona-desacetilasa e inhibir su actividad, más particularmente su actividad enzimática. La inhibición de la actividad enzimática de histona-desacetilasa significa una reducción de la

capacidad de una histona-desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. Preferiblemente, dicha inhibición es específica, es decir, el inhibidor de histona-desacetilasa reduce la capacidad de una histona-desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona a una concentración que es menor que la concentración del inhibidor que se requiere para producir cualquier otro efecto biológico no afín.

5 Como se utiliza en las definiciones anteriores y en lo sucesivo, halo es genérico para fluoro, cloro, bromo, y yodo; C₁₋₄alquilo define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono tales como, v.g. metilo, etilo, propilo, butilo, 1-metiletilo, 2-metilpropilo y análogos; C₁₋₆alquilo incluye C₁₋₄alquilo y los homólogos superiores de los mismos que tienen 5 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, pentilo, 2-metilbutilo, hexilo, 2-metilpentilo y análogos; C₁₋₆alcanodihílo define radicales hidrocarbonados saturados bivalentes de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, metileno, 1,2-etanodihílo, 1,3-propanodihílo, 1,4-butanodihílo, 1,5-pentanodihílo, 1,6-hexanodihílo y los isómeros ramificados de los mismos tales como 2-metilpentanodihílo, 3-metilpentanodihílo, 2,2-dimetilbutanodihílo, 2,3-dimetilbutanodihílo y análogos; trihaloC₁₋₆alquilo define C₁₋₆alquilo que contiene tres sustituyentes halo idénticos o diferentes, por ejemplo trifluorometilo; C₂₋₆alcanodihílo define radicales hidrocarbonados bivalentes de cadena lineal y ramificada que contienen un enlace doble y que tienen de 2 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, etilenodihílo, 2-propenodihílo, 3-butenodihílo, 2-pentenodihílo, 3-pentenodihílo, 3-metil-2-butenodihílo, y análogos; y aminoarilo define arilo sustituido con amino.

20 Sales de adición farmacéuticamente aceptables abarcan sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Debe entenderse que las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables mencionadas anteriormente en esta memoria comprenden las formas de sal de adición de ácido terapéuticamente activas y no tóxicas, que pueden formar los compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades básicas pueden convertirse en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables por tratamiento de dicha forma de base con un ácido apropiado. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, v.g. ácido clorhídrico o bromhídrico; ácido sulfúrico; nítrico, fosfórico y los ácidos afines; o ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, los ácidos acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiaacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclamico, salicílico, *p*-amino-salicílico, pamoico y los ácidos afines.

30 Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades ácidas pueden convertirse en sus sales de adición de base farmacéuticamente aceptables por tratamiento de dicha forma ácida con una base orgánica o inorgánica adecuada. Formas de sales apropiadas con bases comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metal alcalino y alcalinotérreo, v.g. las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y análogos, sales con bases orgánicas, v.g. las sales de benzatina, *N*-metil-D-glucamina, sales de hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y análogos.

40 El término “sales de adición de ácido o base” comprende también los hidratos y las formas de adición de disolvente que pueden formar los compuestos de fórmula (I). Ejemplos de dichas formas son v.g. hidratos, alcoholatos y análogos.

45 El término “formas estereoquímicamente isómeras de compuestos de fórmula (I)”, como se utiliza en esta memoria, define todos los compuestos posibles constituidos por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales deferentes, que no son intercambiables, que pueden poseer los compuestos de fórmula (I). A no ser que se mencione o indique otra cosa, la designación química de un compuesto abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isómeras posibles que podría poseer dicho compuesto. Dicha mezcla puede contener todos los diastereoisómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos de fórmula (I), tanto en forma pura como mezclados unos con otros deben entenderse abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

50 Debe entenderse que las formas de *N*-óxido de los compuestos de fórmula (I) comprenden aquellos compuestos de fórmula (I) en donde uno o varios átomos de nitrógeno están oxidados para formar el denominado *N*-óxido, particularmente aquellos *N*-óxidos en los cuales uno o más de los nitrógenos de piperidina, piperazina o piridazinilo están oxidados en *N*.

55 Algunos de los compuestos de fórmula (I) pueden existir también en sus formas tautómeras. Dichas formas, aunque no se indican explícitamente en la fórmula anterior, deben entenderse incluidas dentro del alcance de la presente invención.

60 Siempre que se utilice en lo sucesivo, debe entenderse que el término “compuestos de fórmula (I)” incluye también las sales de adición farmacéuticamente aceptables y todas las formas estereoisómeras.

65 Como se utilizan en esta memoria, debe entenderse que los términos “histona-desacetilasas” y “HDAC” se refieren a una cualquiera de una familia de enzimas que eliminan grupos acetilo de los grupos ϵ -amino de residuos lisina en el término N de una histona. A no ser que se indique otra cosa por el contexto, debe entenderse que el término “histona” se refiere a cualquier proteína histona, con inclusión de H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquier especie. Proteínas o productos génicos de HDAC humanos, incluyen, pero sin carácter limitante, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9 y HDAC-10. La histona-desacetilasa puede derivarse también de una fuente protozoaria o fúngica.

ES 2 347 544 T3

Un primer grupo de compuestos interesantes está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en los cuales se aplican una o más de las restricciones siguientes:

- 5
- a) n es 0 ó 1
- b) cada Q es $\text{---C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$;
- 10
- c) R¹ es -C(O)NH(OH) o -NHC(O)C₁₋₆alcanodiilSH;
- d) R² es hidrógeno o nitro;
- 15
- e) R³ es C₁₋₆alquilo, arilC₂₋₆alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilaminoC₁₋₆alquilo, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilo, trihaloC₁₋₆alquilsulfonilo, di(aril)C₁₋₆alquilcarbonilo, tiofenilC₁₋₆alquilcarbonilo, piridinilcarbonilo o arilC₁₋₆alquilcarbonilo;
- 20
- f) R⁴ es hidrógeno;
- g) cuando R³ y R⁴ están presentes en el mismo átomo de carbono, R³ y R⁴ pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula (a-1) donde R¹⁰ es arilo;
- 25
- h) cuando R³ y R⁴ están presentes en átomos de carbono adyacentes, R³ y R⁴ pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula (b-1).

Un segundo grupo de compuestos interesantes está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en los cuales se aplican una o más de las restricciones siguientes:

- 30
- a) n es 1;
- b) cada Q es $\text{---C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$;
- 35
- c) cada Z es nitrógeno;
- d) R¹ es -C(O)NH(OH);
- 40
- e) R² es hidrógeno;
- f) R³ es naftalenilcarbonilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo o di(aril)C₁₋₆alquilcarbonilo;
- 45
- g) R⁴ es hidrógeno.

Un tercer grupo de compuestos interesantes está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en donde R² es hidrógeno.

- 50
- Un cuarto grupo de compuestos interesantes está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en donde R¹ es -C(O)NH(OH).

- 55
- Un quinto grupo de compuestos interesantes está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en donde R² es hidrógeno y R¹ es -C(O)NH(OH).

Un sexto grupo de compuestos de interés está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en los cuales se aplican una o más de las restricciones siguientes;

- 60
- a) R¹ es -C(O)NH(OH), -NHC(O)C₁₋₆alcanodiilSH;
- b) R² es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxi, trifluorometilo o di(C₁₋₆alquil)amino;
- 65
- c) R³ es C₁₋₆alquilo, arilC₂₋₆alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilo o piridinilcarbonilo;

ES 2 347 544 T3

d) R⁴ es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxi, arilC₁₋₆alquilo, aminocarbonilo, aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilaminoC₁₋₆alquilo o di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo.

5 Un grupo de compuestos preferidos está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en donde

R¹ es -C(O)NHOH o -NHC(O)C₁₋₆alcanodiilSH;

R² es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxi, trifluorometilo o di(C₁₋₆alquil)amino;

10 R³ es C₁₋₆alquilo, arilC₂₋₆alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilo o piridinilcarbonilo; y

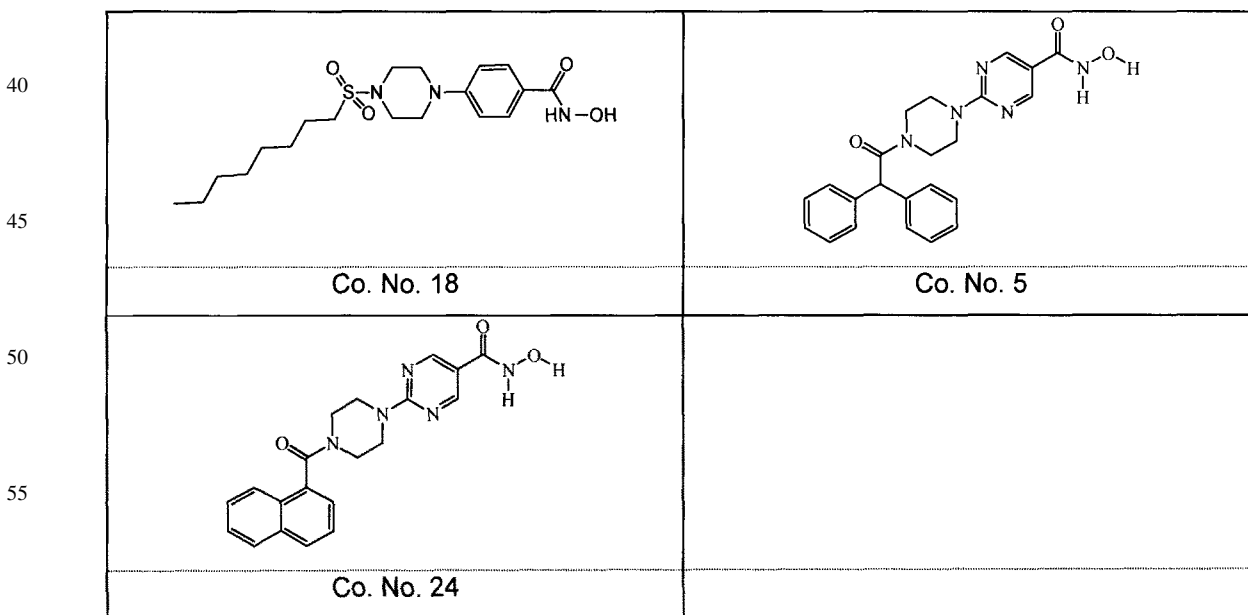
15 R⁴ es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxi, arilC₁₋₆alquilo, aminocarbonilo, aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilaminoC₁₋₆alquilo o di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo.

20 Un grupo adicional de compuestos preferidos está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en donde

n es 0 ó 1; cada Q $\text{---C}\begin{matrix} \text{=O} \\ \text{<=} \end{matrix}$; es; R¹ es -C(O)NH(OH) o -NHC(O)C₁₋₆alcanodiilSH; R² es hidrógeno o nitro; R³ es C₁₋₆alquilo, arilC₂₋₆alquenodifilo; furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilaminoC₁₋₆alquilo, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilo, trihaloC₁₋₆alquilsulfonilo, di(aril)C₁₋₆alquilcarbonilo, tiofenilC₁₋₆alquilcarbonilo, piridinilcarbonilo o arilC₁₋₆alquilcarbonilo; R⁴ es hidrógeno; cuando R³ y R⁴ están presentes en el mismo átomo de carbono, R³ y R⁴ pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula (a-1) en donde R¹⁰ es arilo; o cuando R³ y R⁴ están presentes en átomos de carbono adyacentes, R³ y R⁴ pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula (b-1).

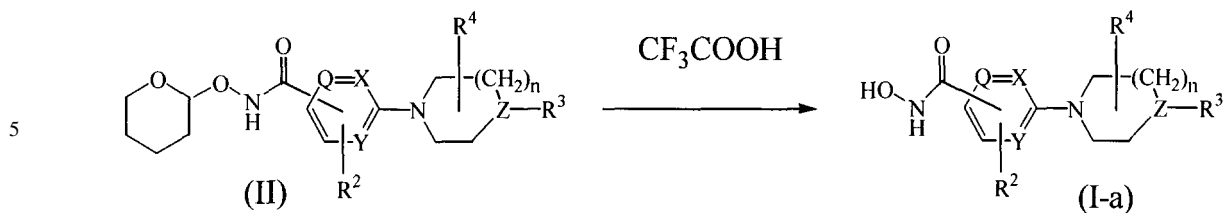
30 Un grupo de compuestos más preferidos está constituido por aquellos compuestos de fórmula (I) en donde n es 1; cada Q es $\text{---C}\begin{matrix} \text{=O} \\ \text{<=} \end{matrix}$, cada Z es nitrógeno; R¹ es -C(O)NH(OH); R² es hidrógeno; R³ es naftalenilcarbonilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo o di(aril)C₁₋₆alquilcarbonilo; Y R⁴ es hidrógeno.

35 Los compuestos más preferidos son los compuestos No. 18, No. 5 y No. 24. Co. No. 18 Co. No. 5 Co. No. 24

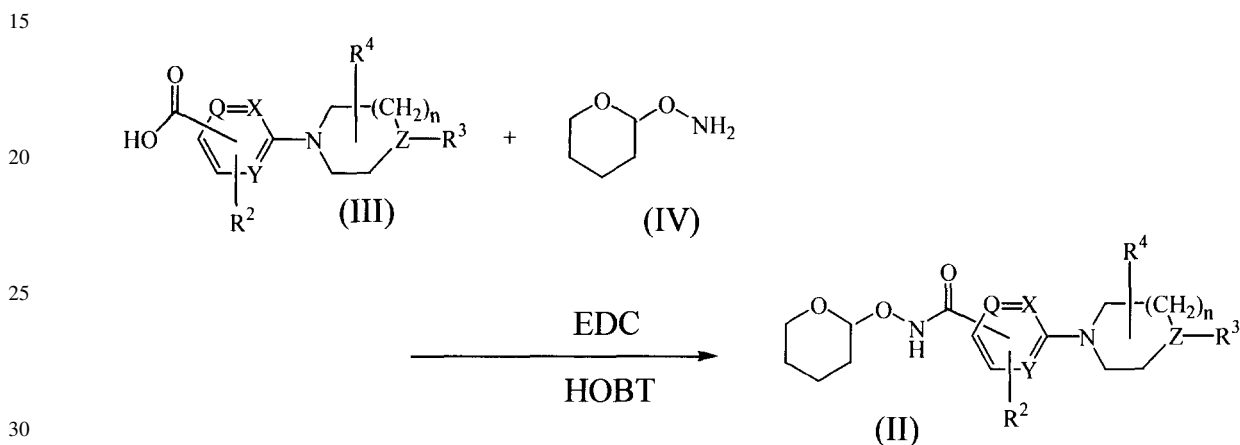


60 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales y N-óxidos farmacéuticamente aceptables y formas estereoquímicamente isómeras de los mismos se preparan de manera convencional. Se incluye como ejemplo una ruta de síntesis general:

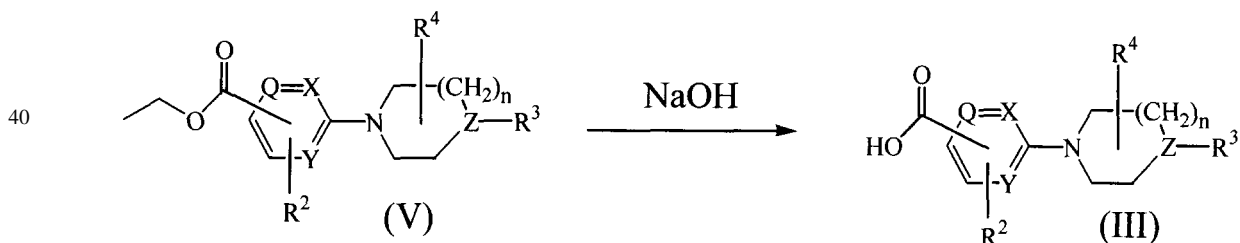
65 a) Los ácidos hidroxámicos de fórmula (I) en donde R¹ es -C(O)NH(OH), compuestos a los que se hace referencia como compuestos de fórmula (I-a), se pueden preparar por reacción de un compuesto intermedio de fórmula (II) con un ácido apropiado, tal como por ejemplo ácido trifluoroacético. Dicha reacción se lleva a cabo en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, metanol:



10 b) Los compuestos intermedios de fórmula (II) se pueden preparar por reacción de un compuesto intermedio de fórmula (III) con un compuesto intermedio de fórmula (IV) en presencia de reactivos apropiados tales como monohidrocloruro de *N*'-(etilcarbonimidiloil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina (EDC) y 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (HOBT). La reacción puede efectuarse en un disolvente adecuado tal como una mezcla de DCM y THF:



25 c) Los compuestos intermedios de fórmula (III) se pueden preparar por reacción de un compuesto intermedio de fórmula (V) con una base apropiada tal como NaOH en presencia de un disolvente adecuado tal como etanol:



45 Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar también convenientemente utilizando técnicas de síntesis en fase sólida. En general, la síntesis en fase sólida implica hacer reaccionar un compuesto intermedio en una síntesis con un soporte polímero. Este compuesto intermedio soportado por polímero puede llevarse luego adelante pasando por varios pasos de síntesis. Después de cada paso, la filtración de la resina y el lavado de la misma varias veces con diversos disolventes eliminan las impurezas. En cada paso, la resina puede dividirse para reaccionar con diversos compuestos intermedios en el paso siguiente, permitiendo así la síntesis de un gran número de compuestos. Después del último paso en el procedimiento, la resina se trata con un reactivo o proceso para escindir la resina de la muestra. Explicación más detallada de las técnicas utilizadas en química de fase sólida se describe, por ejemplo, en "The Combinatorial Index" (B. Bunin, Academic Press) y NovaBiochem's 1999 Catalogue & Peptide Synthesis Handbook (NovaBiochem AG, Suiza) los dos cuales se incorporan en esta memoria por referencia.

50 Los compuestos de fórmula (I) y algunos de los compuestos intermedios pueden tener al menos un centro estereogénico en su estructura. Este centro estereogénico puede estar presente en configuración R o en configuración S.

55 Los compuestos de fórmula (I) tal como se preparan en los procesos descritos anteriormente en esta memoria son generalmente mezclas racémicas de enantiómeros, que se pueden separar unos de otros siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) se pueden convertir en las formas de sal diastereoméricas correspondientes por reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas diastereoméricas de sal se separan subsiguientemente, por ejemplo, por cristalización selectiva o fraccionada, y los enantiómeros se liberan de las mismas por medio de álcali. Una manera de separar las formas enantiómeras de los compuestos de fórmula (I) implica cromatografía líquida utilizando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente

isómeras puras pueden derivarse también de las formas estereoquímicamente isómeras puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, con tal que la reacción transcurra estereoespecíficamente. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizaría por métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

5

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las formas estereoisómeras de los mismos tienen propiedades farmacológicas valiosas en el sentido de que tienen un efecto inhibidor de la histona-desacetilasa (HDAC).

10 Esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento anormal de las células, con inclusión de células transformadas, por administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. El crecimiento anormal de células hace referencia a crecimiento celular independiente de los mecanismos reguladores normales (v.g. pérdida de la inhibición de contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento de tumores tanto directamente por causar detención del crecimiento, diferenciación terminal y/o apoptosis de células de cáncer, e indirectamente, por inhibición de la neovascularización de tumores.

15

Esta invención proporciona también un método para inhibir el crecimiento de tumores por administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un individuo, v.g. un mamífero (y más particularmente un humano) que precisa de dicho tratamiento. En particular, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumores por la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención. Ejemplos de tumores que pueden ser inhibidos, pero sin carácter limitante, son cáncer de pulmón (v.g. adenocarcinoma y con inclusión del cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de páncreas (v.g. carcinoma pancreático tal como, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino), cánceres de colon (v.g. carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer de próstata con inclusión de la enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide (v.g. leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo leucemia mielógena aguda (AML)), cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimático (v.g. fibrosarcomas y rabdomiosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (v.g. queratoacantomas), carcinoma de mama (v.g. cáncer de mama avanzado), carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico.

20

25

30

El compuesto de acuerdo con la invención puede utilizarse para otros propósitos terapéuticos, por ejemplo:

- a) la sensibilización de los tumores a la radioterapia por administración del compuesto de acuerdo con la invención antes, durante o después de la irradiación del tumor para tratamiento del cáncer;
- b) tratamiento de artropatías y afecciones osteopatológicas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, gota, poliartritis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y lupus eritematoso sistémico;
- c) inhibición de la proliferación de las células de la musculatura lisa con inclusión de trastornos vasculares proliferativos, aterosclerosis y restenosis;
- d) tratamiento de afecciones inflamatorias y afecciones dérmicas tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad de rechazo inverso, conjuntivitis, asma, ARDS, enfermedad de Behcets, rechazo de trasplantes, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, escleroderma, exantema, eccema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística y bronquitis crónica;
- e) tratamiento de endometriosis, fibroides uterinos, hemorragia uterina disfuncional e hiperplasia endometrial;
- f) tratamiento de la vascularización ocular con inclusión de vasculopatía que afecta a los vasos retinales y coroides;
- g) tratamiento de una disfunción cardíaca;
- h) inhibición de afecciones inmunosupresoras tales como el tratamiento de infecciones por HIV;
- i) tratamiento de la disfunción renal;
- j) supresión de trastornos endocrinos;
- k) inhibición de la disfunción de gluconeogénesis;
- l) tratamiento de una neuropatología, por ejemplo enfermedad de Parkinson o una neuropatología que da como resultado un trastorno cognitivo, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o enfermedades neuronales relacionadas con poliglutaminas;
- m) inhibición de una patología neuromuscular, por ejemplo, esclerosis amiotrófica lateral;

60

65

- n) tratamiento de la atrofia espinal muscular;
- o) tratamiento de otras afecciones patológicas susceptibles de tratamiento por potenciación de la expresión de un gen;
- 5 p) mejora de la terapia génica.

Por consiguiente, la presente invención describe los compuestos de fórmula (I) para uso como medicamento así como el uso de estos compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratamiento de una o más de las afecciones arriba mencionadas.

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y formas estereoisómeras de los mismos pueden tener propiedades diagnósticas valiosas en el sentido de que pueden utilizarse para detectar o identificar una HDAC en una muestra biológica que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto marcado y una HDAC.

Los métodos de detección o identificación pueden utilizar compuestos que están marcados con agentes marcadores tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Ejemplos de los radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas se hacen detectables usualmente por conjugación de un sustrato apropiado que, a su vez, cataliza una reacción detectable. Ejemplos de las mismas incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato-deshidrogenasa, preferiblemente peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, equorina y luciferasa.

Las muestras biológicas pueden definirse como tejido corporal o fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales son fluido cerebroespinal, sangre, plasma, suero, orina, esputos, saliva y análogos. Teniendo en cuenta sus útiles propiedades farmacológicas, los presentes compuestos pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para propósitos de administración.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto particular, en forma de sal de adición de base o de ácido, como el ingrediente activo, se combina en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede tomar una gran diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, preferiblemente, para administración por vías oral, rectal, percutánea, o por inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y análogos en el caso de preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglomerantes, agentes de desintegración y análogos en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas.

Debido a su facilidad de administración, tabletas y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá usualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros ingredientes, a fin de favorecer la solubilidad, por ejemplo. Pueden prepararse por ejemplo soluciones inyectables, en las cuales el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa, o una mezcla de solución salina y solución de glucosa. Pueden prepararse también suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos, agentes de suspensión y análogos apropiados. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en menores proporciones, aditivos que no causan un efecto deletéreo significativo a la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de diversas maneras, v.g., como un parche transdérmico, como un toque o como un ungüento.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas arriba mencionadas en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosis unitaria son tabletas (con inclusión de tabletas ranuradas o recubiertas), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, pastillas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharadas de té, cucharadas de mesa y análogas, y múltiplos segregados de las mismas.

Los expertos en la técnica podrían determinar fácilmente la cantidad eficaz a partir de los resultados de tests presentados más adelante en esta memoria. En general, se contempla que una cantidad terapéuticamente eficaz podría ser de 0,05 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, y en particular de 0,05 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida en forma de dos, tres, cuatro o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas sub-dosis pueden formularse como formas de dosificación unitaria, por ejemplo, que contienen 5 a 500 mg, y en particular 10 mg a 500 mg de ingrediente activo por forma unitaria de dosificación.

ES 2 347 544 T3

Como otro aspecto de la presente invención, se contempla una combinación de un inhibidor de HDAC con otro agente anticáncer, especialmente para uso como medicamento, más específicamente en el tratamiento de cáncer o enfermedades afines.

5 Para el tratamiento de las afecciones anteriores, los compuestos de la invención pueden emplearse ventajosamente en combinación con uno o más agentes medicinales distintos, más particularmente, con otros agentes anticáncer. Ejemplos de agentes anticáncer son:

- 10 - compuestos de coordinación de platino, por ejemplo cisplatino, carboplatino u oxaliplatino;
- compuestos de taxano, por ejemplo paclitaxel o docetaxel;
- inhibidores de la topoisomerasa I tales como compuestos de camptotecina, por ejemplo irinotecán o topotecán;
- 15 - inhibidores de la topoisomerasa II tales como derivados antitumorales de podofilotoxina, por ejemplo etoposido o teniposido;
- alcaloides antitumorales de la vinca, por ejemplo vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- 20 - derivados antitumorales nucleosídicos, por ejemplo 5-fluorouracilo, gemcitabina, o capecitabina;
- agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas o nitrosourea, por ejemplo ciclofosfamida, clorambucil, carmustina o lomustina;
- 25 - derivados antitumorales de antraciclina, por ejemplo daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina o mitoxantona;
- anticuerpos HER2, por ejemplo trastuzumab;
- 30 - antagonistas de los receptores de estrógenos o moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;
- inhibidores de las aromatasas tales como exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol;
- 35 - agentes de diferenciación tales como retinoides, vitamina D y agentes bloqueantes del metabolismo del ácido retinoico (RAMBA), por ejemplo accutano;
- inhibidores de la DNA-metiltransferasa, por ejemplo azacitidina;
- 40 - inhibidores de quinasas, por ejemplo flavoperidol, imatinib-mesilato o gefitinib;
- inhibidores de la farnesiltransferasa; u
- otros inhibidores de HDAC.

45

El término “compuesto de coordinación de platino” se utiliza en esta memoria para designar cualquier compuesto de coordinación de platino inhibidor del crecimiento de células tumorales que proporciona platino en forma de un ion.

50 El término “compuestos de taxano” indica una clase de compuestos que tiene el sistema de anillos del taxano y relacionado con o derivado de extractos de ciertas especies de árboles tejo (Taxus).

55 El término “inhibidores de topoisomerasas” se utiliza para indicar enzimas que son capaces de alterar la topología del DNA en células eucariotas. Las mismas son críticas para funciones celulares importantes y para la proliferación celular. Existen dos clases de topoisomerasas en las células eucariotas, a saber tipo I y tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monómera de peso molecular aproximado 100.000. La misma se fija al DNA e introduce una ruptura transitoria monocatenaria, desenrolla la doble hélice (o permite que se desenrolle la misma) y subsiguientemente sella de nuevo la rotura antes de disociarse de la cadena de DNA. La topoisomerasa II tiene un mecanismo de acción similar que implica la inducción de roturas de cadena del DNA o la formación de radicales libres.

60

El término “compuestos de camptotecina” se utiliza para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan del compuesto parental camptotecina que es un alcaloide insoluble en agua derivado del árbol chino Camptothecin acuminata y el árbol indio Nothapodytes foetida.

65 El término “compuestos de podofilotoxina” se utiliza para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan del parental podofilotoxina, que se extrae de la planta de la mandrágora.

ES 2 347 544 T3

El término “alcaloides antitumorales de la vinca” se utiliza para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan de extractos de la planta vinca pervinca (*Vinca rosea*).

5 El término “agentes alquilantes” abarca un grupo diverso de productos químicos que tienen la característica común de que poseen capacidad de aportar, en condiciones fisiológicas, grupos alquilo a macromoléculas biológicamente vitales tales como DNA. Con muchos de los agentes más importantes tales como las mostazas nitrogenadas y las nitrosoureas, los restos alquilantes activos se generan *in vivo* después de reacciones de degradación complejas, algunas de las cuales son enzimáticas. Las acciones farmacológicas más importantes de los agentes alquilantes son aquellas que perturban los mecanismos fundamentales relacionados con la proliferación celular, en particular la síntesis del DNA y la división celular. La capacidad de los agentes alquilantes para interferir con la función e integridad del DNA en los tejidos que proliferan rápidamente proporciona la base para sus aplicaciones terapéuticas y para muchas de sus propiedades tóxicas.

15 El término “derivados antitumorales de antraciclina” comprende antibióticos obtenidos del hongo *Strep. peiticus* var. *caesius* y sus derivados, caracterizados por tener una estructura de anillos de tetraciclina con un azúcar poco frecuente, daunosamina, unido por un enlace glicosídico.

20 La amplificación de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en los carcinomas de mama primarios se ha demostrado que está correlacionada con un pronóstico clínico malo para ciertos pacientes. Trastuzumab es un anticuerpo kappa IgG1 monoclonal humanizado derivado de DNA recombinante, altamente purificado, que se fija con afinidad y especificidad altas al dominio extracelular del receptor HER2.

25 Muchos cánceres de mama tienen receptores de estrógenos y el crecimiento de estos tumores puede ser estimulado por estrógenos. Los términos “antagonistas de los receptores de estrógenos” y “moduladores selectivos de los receptores de estrógenos” se utilizan para indicar inhibidores competitivos de estradiol que se fijan al receptor de estrógenos (ER). Los moduladores selectivos de receptor de estrógenos, cuando se fijan al ER, inducen un cambio en la forma tridimensional del receptor, inhibiendo su fijación al elemento sensible a los estrógenos (ERE) en el DNA.

30 En las mujeres post-menopáusicas, la fuente principal de estrógeno circulante procede de la conversión de andrógenos suprarrenales y ováricos (androstenediona y testosterona) en estrógenos (estrone y estradiol) por la enzima aromatasas en los tejidos periféricos. La privación de estrógenos por inhibición o desactivación de las aromatasas es un tratamiento eficaz y selectivo para algunas pacientes post-menopáusicas con cáncer de mama dependiente de hormonas.

35 El término “agente antiestrogénico” se utiliza en esta memoria para incluir no sólo antagonistas de los receptores de estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos, sino también inhibidores de aromatasas como se ha expuesto anteriormente.

40 El término “agentes de diferenciación” abarca compuestos que pueden, de diversas maneras, inhibir la proliferación celular e inducir diferenciación. Se sabe que la vitamina D y los retinoides juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una gran diversidad de tipos de células normales y malignas. Los agentes bloqueantes del metabolismo del ácido retinoico (RAMBA's) aumentan los niveles de ácidos retinoicos endógenos por inhibir el catabolismo de los ácidos retinoicos mediado por el citocromo P450.

45 Los cambios de metilación del DNA se encuentran entre las anomalías más comunes en la neoplasia humana. La hipermetilación dentro de los promotores de genes seleccionados está asociada usualmente con la desactivación de los genes implicados. El término “inhibidores de la DNA-metiltransferasa” se utiliza para indicar compuestos que actúan por inhibición farmacológica de la DNA-metiltransferasa y reactivación de la expresión de genes supresores de tumores.

50 El término “inhibidores de quinasas” comprende inhibidores potentes de quinasas que están implicados en la progresión del ciclo celular y la muerte celular programada (apoptosis).

55 El término “inhibidores de farnesiltransferasa” se utiliza para indicar compuestos que se diseñaron para impedir la farnesilación de Ras y otras proteínas intracelulares. Se ha demostrado que los mismos tienen efecto sobre la proliferación y supervivencia de células malignas.

El término “otros inhibidores de HDAC” comprende, pero sin carácter limitante:

- 60 - ácidos grasos de cadena corta, por ejemplo butirato, 4-fenilbutirato o ácido valproico;
- ácidos hidroxámicos, por ejemplo el ácido suberoilánilida-hidroxámico (SAHA), biaril-hidroamato A-161906, aril-N-hidroxicarboxamidas bicíclicas, piroxamida, CG-152I, PXD-101, ácido sulfonamida-hidroxámico, LAQ-824, tricostatina A (TSA), oxamflatina, scriptaid, ácido m-carboxicinámico, ácido bishidroxámico, o análogo del ácido trapoxin-hidroxámico;
- 65 - tetrapéptidos tricíclicos, por ejemplo trapoxina, apidicina o depsipéptido;

ES 2 347 544 T3

- benzamidas, por ejemplo MS-275 o CI-994, o
- depudecina.

5

Para el tratamiento del cáncer, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente como se ha descrito arriba, en asociación con irradiación. La irradiación significa radiación ionizante y en particular radiación gamma, especialmente la emitida por aceleradores lineales o por radionucleidos que son de uso común en la actualidad. La irradiación del tumor por radionucleidos puede ser externa o interna.

10

La presente invención se refiere también a una combinación de acuerdo con la invención de un agente anti-cáncer y un inhibidor de HDAC de acuerdo con la invención.

15

La presente invención se refiere también a una combinación de acuerdo con la invención para uso en terapia médica, por ejemplo para inhibición del crecimiento de las células tumorales.

La presente invención se refiere también a una combinación de acuerdo con la invención para inhibir el crecimiento de células tumorales.

20

La presente invención se refiere también a un método de inhibir el crecimiento de las células tumorales en un individuo humano, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una combinación de acuerdo con la invención.

25

La invención proporciona adicionalmente un método para inhibir el crecimiento anormal de las células, con inclusión de células transformadas, por administración de una cantidad eficaz de una combinación de acuerdo con la invención.

30

El otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden administrarse simultáneamente (v.g. en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En el último caso, los dos compuestos se administran dentro de un periodo y en una cantidad y de un modo que es suficiente para asegurar que se consigue un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método y el orden de administración preferidos, así como las cantidades de dosificación y los regímenes respectivos para cada componente de la combinación dependerán del otro agente medicinal particular y del inhibidor de HDAC que se administren, su ruta de administración, el tumor particular que se esté tratando y el hospedador particular a tratar. El método y el orden de administración óptimos así como las cantidades y el régimen de dosificación pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica utilizando métodos convencionales y teniendo en cuenta la información presentada en esta memoria.

35

El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 50 a 400 mg/m^2 , particularmente para cisplatino en una dosis de aproximadamente 75 mg/m^2 y para carboplatino en aproximadamente 300 mg/m^2 por curso de tratamiento.

40

El compuesto de taxano se administra ventajosamente en una dosis de 50 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 75 a 250 mg/m^2 , particularmente para paclitaxel en una dosis de aproximadamente 175 a 250 mg/m^2 y para docetaxel en aproximadamente 75 a 150 mg/m^2 por curso de tratamiento.

45

El compuesto camptotecina se administra ventajosamente en una dosis de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 1 a 300 mg/m^2 , particularmente para irinotecán en una dosis de aproximadamente 100 a 350 mg/m^2 y para topotecán en aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 por curso de tratamiento.

50

El derivado antitumoral de podofilotoxina se administra ventajosamente en una dosis de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 50 a 250 mg/m^2 , particularmente para etoposido en una dosis de aproximadamente 35 a 100 mg/m^2 y para teniposido en aproximadamente 50 a 250 mg/m^2 por curso de tratamiento.

55

El alcaloide antitumoral de la vinca se administra ventajosamente en una dosis de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, particularmente para vinblastina en una dosis de aproximadamente 3 a 12 mg/m^2 , para vincristina en una dosis de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 , y para vinorelbina en una dosis de aproximadamente 10 a 30 mg/m^2 por curso de tratamiento.

60

El derivado antitumoral nucleosídico se administra ventajosamente en una dosis de 200 a 2500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 700 a 1500 mg/m^2 , particularmente para 5-FU en una dosis de 200 a 500 mg/m^2 , para gemcitabina en una dosis de aproximadamente 800 a 1200 mg/m^2 y para capecitabina en aproximadamente 1000 a 2500 mg/m^2 por curso de tratamiento.

65

Los agentes alquilantes tales como mostaza nitrogenada o nitrosourea se administran ventajosamente en una dosis de 100 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 120 a 200 mg/m^2 , particularmente para ciclofosfamida en una dosis de aproximadamente 100 a 500 mg/m^2 , para clorambucil en una dosis de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg, para carmustina en una dosis de aproximadamente 150 a 200 mg/m^2 , y para lomustina en una dosis de aproximadamente 100 a 150 mg/m^2 por curso de tratamiento.

ES 2 347 544 T3

El derivado antitumoral de antraciclina se administra ventajosamente en una dosis de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 15 a 60 mg/m^2 , particularmente para doxorubicina en una dosis de aproximadamente 40 a 75 mg/m^2 , para daunorrubicina en una dosis de aproximadamente 25 a 45 mg/m^2 , y para idarrubicina en una dosis de aproximadamente 10 a 15 mg/m^2 por curso de tratamiento.

5

Trastuzumab se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, particularmente 2 a 4 mg/m^2 por curso de tratamiento.

El agente antiestrogénico se administra ventajosamente en una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg al día dependiendo del agente particular y la afección que se esté tratando. El tamoxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de 5 a 50 mg, preferiblemente 10 a 20 mg dos veces al día, continuando la terapia durante el tiempo suficiente para alcanzar y mantener el efecto terapéutico. El toremifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día, continuando la terapia durante el tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. El anastrozol se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 1 mg una vez al día. El droloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 20-100 mg una vez al día. El raloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día. El exemestano se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 25 mg una vez al día.

Estas dosis pueden administrarse por ejemplo una sola vez, dos veces o más por curso de tratamiento, que puede repetirse por ejemplo cada siete, catorce, veintiuno o veintiocho días.

Teniendo en cuenta sus útiles propiedades farmacológicas, los componentes de las combinaciones de acuerdo con la invención, es decir el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para propósitos de administración. Los componentes pueden formularse por separado en composiciones farmacéuticas individuales o en una composición farmacéutica unitaria que contiene ambos componentes.

La presente invención se refiere también por tanto a una composición farmacéutica que comprende el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC junto con uno o más vehículos farmacéuticos.

30

La presente invención se refiere también a una combinación de acuerdo con la invención en la forma de una composición farmacéutica que comprende un agente anti-cáncer y un inhibidor de HDAC de acuerdo con la invención junto con uno o más vehículos farmacéuticos.

La presente invención se refiere adicionalmente al uso de una combinación de acuerdo con la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células tumorales.

La presente invención se refiere adicionalmente a un producto que contiene como primer ingrediente activo un inhibidor de HDAC de acuerdo con la invención y como segundo ingrediente activo un agente anticáncer, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que sufren de cáncer.

Parte experimental

45

Los ejemplos siguientes se proporcionan para propósitos de ilustración.

“BSA” significa sero-albúmina bovina, “DCM” significa diclorometano, “DIEA” significa diisopropiletilamina, “DMF” significa dimetilformamida, “DMSO” significa dimetilsulfóxido, “EtOAc” significa acetato de etilo, “Fmoc” significa fluorenilmetoxicarbonilo, “Hepes” significa ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazinaetanosulfónico), “HOBT” significa 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol, “MeOH” significa metanol, “PyBop” significa hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, “PyBrOP” significa hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio, “TEA” significa trietilamina, “TFA” significa ácido trifluoroacético, “THF” significa tetrahidrofurano, ExtrelutTM es un producto de Merck KgaA, Darmstadt, Alemania, y es una columna corta que comprende tierra de diatomeas.

55

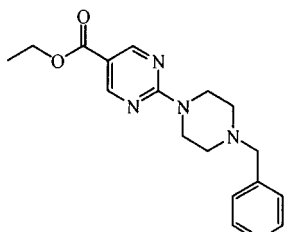
60

65

A. Preparación de los compuestos intermedios

Ejemplo A1

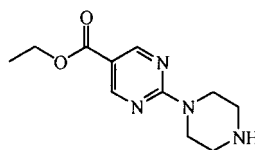
5 a) Preparación de



Compuesto intermedio 1

20 Se añadió gradualmente una solución de 1-(fenilmetil)-piperazina (0,068 moles) en acetonitrilo p.a. (135 ml) a una solución de carbonato de potasio (0,18 moles) y éster etílico del ácido 2-(metilsulfonil)-5-pirimidina-carboxílico (0,082 moles) en acetonitrilo p.a. (135 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 45 min a la temperatura ambiente. A continuación, se dejó en reposo la mezcla de reacción durante una noche. Se añadió DCM (400 ml). Se añadió agua (300 ml) y la capa orgánica se separó, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo (28 g) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH 95/5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo se cristalizó en acetonitrilo, se separó por filtración y se secó a vacío, obteniéndose 15,1 g de compuesto intermedio 1.

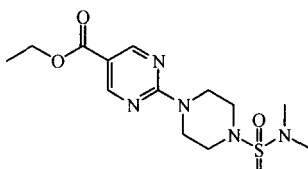
30 b) Preparación de



Compuesto intermedio 2

45 Una mezcla de compuesto intermedio 1 (0,03 moles) en EtOH (250 ml) se hidrogenó a 50°C con Pd/C al 10% (2 g) como catalizador. Después de la absorción de H_2 (1 equiv.), se filtró el catalizador y se evaporó el filtrado. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/(MeOH/ NH_3) 90/10). Las fracciones de producto se recogieron y se evaporó el disolvente, obteniéndose 6,8 g (>96%) de compuesto intermedio 2.

50 c) Preparación de



Compuesto intermedio 3

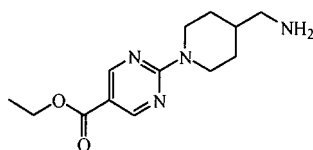
60 Una solución de cloruro de dimetil-sulfamofilo (0,0015 moles) en DCM (1 ml) se añadió a 5°C a una mezcla de compuesto intermedio 2 (0,0012 moles) y TEA (0,0017 moles) en DCM (1 ml) en corriente de nitrógeno. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió carbonato de potasio al 10%. La mezcla se extrajo con DCM. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró, y se evaporó el disolvente a sequedad. El residuo (0,69 g) se recogió en dietil-éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, obteniéndose 0,64 g (73%) de compuesto intermedio 3, punto de fusión 123°C.

ES 2 347 544 T3

Ejemplo A2

Preparación de

5



10

Compuesto intermedio 4

15

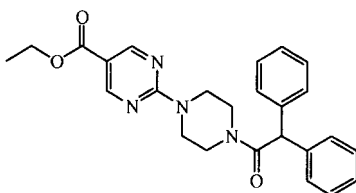
Una solución de éster etílico del ácido 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinacarboxílico (0,0434 moles) en acetonitrilo (100 ml) se añadió gota a gota a 10°C a una solución de 4-piperidinametamina (0,0868 moles) y carbonato de potasio (0,0434 moles) en acetonitrilo (200 ml) en corriente de nitrógeno. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró, y se evaporó el disolvente. El residuo (14,18 g) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (20-45 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 90/10/1 a 80/20/2). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, obteniéndose 3,7 g (32%) de Compuesto intermedio 4.

20

Ejemplo A3

a) Preparación de

30



35

Compuesto intermedio 5

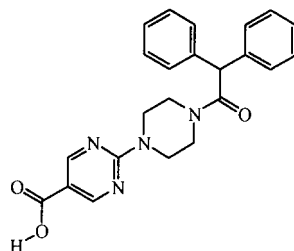
40

Una mezcla de compuesto intermedio 2 (0,0002 moles), cloruro de α-fenil-bencenoacetilo (0,0003 moles) y agente de barrido morfolinometil-PS (Suministrador Novabiochem Cat. No. 01-64-0171: Morfolinometil-poliestireno HL (mallas 200-400), 2% divinilbenceno) (0,150 g) en DCM (5 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 20 horas, se añadió luego agente de barrido tris(2-aminometil)amina-PS (Suministrador Novabiochem Cat. No. 01-64-0170: tris(2-aminometil)amina-poliestireno HL (mallas 200-400), 1% divinilbenceno) (0,150 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas más. Se separaron por filtración los agentes de barrido, se lavaron con DCM y se evaporó el disolvente, obteniéndose el compuesto intermedio 5.

45

b) Preparación de

50



55

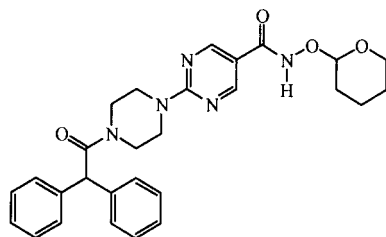
60

Compuesto intermedio 6

65

Una mezcla de compuesto intermedio 5 (0,0003 moles) en hidróxido de sodio 1N (1,5 ml), THF (4 ml) y MeOH (1 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 3 días, y se neutralizó luego la mezcla de reacción con HCl (1,5 ml, 1N). La mezcla se filtró a través de Extrelut™ NT (suministrador: Merck) y se secó en corriente de N₂, obteniéndose el compuesto intermedio 6.

c) Preparación de



Compuesto intermedio 7

Una mezcla de compuesto intermedio 6 (0,0003 moles), agente de barrido HOBT-6-carboxamidometil-PS (0,200 g; Novabiochem Cat. No. 01-64-0425) y *N,N*-dimetil-4-piridinamina (0,00015 moles) en DCM/DMF (5 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 15 min, se añadió luego *N,N'*-metanotetraalbis-2-propanamina (0,070 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas. La resina se lavó 3 veces con DCM, tres veces con DMF, tres veces más con DCM y otras tres veces con DMF, y finalmente seis veces con DCM. Se añadió una solución de *O*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-hidroxilamina (0,00026 moles) en DCM (5 ml) y la mezcla se agitó mediante sacudidas durante 20 horas, y luego metilisocianato enlazado a PS (suministrador Novabiochem Cat. No. 01-64-0289 (sic)). Se añadió metilisocianato-poliestireno HL (mallas 200-400), 2% divinilbenceno) (0,150 g) y la mezcla se agitó mediante sacudidas durante 4 horas. Se separaron por filtración los agentes de barrido, se lavaron dos veces con DCM y se utilizó el filtrado, obteniéndose el compuesto intermedio 7.

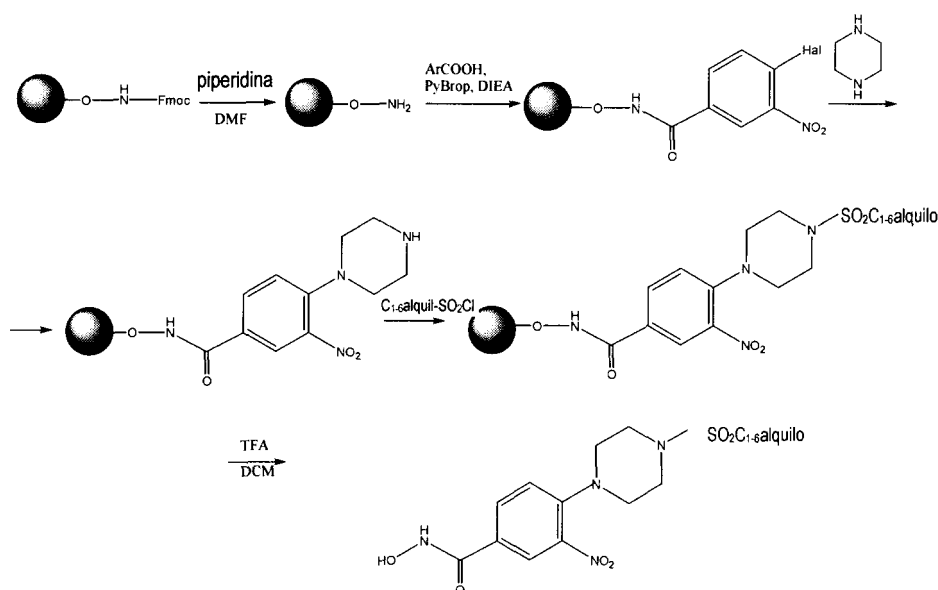
B. Preparación de los compuestos finales

Ejemplo B1

Se desprotegió la resina *N*-Fmoc-hidroxilamina-2-clorotritilo (Novabiochem, 01-64-0165) con piperidina al 50% en DMF (TA, 24 h). La resina se lavó varias veces con DCM y DMF y se hinchó en DMF. Se añadieron dos equivalentes de ácido¹, PyBrOP y 4 equivalentes de DIEA como una sola porción. La mezcla se agitó mediante sacudidas durante 24 horas, se escurrió el líquido y la resina se lavó varias veces con DCM y DMF. La resina se hinchó en DMF que contenía 2 equivalentes de amina, se agitó mediante sacudidas 24 h a TA, se escurrió el líquido y se lavó la resina con DCM y DMF. Se añadió un cloruro de arilsulfonilo (2 eq) como una sola porción a la resina hinchada en DMF con 4 equivalentes de TEA. La reacción se agitó durante una noche, se escurrió y la resina se lavó con DCM y DMF. El producto final se escindió con 5% de TFA en DCM, se analizó por HPLC y MS y se evaporó en los tubos de ensayo previamente pesados.

¹. Basado en la carga de la resina.

Para propósitos ilustrativos se incluye el esquema siguiente.



ES 2 347 544 T3

Ejemplo B2

Se desprotegió la resina N-Fmoc-hidroxilamina-2-clorotritilo (Novabiochem, 01-64-0165) con piperidina al 50% en DMF (TA, 24 h)¹. La resina se lavó² varias veces con DCM y DMF y se hinchó en DMF. Se añadieron 2 equivalentes de ácido³, PyBrOP⁴ y cuatro equivalentes de DIEA como una sola porción. La mezcla se agitó mediante sacudidas durante 24 h, se escurrió el líquido y la resina se lavó varias veces con DCM y DMF. Se hinchó la resina en DMF que contenía 2 equivalentes de amina, se agitó mediante sacudidas 24 h a TA, se escurrió el líquido y la resina se lavó con DCM y DMF. El producto final se escindió con TFA al 5% en DCM, se analizó por HPLC y MS y se evaporó en los tubos de ensayo previamente pesados.

¹. En un ejemplo se utilizó el compuesto 1 resina de carboximetanotiol-4-metoxitritilo (Novabiochem, 01-64-0238).

². En un caso se utilizó también MeOH en los diferentes procedimientos de lavado del compuesto 1.

³. Basado en la carga de la resina.

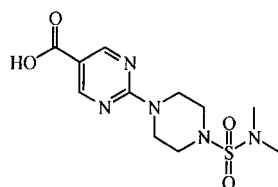
⁴. En un caso se reemplazó PyBrOP por PyBOP compuesto 1.

Ejemplo B3

Se desprotegió la resina N-Fmoc-hidroxilamina-2-clorotritilo (Novabiochem, 01-64-0165) con 50% de piperidina en DMF (TA, 24 h)¹. La resina se lavó² varias veces con DCM y DMF y se hinchó en DMF. Se añadieron 2 equivalentes de ácido³, PyBrOP⁴ y cuatro equivalentes de DIEA como una sola porción. La mezcla se agitó mediante sacudidas durante 24 h, se escurrió el líquido y la resina se lavó varias veces con DCM y DMF. La resina se hinchó en DMF que contenía dos equivalentes de amina, se agitó mediante sacudidas 24 h a TA, se escurrió el líquido y la resina se lavó con DCM y DMF. Se agitaron mediante sacudidas tres equivalentes de ácido, DIC y DIEA con la resina durante una noche a TA. La resina se escurrió y se lavó con DCM y DMF. El producto final se escindió con 5% de TFA en DCM, se analizó por HPLC y MS y se evaporó en los tubos de ensayo previamente pesados.

Ejemplo B4

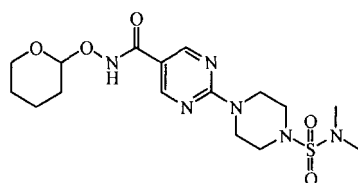
a) Preparación de



Sal de sodio del compuesto intermedio 8

Una mezcla de compuesto intermedio 3 (0,0016 moles) e hidróxido de sodio (0,0033 moles) en EtOH (6 ml) se agitó y se mantuvo a reflujo durante 2 horas, después de lo cual se enfrió a la temperatura ambiente. Se filtró el precipitado, se lavó con EtOH y se secó, obteniéndose 0,59 g (>100%) de compuesto intermedio 8.Na.

b) Preparación de



Compuesto intermedio 9

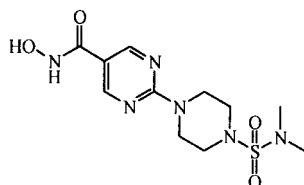
ES 2 347 544 T3

Se añadió poco a poco monohidrocloreto de *N'*-(etilcarbonimidóil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina (0,0021 moles) a una mezcla de compuesto intermedio 8.Na (0,0016 moles), *O*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0021 moles) y 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (0,0021 moles) en DCM/THF (10 ml) en corriente de N₂. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante un fin de semana. Se añadió carbonato de potasio al 10%. La mezcla se extrajo con DCM. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró, y se evaporó el disolvente a sequedad. El residuo (0,94 g) se purificó por cromatografía en columna sobre Kromasil (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,1; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,45 g, 65%) se recogió en dietil-éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, obteniéndose 0,422 g (61%) de compuesto intermedio 9, punto de fusión 183°C.

10

c) Preparación de

15



20

Compuesto 2

25

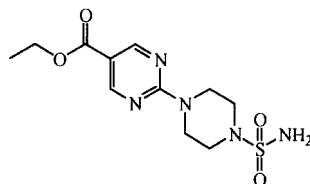
Se añadió ácido trifluoroacético (0,5 ml) a una mezcla de compuesto intermedio 9 (0,0009 moles) en MeOH (10 ml). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. El precipitado se filtró, se lavó con DCM y se secó, obteniéndose 0,176 g (59%) del compuesto 2, punto de fusión >260°C.

30

Ejemplo B5

Preparación de

35



40

Compuesto intermedio 10

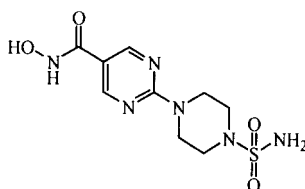
45

Una mezcla de compuesto intermedio 2 (0,0019 moles) y sulfamida (0,0021 moles) en 1,2-dimetoxi-etano (5 ml) se agitó y se mantuvo a reflujo durante 4 días. Se añadió agua. La mezcla se filtró y se secó, obteniéndose 0,51 g (83%) de compuesto intermedio 10, punto de fusión 192°C.

50

El compuesto intermedio 10 se manipuló análogamente a lo descrito en el Ejemplo [B4] para dar 0,034 g (13%) del compuesto 3, punto de fusión 212°C.

55



60

Compuesto 3

65

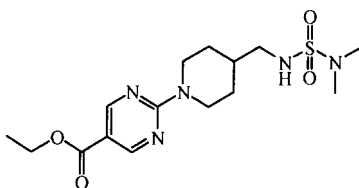
ES 2 347 544 T3

Ejemplo B6

Preparación de

5

10



Compuesto intermedio 11

15

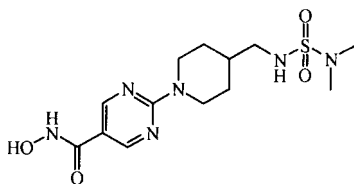
20

Una solución de cloruro de dimetil-sulfamoilo (0,007 moles) en DCM (5 ml) se añadió a 10°C a una solución de compuesto intermedio 4 (0,0057 moles) y TEA (0,0085 moles) en DCM (5 ml) en corriente de N₂. La mezcla se agitó durante una noche, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró, y se evaporó el disolvente. El residuo se cristalizó en CH₃CN/dietiléter. El precipitado se separó por filtración y se secó, obteniéndose 0,492 g (24%) de compuesto intermedio 11, punto de fusión 142°C.

25

El compuesto intermedio 11 se manipuló análogamente a lo descrito en el ejemplo [B4] para dar 0,7 g (85%) de compuesto 4, punto de fusión 182°C.

30



35

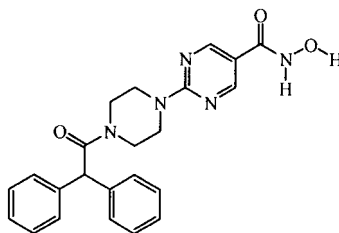
Compuesto 4

40 Compuesto B7

Preparación de

45

50



55

Compuesto 5

60

Una mezcla de compuesto intermedio 7 (0,0003 moles) en ácido acético, ácido trifluoroacético (5 ml, 5% en MeOH) se agitó a la temperatura ambiente durante 20 horas, y la mezcla de reacción se secó por soplado, obteniéndose el compuesto 5.

65

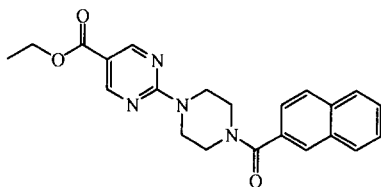
ES 2 347 544 T3

Ejemplo B8

Preparación de

5

10



15

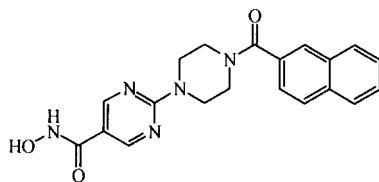
Compuesto intermedio 12

20

25

Una mezcla de compuesto intermedio 2 (0,0025 moles), cloruro de 2-naftalenocarbonilo (0,003 moles) y carbonato de potasio (0,005 moles) en acetonitrilo (20 ml) se agitó y se mantuvo a reflujo durante una noche, después de lo cual se enfrió a la temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró, y se evaporó el disolvente. El residuo se cristalizó en dietiléter. El precipitado se separó por filtración y se secó, obteniéndose 0,97 g (100%) de compuesto intermedio 12, punto de fusión 140°C . El compuesto intermedio 12 se manipuló análogamente a lo descrito en el ejemplo [B4] para dar 0,338 g (86%) del compuesto 6, punto de fusión 130°C .

30



35

Compuesto 6

40

45

La tabla F-1 enumera los compuestos que se prepararon de acuerdo con uno de los ejemplos anteriores. En las tablas se utilizaron las abreviaturas siguientes: Co.No. significa Compuesto Número, Ej. [Bn°] se refiere al mismo método que se describe en los ejemplos Bn°, $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$ significa la sal trifluoroacetato. Algunos compuestos se han caracterizado por puntos de fusión (pf.) y otros compuestos se caracterizaron por datos espectrales de masas [MH^+] (ms.).

50

(Tabla pasa a página siguiente)

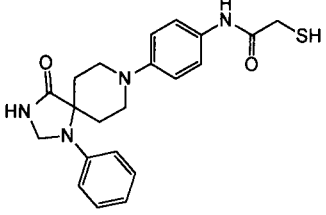
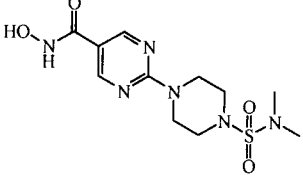
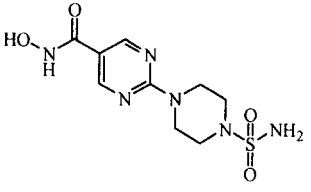
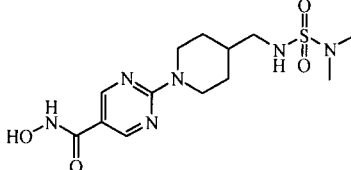
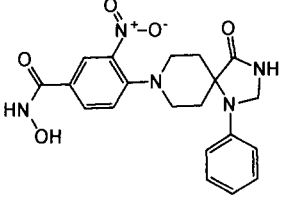
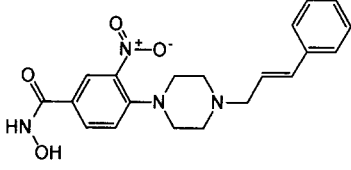
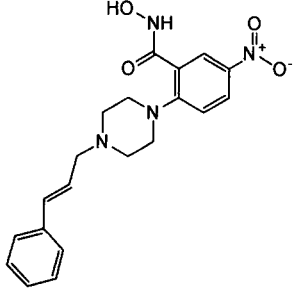
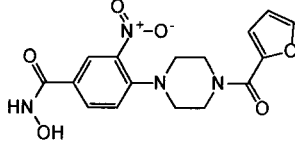
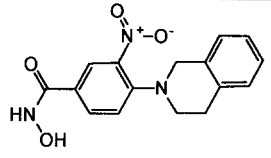
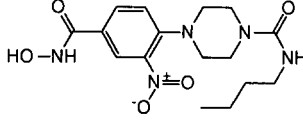
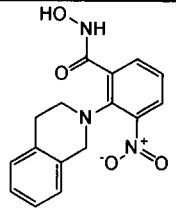
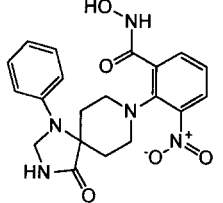
55

60

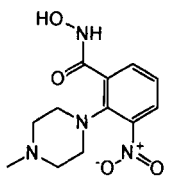
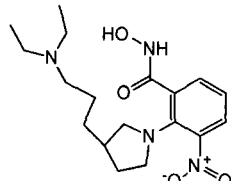
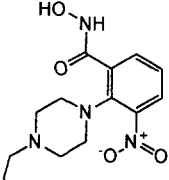
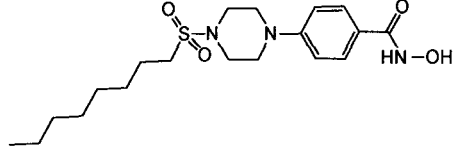
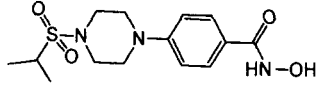
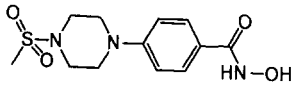
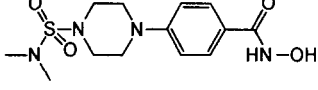
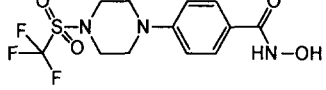
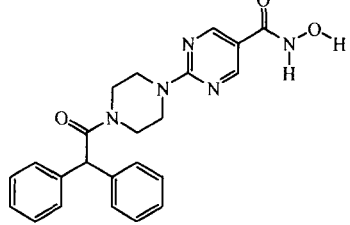
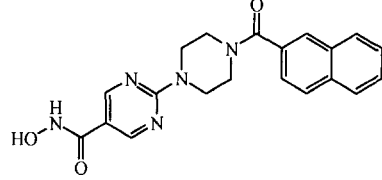
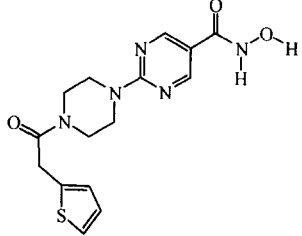
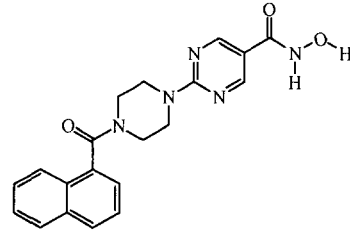
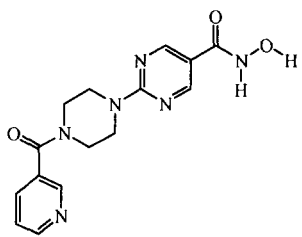
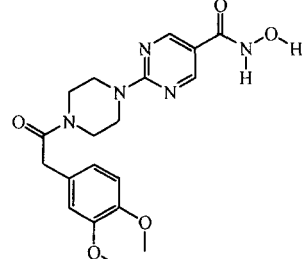
65

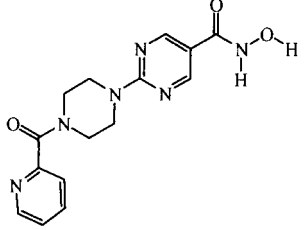
ES 2 347 544 T3

TABLA F-1

<p>5</p> 	
<p>10</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No. 1; Ej. [B2]</p>	<p>Co. No. 2; Ej. [B4]; pf >260 °C</p>
<p>15</p> 	
<p>20</p> <p>Co. No. 3; Ej. [B5]; pf 212 °C</p>	<p>Co. No. 4; Ej. [B6]; pf 182 °C</p>
<p>25</p> 	
<p>30</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.7; Ej. [B2]; ms. 412</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.8; Ej. [B2]; ms. 383</p>
<p>35</p> 	
<p>40</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.9; Ej. [B2]; ms. 383</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.10; Ej. [B2]; ms. 361</p>
<p>50</p> 	
<p>55</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.11; Ej. [B2]; ms. 314</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.12; Ej. [B3]; ms. 366</p>
<p>60</p> 	
<p>65</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.13; Ej. [B2]; ms. 314</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.14; Ej. [B2]; ms. 412</p>

ES 2 347 544 T3

<p>5</p> 	
<p>10</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.15; Ej. [B2]; ms. 281</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.16; Ej. [B2]; ms. 365</p>
<p>15</p> 	
<p>20</p> <p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.17; Ej. [B2]; ms. 295</p>	<p>Co. No.18; Ej. [B1]; ms.398</p>
<p>25</p> 	
<p>Co. No.19; Ej. [B1]; ms. 328</p>	<p>Co. No.20; Ej. [B1]; ms. 300</p>
<p>30</p> 	
<p>Co. No.21; Ej. [B1]; ms. 329</p>	<p>Co. No.22; Ej. [B1]; ms. 354</p>
<p>35</p> 	
<p>40</p> <p>Co. No.5; Ej. [B7]; ms. 418</p>	<p>Co. No.6; Ej. [B8]; mp. 130 °C</p>
<p>45</p> 	
<p>50</p> <p>Co. No.23; Ej. [B7]; ms. 348</p>	<p>Co. No.24; Ej. [B7]; ms. 378</p>
<p>55</p> 	
<p>60</p>	<p>65</p>

Co. No.25; Ej. [B7]; ms. 329	Co. No.26; Ej. [B7]; ms. 402
	
Co. No.27; Ej. [B7]; ms. 329	

C. Ejemplo farmacológico

El ensayo *in vitro* para inhibición de la histona-desacetilasa (véase ejemplo C.1) mide la inhibición de la actividad enzimática de HDAC obtenida con los compuestos de fórmula (I).

La actividad celular de los compuestos de fórmula (I) se determinó en células tumorales A2780 utilizando un ensayo colorimétrico para citotoxicidad celular o supervivencia (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983) (véase ejemplo C.2).

La solubilidad cinética en medios acuosos mide la aptitud de un compuesto para mantenerse en solución acuosa después de dilución (véase Ejemplo C.3).

Se diluyen soluciones stock de DMSO con un disolvente simple de tampón acuoso en tres pasos consecutivos. Para cada dilución se mide la turbidez con un nefelómetro.

La permeabilidad de un fármaco expresa su aptitud para desplazarse de un medio a o a través de otro. Específicamente, su aptitud para desplazarse a través de la membrana intestinal al torrente sanguíneo y/o desde el torrente sanguíneo a la diana. La permeabilidad (véase el Ejemplo C.4) puede medirse por la formación de una bicapa fosfolipídica de membrana artificial inmovilizada en filtros. En el ensayo de membrana artificial inmovilizada en filtros, se forma un "sándwich" con una placa de microtitulación de 96 pocillos y una placa de filtración de 96 pocillos, de tal modo que cada pocillo compuesto está dividido en dos cámaras con una solución donante en el fondo y una solución aceptora en la parte superior, separadas por un disco de microfiltración de 125 μm (poros de 0,45 μm), recubierto con 2% (p/v) de solución en dodecano de dioleoilfosfatidil-colina, en condiciones tales que se forman bicapas multi-laminares dentro de los canales del filtro cuando el sistema está en contacto con una solución tampón acuosa. La permeabilidad de los compuestos a través de esta membrana artificial se mide en cm/s. El propósito es buscar la permeación de los fármacos a través de una membrana artificial paralela a dos valores de pH diferentes: 4,0 y 7,4. La detección de los compuestos se realiza por espectrometría UV a una longitud de onda óptima comprendida entre 250 y 500 nm.

El metabolismo de los fármacos significa que un compuesto xenobiótico o endobiótico soluble en lípidos se transforma enzimáticamente en (a) uno o más metabolitos polares solubles en agua y excretables. El órgano principal para el metabolismo de los fármacos es el hígado. Los productos metabólicos son a menudo menos activos que el fármaco originario, o inactivos. Sin embargo, algunos metabolitos pueden haber aumentado su actividad o sus efectos tóxicos. Así, el metabolismo de los fármacos puede incluir tanto procesos de "destrucción" como de "toxicación". Uno de los sistemas enzimáticos principales que determinan la capacidad del organismo para tratar con los fármacos y productos químicos está representado por las monooxigenasas del citocromo P450, que son enzimas dependientes de NADPH. La estabilidad metabólica de los compuestos puede determinarse *in vitro* con el uso de tejido humano subcelular (véase ejemplo C.5). En este caso, la estabilidad metabólica de los compuestos se expresa como % de fármaco metabolizado después de 15 minutos de incubación de estos compuestos con microsomas. La cuantificación de los compuestos se determinó por análisis LC-MS.

El supresor de tumores p53 activa por transcripción un cierto número de genes que incluyen el gen WAF1/CIP1 en respuesta al deterioro del DNA. El producto de 21 kDa del gen WAF1 se encuentra en un complejo que implica ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) en células normales, pero no en células transformadas y parece ser un inhibidor universal de la actividad de CDK. Una consecuencia de la fijación de p21WAF1 a e inhibición de CDKs es la prevención de la fosforilación dependiente de CDK y la desactivación subsiguiente de la proteína Rb, que es esencial para la progresión del ciclo celular. La inducción de p21WAF1 en respuesta al contacto celular con un inhibidor de HDAC es por tanto un indicador potente y específico de inhibición de la progresión del ciclo celular en ambos puntos de control G1 y G2.

La capacidad de los compuestos para inducir p21WAF1 se midió con el ensayo de inmunosorbente unido a enzima de p21WAF1 (ELISA de WAF1 de Oncogene). El ensayo p21WAF1 es un inmunoensayo enzimático "sándwich"

ES 2 347 544 T3

que emplea a la vez anticuerpos monoclonales de ratón y policlonales de conejo. Un anticuerpo policlonal de conejo, específico para la proteína humana WAF1, ha sido inmovilizado en la superficie de los pocillos de plástico proporcionados en el kit. Cualquier p21WAF1 presente en la muestra a ensayar se fijará al anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal detector biotinilado reconoce también la proteína humana p21WAF1, y se fijará a cualquier p21WAF1, que haya sido retenida por el anticuerpo de captura. El anticuerpo detector, a su vez, está ligado por estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante. La peroxidasa de rábano picante cataliza la conversión del sustrato cromógeno tetra-metilbencidina de una solución incolora en una solución azul (o amarilla después de la adición de reactivo de parada), cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteína p21WAF1 fijada a la placa. El producto de la reacción coloreada se cuantifica utilizando un espectrofotómetro. La cuantificación se consigue por la construcción de una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de p21WAF1 (proporcionada en forma liofilizada) (véase Ejemplo C.6).

Ejemplo C.1

15 *Ensayo in vitro para inhibición de la histona-desacetilasa*

Se incubaron extractos nucleares HeLa (suministrador: Biomol) a 60 $\mu\text{g/ml}$ con $2 \times 10^{-8}\text{M}$ de sustrato peptídico radiomarcado. Como sustrato para medida de la actividad de HDAC se utilizó un péptido sintético, a saber los aminoácidos 14-21 de la histona H4. El sustrato está biotinilado en la parte terminal NH_2 con un espaciador de ácido 6-aminohexanoico, y está protegido en la parte terminal COOH por un grupo amida y [^3H]acetilado específicamente en la lisina 16. El sustrato, biotin-(6-aminohexanoico)Gly-Ala-(^3H)-acetil-Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val- NH_2), se añadió en un tampón que contenía Hepes 25 mM, sacarosa 1M, 0,1 mg/ml de BSA y 0,01% de Triton X-100 a pH 7,4. Después de 30 min, se terminó la reacción de desacetilación por la adición de HCl y ácido acético (concentración final 0,035 mM y 3,8 mM respectivamente). Después de detener la reacción, el ^3H -acetato libre se extrajo con acetato de etilo. Después de mezcladura y centrifugación, la radiactividad en la parte alícuota de la fase superior (orgánica) se contó en un contador β .

Para cada experimento, se corrieron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear HeLa y DMSO sin compuesto), una incubación en blanco (que contenía DMSO pero sin extracto nuclear ni compuesto) y muestras (que contenían el compuesto disuelto en DMSO y extracto nuclear HeLa). En el primer caso, los compuestos se testaron a una concentración de 10^{-5}M . Cuando los compuestos exhibían actividad a 10^{-5}M , se construyó una curva concentración-respuesta en la cual los compuestos se testaron a concentraciones comprendidas entre 10^{-5}M y 10^{-12}M . En cada test, se sustrajo el valor del blanco tanto del valor de control como de los valores de la muestra. La muestra de control representaba 100% de desacetilación del sustrato. Para cada muestra se expresó la radiactividad como un porcentaje del valor medio de los controles. En caso apropiado, se computaron los valores CI_{50} (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos al 50% del control) utilizando análisis Probit para los datos clasificados. En este caso los efectos de los compuestos de test se expresan como pCI_{50} (el valor del logaritmo negativo del valor CI_{50}). Todos los compuestos testados exhibían actividad enzimática a una concentración de test de 10^{-5}M y 21 compuestos tenían un valor $\text{pCI}_{50} \geq 5$ (véase la Tabla F-2).

Ejemplo C.2

45 *Determinación de la actividad antiproliferativa sobre células A2780*

Todos los compuestos testados se disolvieron en DMSO y se hicieron diluciones adicionales en medio de cultivo. Las concentraciones finales de DMSO no excedían nunca de 0,1% (v/v) en los ensayos de proliferación de células. Los controles contenían células A2780 y DMSO sin compuesto y los blancos contenían DMSO pero no células. Se disolvió MTT a razón de 5 mg/ml en PBS. Se preparó un tampón de glicina constituido por glicina 0,1M y NaCl 0,1M, tamponado a pH 10,5 con NaOH (1N) (todos los reactivos eran de Merck).

Las células de carcinoma ovárico humano A2780 (un obsequio amable del Dr. T.C. Hamilton [Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, EE.UU.]) se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 10% de suero de ternero fetal. Las células se mantuvieron rutinariamente como cultivos monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Las células se sometieron a pasos una vez por semana utilizando una solución tripsina/EDTA en una relación de división de 1:40. Todos los medios y suplementos se obtuvieron de Life Technologies. Las células estaban exentas de contaminación por micoplasmas como se determinó utilizando el kit Gen-Probe Mycoplasma Tissue Culture (suministrador: BioMérieux).

Las células se sembraron en placas de cultivo NUNC™ de 96 pocillos (suministrador: Life Technologies) y se dejaron adherir al plástico durante una noche. Las densidades utilizadas para la extensión en placas eran 1500 células por pocillo en un volumen total de 200 μl de medio. Después de la adhesión celular a las placas, se cambió el medio y se añadieron fármacos y/o disolventes hasta un volumen final de 200 μl . Después de 4 días de incubación, se reemplazó el medio por 200 μl de medio nuevo y se evaluaron la densidad y viabilidad celulares utilizando un ensayo basado en MTT. Se añadieron a cada pocillo 25 μl de solución de MTT y se incubaron posteriormente las células durante 2 horas a 37°C. Se aspiró luego el medio cuidadosamente y se solubilizó el producto azul MTT-formazano por adición de 25 μl de tampón de glicina seguido por 100 μl de DMSO. Las placas de microtest se sacudieron durante 10

ES 2 347 544 T3

min en un aparato de sacudidas de microplacas y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro Emax de 96 pocillos (suministrador: Sopachem). En un experimento, los resultados para cada condición experimental son el valor medio de 3 pocillos replicados. Para propósitos iniciales de cribado, los compuestos se testaron a una concentración fija única de 10^{-6} M. Para los compuestos activos, se repitieron los experimentos a fin de establecer curvas completas concentración-respuesta. Para cada experimento, se corrieron en paralelo controles (que no contenían fármaco alguno) y una incubación en blanco (que no contenía células ni fármacos). El valor en blanco se sustrajo de todos los valores de control y de muestra. Para cada muestra, se expresó el valor medio para el crecimiento celular (en unidades de absorbancia) como un porcentaje del valor medio para el crecimiento celular del control. En caso apropiado, se computaron los valores CI_{50} (concentración del fármaco necesaria para reducir el crecimiento celular al 50% del control) utilizando análisis Probit para datos graduados (Finney, D.J., Probit Analyses, 2nd Ed. Chapter 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). En este caso, los efectos de los compuestos de test se expresan como pCI_{50} (el valor del logaritmo negativo del valor CI_{50}). La mayor parte de los compuestos testados exhibían actividad celular a una concentración de test de 10^{-6} M y 9 compuestos tenían un valor $pCI_{50} \geq 5$ (véase la Tabla F-2).

Ejemplo C.3

Solubilidad cinética en medios acuosos

En el primer paso de dilución, se añadieron 10 μ l de una solución stock concentrada del compuesto activo, solubilizada en DMSO (5 mM), a 100 μ l de tampón fosfato-citrato de pH 7,4 y se mezcló. En el segundo paso de dilución, se dispensó ulteriormente una parte alícuota (20 μ l) del primer paso de dilución en 100 μ l de tampón citrato-fosfato de pH 7,4 y se mezcló. Finalmente, en el tercer paso de dilución, se diluyó ulteriormente una muestra (20 μ l) del segundo paso de dilución en 100 μ l de tampón fosfato-citrato a pH 7,4 y se mezcló. Todas las diluciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Inmediatamente después del último paso de dilución, se midió la turbidez de los tres pasos de dilución consecutivos con un nefelómetro. La dilución se realizó por triplicado para cada compuesto a fin de excluir errores ocasionales. Basándose en las medidas de turbidez, se realiza una graduación en 3 clases. Los compuestos con solubilidad alta obtuvieron un registro de 3 y para estos compuestos la primera dilución es clara. Los compuestos con solubilidad media obtuvieron un registro de 2. Para estos compuestos, la primera dilución es turbia y la segunda dilución es clara. Los compuestos con solubilidad baja obtuvieron un registro de 1, y para estos compuestos tanto la primera como la segunda dilución son turbias. Se midió la solubilidad de nueve compuestos. De estos compuestos, siete exhibían un registro de 3, y 2 demostraron un registro de 1 (véase la Tabla F-2).

Ejemplo C.4

Análisis en paralelo de permeabilidad de la membrana artificial

Las muestras stock (partes alícuotas 10 μ l de una solución stock de 5 mM en 100% DMSO) se diluyeron en una placa de pocillos profundos o Pre-mix que contenía 2 ml de un sistema tampón acuoso de pH 4 o pH 7,4 (PSR4 System Solution Concentrate (pION)).

Antes de añadir las muestras a la placa de referencia, se añadieron 150 μ l de tampón a los pocillos y se realizó una medida UV en blanco. Después de ello, se desechó el tampón y se utilizó la placa como placa de referencia. Todas las medidas se realizaron en placas resistentes a UV (suministrador: Costar o Greiner).

Después de la medida en blanco de la placa de referencia, se añadieron 150 μ l de las muestras diluidas a la placa de referencia y se añadieron 200 μ l de las muestras diluidas a la placa donante 1. Una placa aceptora de filtro 1 (suministrador: Millipore, tipo: MAIP N45) se recubrió con 4 μ l de la solución formadora de membrana artificial (1,2-di-oleoil-sn-Glycer-3-fosfocolina en dodecano que contenía 0,1% de 2,6-di-terc-butyl-4-metilfenol y se dispuso encima de la placa donante 1 para formar un "sándwich". El tampón (200 μ l) se dispensó en los pocillos aceptores en la parte superior. El sándwich se cubrió con una tapa y se guardó durante 18 h a la temperatura ambiente en la oscuridad.

Se realizó una medida en blanco de la placa aceptora 2 por adición de 50 μ l de tampón a los pocillos, seguido por una medida UV. Después de la medida en blanco de la placa aceptora 2, se desechó el tampón y se transfirieron 150 μ l de la solución aceptora desde la placa aceptora de filtro 1 a la placa aceptora 2. Después de ello se retiró del sándwich la placa aceptora de filtro 1. Después de la medida en blanco de la placa donante 2 (véase arriba), se transfirieron 150 μ l de la solución donante desde la placa donante 1 a la placa donante 2. Los espectros UV de la placa donante 2, la placa aceptora 2 y los pocillos de la placa de referencia se escanearon (con un SpectraMax 190). Todos los espectros se procesaron para calcular la permeabilidad con el Software Command PSR4p. Todos los compuestos se midieron por triplicado. Se utilizaron como estándares en cada experimento carbamazepina, griseofulvina, acicloguanisina, atenolol, furosemida, y clorotiazida. Los compuestos se clasificaron en tres categorías como compuestos de permeabilidad baja (efecto medio $< 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; registro 1), permeabilidad media (1×10^{-6} cm/s $>$ efecto medio $\geq 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; registro 2) o permeabilidad alta ($\geq 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; registro 3). Dos compuestos exhibían un registro de 1 a uno de los valores de pH medidos.

ES 2 347 544 T3

Ejemplo C.5

Estabilidad metabólica

5 Se realizaron preparaciones sub-celulares de tejidos de acuerdo con Gorrod *et al.* (Xenobiotica 5: 453-462, 1975) por separación centrífuga después de homogeneización mecánica del tejido.

10 El tejido hepático se lavó en tampón Tris-HCl 0,1M enfriado en hielo (pH 7,4) para eliminar por lavado el exceso de sangre. El tejido se secó luego con papel secante, se pesó y se desmenuzó groseramente utilizando tijeras quirúrgicas. Los trozos de tejido se homogeneizaron en tres volúmenes de tampón de fosfato 0,1M enfriado en hielo (pH 7,4) utilizando un instrumento Potter-S (Braun, Italia) equipado con una mano de Teflón o un homogeneizador Sorvall Omni-Mix, durante 7 x 10 s. En ambos casos, el recipiente se mantuvo en/sobre hielo durante el proceso de homogeneización.

15 Los homogeneizados de tejidos se centrifugaron a 9.000 x g durante 20 minutos a 4°C utilizando una centrifuga Sorvall o ultracentrifuga Beckman. El sobrenadante resultante se guardó a -80°C y se designa "S9".

20 La fracción S9 puede centrifugarse ulteriormente a 100.000 x g durante 60 minutos (4°C) utilizando una ultracentrifuga Beckman. El sobrenadante resultante se aspiró cuidadosamente, se dividió en partes alícuotas y se designó "citósol". El pellet se resuspendió en tampón de fosfato 0,1M (pH 7,4) en un volumen final de 1 ml por 0,5 g de peso de tejido original y se designó "microsomas".

25 Todas las fracciones sub-celulares se dividieron en partes alícuotas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

30 Para las muestras a testar, la mezcla de incubación contenía PBS (0,1M), compuesto (5 µM), microsomas (1 mg/ml) y un sistema generador de NADPH (glucosa-6-fosfato 0,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM y 0,8 unidades de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa). Las muestras de control contenían el mismo material, pero los microsomas se reemplazaron por microsomas desactivados por calentamiento (10 min a 95 grados Celsius). La recuperación de los compuestos en las muestras de control era en todos los casos 100%.

35 Las mezclas se preincubaron durante 5 min a 37 grados Celsius. La reacción se inició en el momento cero (t = 0) por adición de NADP 0,8 mM y las muestras se incubaron durante 15 min (t = 15). La reacción se terminó por adición de dos volúmenes de DMSO. Las muestras se centrifugaron luego durante 10 min a 900 x g y los sobrenadantes se guardaron a la temperatura ambiente durante no más de 24 h antes del análisis. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. El análisis de los sobrenadantes se realizó por análisis LC-MS. La elución de las muestras se realizó en un equipo Xterra MS C18 (50 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, EE.UU.). Se utilizó un sistema Alliance 2790 (suministrador: Waters, EE.UU.). La elución se realizó con tampón A (acetato de amonio 25 mM (pH 5,2) en H₂O/acetonitrilo (95/5)), siendo el disolvente B acetonitrilo y el disolvente C metanol a una tasa de flujo de 2,4 ml/min. El gradiente empleado consistía en aumentar la concentración de fase orgánica desde 0% a 50% B y 50% C en 5 min hasta 100% B en 1 min de manera lineal, y la concentración de fase orgánica se mantuvo estacionaria durante 1,5 minutos adicionales. El volumen total de inyección en las muestras era 25 µl.

45 Se utilizó como detector un espectrómetro de masas Quattro de cuadrupolo triple (suministrador: Micromass, Manchester, Reino Unido) provisto de una fuente ESI. La temperatura de la fuente y la de desolvatación se ajustaron a 120 y 350°C respectivamente, y se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y secador. Los datos se adquirieron en modo de escaneo positivo (reacción de iones simples). El voltaje del cono se ajustó a 10 V y el tiempo de residencia era 1 s.

50 La estabilidad metabólica se expresó como % de metabolismo del compuesto después de 15 min de incubación en presencia de microsomas activos (E(act))

55
$$(\% \text{ metabolismo} = 100 \% - \left(\frac{\text{corriente iónica total (TIC) de E(act) a } t = 15}{\text{TIC de E(act) a } t = 0} \right) \times 100).$$

60 Los compuestos que tenían un metabolismo porcentual menor que 20% se definieron como compuestos de alta estabilidad metabólica. Los compuestos que tenían un metabolismo entre 20 y 70% se definieron como compuestos de estabilidad intermedia, y los compuestos que exhibían un metabolismo porcentual mayor que 70 se definen como compuestos con estabilidad metabólica baja. Se incluyeron en todos los casos tres compuestos de referencia cada vez que se realizó un cribado de estabilidad metabólica. Se incluyó Verapamil como compuesto con estabilidad metabólica baja (% metabolismo = 73%). Se incluyó Cisaprida como compuesto con estabilidad metabólica media (% metabolismo 45%) y se incluyó propanol como compuesto con estabilidad metabólica intermedia a alta (25% metabolismo). Estos compuestos de referencia se utilizaron para validar el ensayo de estabilidad metabólica.

Se testó un compuesto y exhibía un metabolismo porcentual menor que 20%.

ES 2 347 544 T3

Ejemplo C.6

Capacidad de inducción de p21

5 Se ha aplicado el protocolo siguiente para determinar el nivel de expresión de la proteína p21 en células de carcinoma ovárico humano A2780. Las células A2780 (20.000 células/180 μ l) se sembraron en placas de 96 micro pocillos en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, 50 μ g/ml de gentamicina y 10% de suero de ternero fetal. 24 horas antes de la lisis de las células, se añadieron los compuestos a concentraciones finales de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M. Todos los compuestos testados se disolvieron en DMSO y se hicieron diluciones posteriores en medio de cultivo. 24 horas después de la adición del compuesto, los sobrenadantes se retiraron de las células. Las células se lavaron con 200 μ l de PBS enfriada en hielo. Se aspiraron los pocillos y se añadieron 30 μ l de tampón de lisis (Tris.HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, 1% Nonidet p40 y 10% glicerol). Las placas se incubaron durante una noche a -70°C .

15 Se retiraron de la bolsa de papel metalizado el número apropiado de pocillos en microtitulación y se pusieron en un soporte de pocillos vacío. Se preparó una solución de trabajo (1x) del Tampón de Lavado (concentrado de lavado de placas 20x: 100 ml de solución de PBS concentrada 20 veces y agente tensioactivo. Contiene 2% de cloroacetamida). El estándar p21WAF1 liofilizado se reconstituyó con agua destilada y se diluyó ulteriormente con diluyente de muestras (proporcionado en el kit).

20 Las muestras se prepararon por dilución de las mismas en relación 1:4 en diluyente de muestras. Las muestras (100 μ l) y los estándares de p21WAF1 (100 μ l) se pipetearon en los pocillos apropiados y se incubaron a la temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado 1x y se pipetearon luego en cada pocillo 100 μ l de reactivo de anticuerpo detector (una solución de anticuerpo monoclonal p21WAF1 biotinilado). Los pocillos se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron luego tres veces con tampón de lavado 1x. 25 El conjugado 400x (conjugado peroxidasa-estreptavidina: solución concentrada 400 veces) se diluyó y se añadieron a los pocillos 100 μ l de la solución 1x. Los pocillos se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 min y se lavaron luego 3 veces con tampón de lavado 1x y una vez con agua destilada. Se añadió la solución sustrato (sustrato cromógeno) (100 μ l) a los pocillos y se incubaron los pocillos durante 30 minutos en la oscuridad a la temperatura ambiente. Se añadió solución de parada a cada pocillo en el mismo orden que la solución sustrato añadida previamente. 30 Se midió la absorbancia en cada pocillo utilizando un lector de placas espectrofotométrico a longitudes de onda duales de 450/595 nm.

Para cada experimento, se corrieron en paralelo controles (que no contenían cantidad alguna de fármaco) y una incubación en blanco (que no contenía células ni fármacos). Se sustrajo el valor en blanco de todos los valores de control y de las muestras. Para cada muestra, se expresó el valor para la inducción de p21WAF1 (en nivel de absorbancia) como el porcentaje del valor para p21WAF1 presente en el control. La inducción porcentual mayor que 130% se definió como inducción significativa. Se testaron en este ensayo tres compuestos. Dos de ellos demostraron inducción significativa.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 347 544 T3

TABLA F-2

La tabla F-2 enumera los resultados de los compuestos que se testaron de acuerdo con el Ejemplo C.1, C.2, y C.3

5
10
15
20
25
30
35
40
45

Co. No.	Actividad enzimática pCI50	Actividad celular pCI50	Registro de solubilidad
8	>5		
7	>5		
9	>5		
10	>5		
11	>5		
12	>5		
1	<5	<5	1
18	6,173	6,166	1
5	7,096	6,181	
23	6,932	5,796	
24	7,073	6,084	
25	6,29	<5	
26	6,984	5,378	
27	6,433	<5	
6	7,104	5,828	3
19	5,536	<5	3
20	5,451	<5	
21	5,679	<5	3
22	5,599	5,297	3
2	6,615	5,534	3
3	6,881	<5	3
4	7,27	5,528	3

D. Ejemplo de composición

Tabletas recubiertas de película

Preparación del núcleo de la tableta

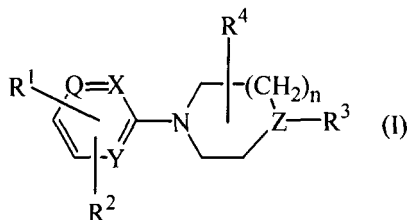
Una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón se mezcla bien y se humidifica después con una solución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinil-pirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. La mezcla húmeda de polvos se tamiza, se seca y se tamiza nuevamente. Se añaden luego 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. Se mezcla bien el todo y se comprime en tabletas, obteniéndose 10.000 tabletas, cada una de las cuales contiene 10 mg del compuesto de fórmula (I).

Recubrimiento

A una solución de 10 g de metil-celulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una solución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. Se añaden luego 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol, se funden 10 g de polietilen-glicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Se añade la última solución a la primera y se añaden luego 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión concentrada de colorante, y se homogeneiza el todo. Los núcleos de las tabletas se recubren con la mezcla así obtenida en un aparato de recubrimiento.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I),



las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isó-
 meras del mismo, en donde

n es 0, 1, 2, ó 3 y cuando n es cero se sobreentiende entonces un enlace directo;

20 cada Q es nitrógeno o $\text{—C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{=}$;

25 cada X es nitrógeno o $\text{—C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{=}$;

30 cada Y es nitrógeno o $\text{—C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{=}$;

35 cada Z es nitrógeno o $\text{—CH} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{=}$;

R^1 es —C(O)NH(OH) o —NHC(O)C_{1-6} alcanodiilSH;

40 R^2 es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometilo, di(C_{1-6} alquil)amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo;

45 R^3 es C_{1-6} alquilo, aril C_{2-6} alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C_{1-6} alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C_{1-6} alquil)aminosulfonilamino C_{1-6} alquilo, di(C_{1-6} alquil)amino C_{1-6} alquilo, C_{1-12} alquilsulfonilo, di(C_{1-6} alquil)aminosulfonilo, trihalo C_{1-6} alquilsulfonilo, di(aril) C_{1-6} alquilcarbonilo, tiofenil C_{1-6} alquilcarbonilo, piridinilcarbonilo o aril C_{1-6} alquilcarbonilo;

50 R^4 es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilo C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi, aril C_{1-6} alquilo, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, amino C_{1-6} alquilo, aminocarbonil C_{1-6} alquilo, hidroxicarbonil C_{1-6} alquilo, hidroxiaminocarbonilo, C_{1-6} alquiloxicarbonilo, C_{1-6} alquilamino C_{1-6} alquilo o di(C_{1-6} alquil)amino C_{1-6} alquilo;

cuando R^3 y R^4 están presentes en el mismo átomo de carbono, R^3 y R^4 pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula



en donde R^{10} es hidrógeno o arilo;

60 cuando R^3 y R^4 están presentes en átomos de carbono adyacentes, R^3 y R^4 pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula



arilo en lo que antecede es fenilo, o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionado cada uno independientemente de halo, C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo.

ES 2 347 544 T3

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

R¹ es -C(O)NH(OH) o

-NHC(O)C₁₋₆alcanodiilSH;

R² es halo, hidroxilo, amino, nitro, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxi, trifluorometilo o di(C₁₋₆alquil)amino;

R³ es C₁₋₆alquilo, arilC₂₋₆alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilo o piridinilcarbonilo; y

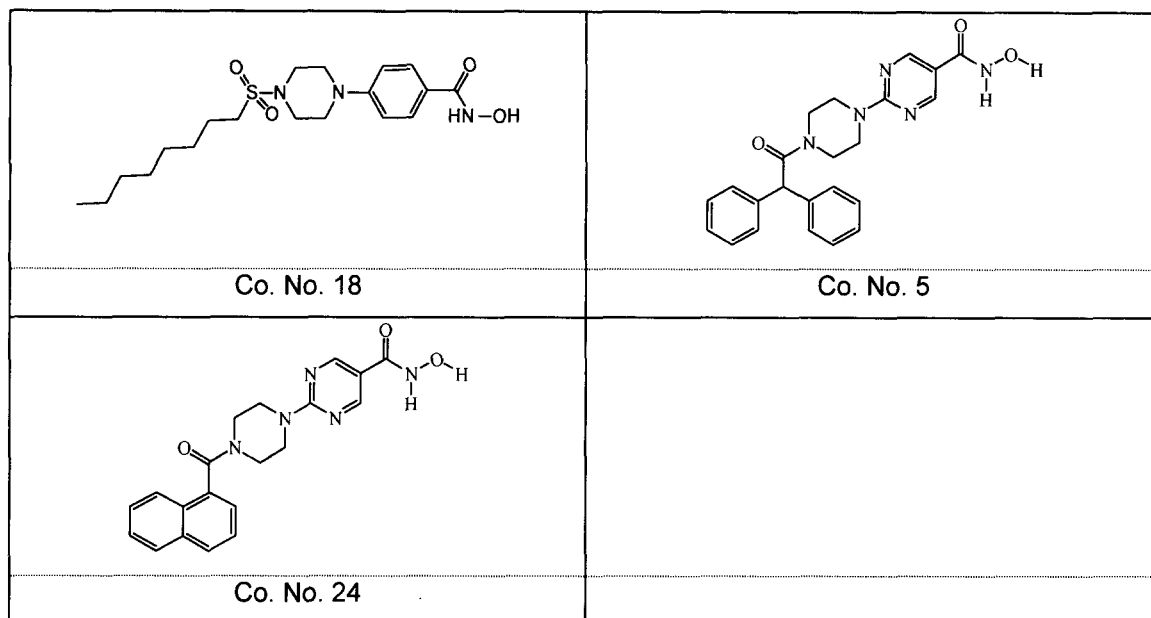
R⁴ es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxi, arilC₁₋₆alquilo, aminocarbonilo, aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilaminoC₁₋₆alquilo o di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde n es 0 ó 1; cada Q es $\text{---C}\begin{matrix} \diagup \\ \diagdown \end{matrix}$; R¹ es -C(O)

NH(OH) o -NHC(O)C₁₋₆alcanodiilSH; R² es hidrógeno o nitro; R³ es C₁₋₆alquilo, arilC₂₋₆alquenodifilo, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, aminosulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilaminoC₁₋₆alquilo, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo, di(C₁₋₆alquil)aminosulfonilo, trihaloC₁₋₆alquilsulfonilo, di(aril)C₁₋₆alquilcarbonilo, tiofenilC₁₋₆alquilcarbonilo, piridinilcarbonilo o arilC₁₋₆alquilcarbonilo; R⁴ es hidrógeno; cuando R³ y R⁴ están presentes en el mismo átomo de carbono, R³ y R⁴ pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula (a-1) en donde R¹⁰ es arilo; o cuando R³ y R⁴ están presentes en átomos de carbono adyacentes, R³ y R⁴ pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula (b-1).

4. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3 en donde n es 1; cada Q es $\text{---C}\begin{matrix} \diagup \\ \diagdown \end{matrix}$; cada Z es nitrógeno; R¹ -C(O)NH(OH); R² es hidrógeno; R³ es naftaleno carbonilo, C₁₋₁₂alquilsulfonilo o di(aril)C₁₋₆alquilcarbonilo; y R⁴ es hidrógeno.

5. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3 y 4 seleccionado de los compuestos No. 18, No. 5 y No. 24. Co. No. 18 Co. No. 5 Co. No. 24



6. Una composición farmacéutica que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables y como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 a 5.

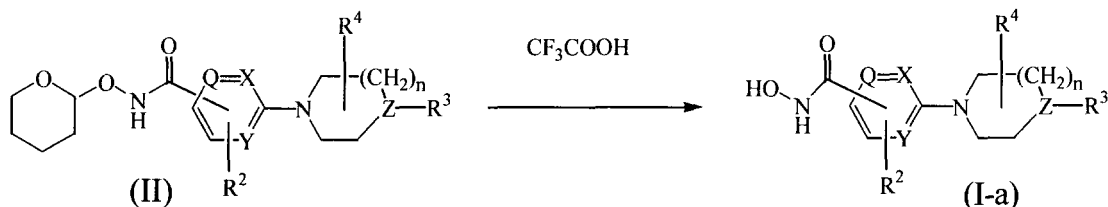
7. Un proceso de preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 en donde los vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 a 5 se mezclan íntimamente.

ES 2 347 544 T3

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como medicamento.

9. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

10. Un proceso para preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por hacer reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (II) con un ácido apropiado, tal como por ejemplo ácido trifluoroacético, obteniéndose un ácido hidroxámico de fórmula (I-a), en donde R¹ es -C(O)NH(OH)



11. Un método de detección o identificación de una HDAC en una muestra biológica que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto marcado como se define en la reivindicación (1) y un HDAC.

12. Una combinación de un agente anti-cáncer y un inhibidor de HDAC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.