



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 705**

51 Int. Cl.:
A61K 31/165 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03782390 .3**
86 Fecha de presentación : **10.12.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1583523**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54 Título: **Uso de derivados de ácido hidroxámico para la preparación de medicamentos antitumorales.**

30 Prioridad: **17.01.2003 IT MI03A0064**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **ITALFARMACO S.p.A.**
Viale Fulvio Testi, 330
20126 Milano, IT

72 Inventor/es: **Leoni, Flavio y**
Mascagni, Paolo

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 282 705 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

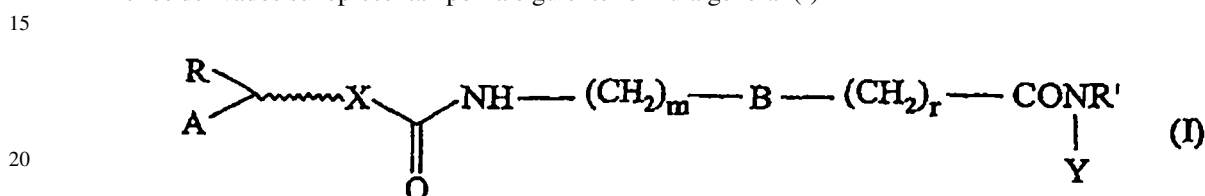
Uso de derivados de ácido hidroxámico para la preparación de medicamentos antitumorales.

5 La presente invención se refiere al uso de un derivado de ácido hidroxámico que contiene un grupo amidobenzoico según la reivindicación 1 para la preparación de medicamentos antitumorales.

Antecedentes tecnológicos

10 En el documento EP 901465 se describen derivados de ácido hidroxámico que contienen un grupo amidobenzoico como medicamentos potenciales con actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora, atribuible a la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, en particular del factor de necrosis tumoral y de interleucina-1-beta.

Dichos derivados se representan por la siguiente fórmula general (I)



en la que

25 R' es hidrógeno o alquilo(C₁₋₄);

A es adamantilo o un resto mono-, bi- o tri- cíclico, que opcionalmente puede estar parcialmente o completamente insaturado, puede contener uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por N, S u O, y opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcaniloxi, amino primario, secundario o terciario, alquilo(C₁₋₄)amino, mono- o di- alquilo(C₁₋₄)aminoalquilo(C₁₋₄), halógeno, alquilo(C₁₋₄), trialquilo(C₁₋₄)amino-alquilo(C₁₋₄).

30 ~~~ es una cadena de 1 a 5 átomos de carbono que opcionalmente contiene un doble enlace o un grupo NR' en el que R' es como se ha definido anteriormente;

35 R es hidrógeno o fenilo;

X es un átomo de oxígeno o un grupo NR' en el que R' es como se ha definido anteriormente o está ausente;

40 r y m son independientemente 0, 1 ó 2;

B es un fenileno o un anillo ciclohexileno;

Y es hidroxilo o una cadena de aminoalquilo(C₁₋₅) opcionalmente interrumpida por un átomo de oxígeno;

45 con la condición de que un grupo tricíclico como se define en A es fluorenilo sólo cuando, al mismo tiempo, X es diferente de O e Y es diferente de hidroxilo, a menos que dicho fluorenilo esté sustituido con un grupo trialquilo(C₁₋₄)amino alquilo(C₁₋₄).

50 Compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos en los que R' es hidrógeno, A es fenilo opcionalmente sustituido ó 1- ó 2- naftilo, ciclohexilo, 1- ó 2- 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, adamantilo, quinolinilo, isoquinolinilo, 1- ó 2- indenilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo.

55 Los más preferidos son los compuestos (I) en los que A es fenilo ó 1- ó 2- naftilo, R es fenilo cuando A es fenilo o es hidrógeno cuando A es 1- ó 2- naftilo.

Dichos compuestos se pueden preparar según los procedimientos que se describen en el documento EP 901465.

60 Uesato, Shinichi y col. Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters (2002), 12(10), 1347-1349 describen que utilizando ácido tranexámico como material de partida, se sintetizó una serie de N-hidroxicarboxamidas a fin de buscar nuevos inhibidores de histona desacetilasa (HDAC). La optimización adicional de la estructura que implica la sustitución del grupo 1,4-ciclohexileno con el grupo 1,4-fenileno dio los inhibidores de HDAC prometedores que poseen una arilamida bicíclica terminal.

65 El documento WO01/38322 describe también compuestos y procedimientos para inhibir la actividad enzimática de histona desacetilasa y para tratar enfermedades y estados de proliferación celular.

Breve descripción del dibujo

La Figura 1 ilustra el efecto antitumoral de ITF 2357 midiendo la capacidad del compuesto para reducir el crecimiento del melanoma murino B16-BL6.

5

Se ha descubierto ahora que el compuesto ácido 4-[(6-dietilaminometil)naft-2-ilmetiloxi-carbamoil]benzohidroxi-ácido o una sal aceptable del mismo se puede usar para el tratamiento de neoplasias de diferente origen, en particular de melanomas, carcinomas de colon, pulmón y mama, neuroblastomas, sarcomas y diversas formas de leucemia (eritroleucemia, leucemia promielocítica aguda), a dosis diarias únicas o múltiples que oscilan de 1 a 500 mg, dependiendo de la enfermedad y de las características farmacéuticas y toxicológicas del compuesto considerado, que se pueden administrar como formulaciones adecuadas a través de vía oral, parenteral o tópica, por ejemplo a través de perfusión directa en el sitio de la lesión tumoral. Además, el compuesto según la reivindicación 1 se puede administrar en combinación con otros agentes antineoplásicos conocidos, según los protocolos de poliquimioterapia.

10

La actividad del compuesto según la reivindicación 1 se evidenció *in vitro*, sobre líneas de células tumorales cultivadas e *in vivo*, sobre el modelo experimental del melanoma murino B16-BL6.

15

Los siguientes ejemplos ilustran la invención con mayor detalle.

20 Ejemplo 1

Actividad in vitro

Se ensayó *in vitro* el efecto antitumoral del compuesto del ejemplo 12 del documento EP 901465, clorhidrato de ácido 4-[(6-dietilaminometil)naft-2-ilmetiloxi-carbamoil]benzohidroxi-ácido (ITF 2357), midiendo la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento de líneas de células tumorales de diferente histotipo que derivan tanto de tumores sólidos como de tumores hematológicos. Las líneas de células usadas fueron: A549 (carcinoma pulmonar), MDA-MB435 (carcinoma de mama) y KG-1 (carcinoma mielóide).

25

Las células A549 y MDA-MB435 (cultivadas en medio de cultivo E-MEM y D-MEM respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal de ternero) se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (5000 células/pocillo) y se dejaron adherir durante 4 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación se añadió ITF 2357 a diversas dosis a cada pocillo (4 replicados). Después de 36 horas adicionales, se añadió timidina tritiada (1 µCi/pocillo) a cada pocillo y se dejó en el mismo durante las 12 horas siguientes. Después de este tiempo, se lavaron las células 3 veces con medio de cultivo y se solubilizaron luego con NaOH 1N durante 30 minutos.

30

35

Se usó un contador beta de centelleo líquido para la medición de la radiactividad contenida en cada muestra que es directamente proporcional a la síntesis de ADN y por lo tanto a la proliferación celular. Se sembraron células KG-1, cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con suero fetal de ternero al 5%, en placas de 96 pocillos de fondo plano (250000 células/pocillo). Se añadió inmediatamente ITF 2357 a diversas dosis y después de 36 horas se añadió timidina tritiada a cada pocillo (1 µCi/pocillo) y se dejó en el mismo durante las 12 horas siguientes. Al final se recogieron las células por medio de un colector de células y se midió la radiactividad contenida en cada muestra, que es directamente proporcional a la síntesis de ADN y por lo tanto a la proliferación celular, por medio de un contador beta de centelleo líquido.

40

45

Se midió el efecto de diferentes dosis de ITF 2357 como porcentaje de inhibición de incorporación de radiactividad en comparación con células de control sin tratar. Luego se determinó la concentración capaz de inducir un 50% de inhibición de crecimiento de células (IC₅₀) por medio de regresión lineal.

50 Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Línea de células	A549	MDA-MB435	KG-1
IC ₅₀ (nM)	495	73	552

55

Los resultados obtenidos muestran que ITF 2357 inhibe *in vitro*, a dosificaciones muy bajas (intervalo 10-9M), el crecimiento de las líneas de células empleadas. ITF 2357 inhibe en particular el crecimiento de celular tanto de células de tumores sólidos (A549 y MDA-MB435) como de leucemias (KG-1), lo que sugiere por lo tanto su uso sobre tumores de diferente histotipo.

60

Ejemplo 2

Actividad in vitro

65

Se usaron líneas de células derivadas de tumores humanos sólidos de diferente histotipo y estabilizadas *in vitro* en el siguiente experimento. En particular, se estudiaron tres líneas de células de tumores de cabeza y cuello (KB, Ca127

ES 2 282 705 T3

y Hep2), dos líneas de células derivadas de carcinomas de colon (HT-29 y LoVo) y cuatro líneas de células derivadas de melanomas (Colo38, Pes41, Pes43 y Anad).

Las células se cultivaron según procedimientos convencionales en matraces que contenían medio de cultivo sintético al que se había añadido suero fetal, a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, luego se sembraron en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante algunas horas. Se añadió ITF 2357 por triplicado a dosis crecientes a cada pocillo y se incubaron las células durante 72 horas adicionales. Las células viables se marcaron por tinción con sulforrodamina B y se determinó su cantidad por evaluación espectrofotométrica del contenido de tinte en cada pocillo. El efecto de ITF 2357 se calculó como porcentaje de inhibición, a cada concentración, de la incorporación de tinte en pocillos que contenían ITF 2357 en comparación con los pocillos de control (células sin fármaco). Los valores IC₅₀ de ITF 2357 se calcularon por Software Calculus (Biosoft) según las curvas dosis-respuesta.

Línea de células	Origen del tumor	ITF 2357 IC ₅₀ (μM)
KB	Cabeza-cuello	0,64
Ca127	Cabeza-cuello	3,4
Hep-2	Cabeza-cuello	1
HT-29	Carcinoma de colon	0,7
LoVo	Carcinoma de colon	2,5
Colo38	Melanoma	2,38
Pes41	Melanoma	1,6
Pes43	Melanoma	1,4
Anad	Melanoma	5,7

Ejemplo 3

Actividad in vivo

Se estudió el efecto antitumoral de ITF 2357 midiendo la capacidad del compuesto para reducir el crecimiento del melanoma murino B16-BL6.

El tumor B16-BL6 es una variante muy metastásica (Sciumbata T. y col. Invasión and Metastasis 1996; 16:132-143) del tumor original y crece subcutáneamente en el ratón sinérgico C57BL/6 (Gutman M y col. Cancer Biother. 1994; 9(2): 163-170).

Se inocularon subcutáneamente células de tumor B16-BL6 en ratones hembra C57BL/6 (10 animales/grupo, peso 20-22 gramos) a la dosis de 2×10^5 células/ratón. Se administró oralmente ITF 2357 disuelto en agua, a las dosis indicadas, 10 minutos antes del inóculo de las células tumorales y luego diariamente durante 6 días a la semana. El crecimiento del tumor se expresó como peso del tumor, midiendo dos veces por semana, por medio de un calibre, los dos diámetros perpendiculares de los nódulos. El peso se calculó según la fórmula: $(\text{diámetro } 1 \times \text{diámetro } 2)^2 / 2$ según se describe en Giovazzi R. y col. Cancer Res. 1986; 46: 1928-1933.

Los resultados obtenidos se reseñan en la figura adjunta.

Se puede observar que ITF 2357 ejerce un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre el crecimiento del tumor, puesto que redujo aproximadamente un 50% el volumen del nódulo tumoral después de 15 días de tratamiento.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de ácido 4-[(6-dietilaminometil)naft-2-ilmetiloxicarbamoil]benzohidroxámico o una sal aceptable del mismo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de neoplasias.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichas neoplasias se seleccionan entre melanomas, carcinomas de colon, pulmón y mama, neuroblastomas, sarcomas y leucemia.

10 3. Uso según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicha leucemia se selecciona entre eritroleucemia y leucemia promielocítica aguda.

15 4. Uso según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el ácido 4-[(6-dietilaminometil)naft-2-ilmetiloxicarbamoil]benzohidroxámico o la sal aceptable del mismo se administran en combinación con otros agentes antineoplásicos.

20

25

30

35

40

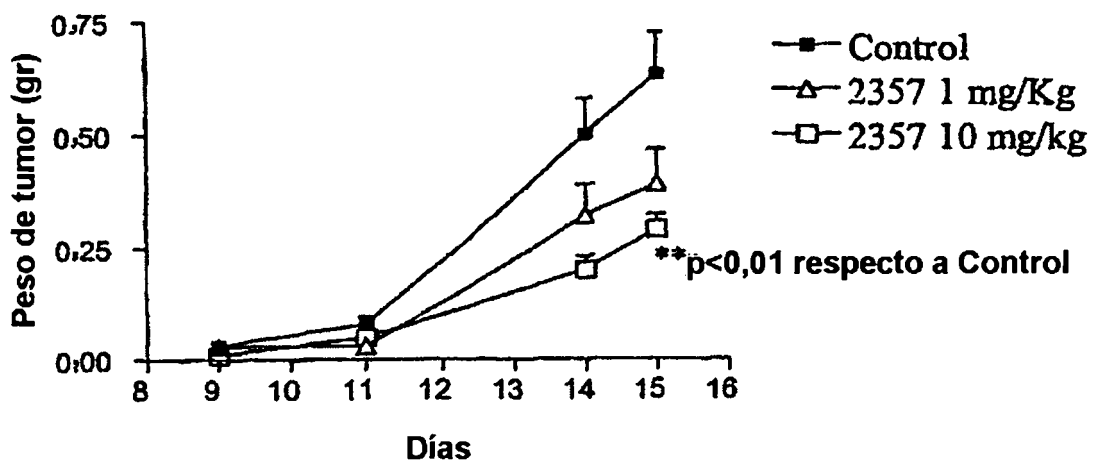
45

50

55

60

65



Figura