



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 11 888 T2** 2007.12.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 583 523 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 11 888.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP03/14171**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 782 390.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/064824**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.12.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.08.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.10.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/165** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

MI20030064 17.01.2003 IT

(73) Patentinhaber:

Italfarmaco S.p.A., Mailand/Milano, IT

(74) Vertreter:

Becker, Kurig, Straus, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**LEONI, Flavio, I-20153 Milano, IT; MASCAGNI,
Paolo, I-20058 Villasanta, IT**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON HYDROXAMSÄUREDERIVATEN ZUR HERSTELLUNG VON ANTITUMOR-
ARZNEIMITTELN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

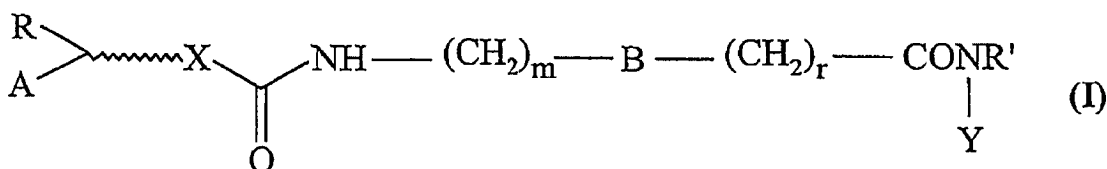
Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Hydroxamsäurederivates, welches einen Amidobenzoe Rest nach Anspruch 1 für die Herstellung von Anti-Tumor Medikamenten enthält.

[0002] Einen Amidobenzoe-Rest enthaltende Hydroxamsäurederivate werden in der EP 901465 als mögliche Medikamente mit anti-entzündlicher bzw. entzündungshemmender und immunsuppressiver Aktivität offenbart, welche der Inhibierung der Herstellung entzündungsförderlicher Cytokine, insbesondere Tumor Nekrosefaktor und Interleukin-1-Beta, zugeschrieben werden kann.

[0003] Die Derivate werden durch die nachstehende allgemeine Formel (I) beschrieben



worin

R' Wasserstoff oder (C₁₋₄)alkyl ist;

A Adamantyl oder ein mono-, bi- oder tricyclischer Rest ist, welcher wahlweise teilweise oder vollständig ungesättigt sein kann, welcher ein oder mehrere Heteroatome enthält ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus N, S oder O, und wahlweise mit Hydroxy, Alkanoyloxy, primärem, sekundärem oder tertiärem Amino, Amino(C₁₋₄)alkyl, mono- oder di-(C₁₋₄)Alkyl-amino(C₁₋₄)alkyl, Halogen, (C₁₋₄)alkyl, tri(C₁₋₄)Alkylammonium-(C₁₋₄)alkyl substituiert ist;

~~~~ eine Kette aus 1 bis 5 Kohlenstoffatomen ist, welche wahlweise eine Doppelbindung oder eine NR' Gruppe umfasst, worin R' wie vorstehend definiert ist;

R Wasserstoff oder Phenyl ist;

X ein Sauerstoffatom oder eine NR' Gruppe ist, worin R' entweder wie vorstehend definiert ist oder fehlt;

r und m unabhängig 0, 1 oder 2 sind;

B ein Phenylen oder ein Cyclohexylen Ring ist;

Y Hydroxy oder eine Amino(C<sub>1-5</sub>)alkylkette ist, welche wahlweise durch ein Sauerstoffatom unterbrochen ist; mit der Ausnahme, dass eine tricyclische Gruppe, wie für A definiert, nur Fluorenyl ist, falls zur gleichen Zeit X von O verschieden und Y von Hydroxy verschieden ist, es sei denn, dass Fluorenyl mit einer tri(C<sub>1-4</sub>)Alkylammonium(C<sub>1-4</sub>)alkyl Gruppe substituiert ist.

**[0004]** Bevorzugte Verbindungen mit Formel (I) sind jene, bei welchen R' Wasserstoff ist, A wahlweise substituiertes Phenyl oder 1- oder 2-Naphthyl, Cyclohexyl, 1- oder 2- 1,2,3,4-Tetrahydronaphthyl, Adamantyl, Quinoliny, Isoquinoliny, 1- oder 2-Indenyl, Tetrahydroquinoliny, Tetrahydroisoquinoliny ist.

**[0005]** Verbindungen (I) sind am meisten bevorzugt, bei welchen A Phenyl oder 1- oder 2-Naphthyl ist, R Phenyl ist oder Wasserstoff ist, falls A 1- oder 2-Naphthyl ist.

**[0006]** Die Verbindungen können durch Verfahren hergestellt werden, die in der EP 901465 offenbart sind.

**[0007]** Uesato, Shinichi et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12(10) (2002), 1347-1349 offenbaren, dass bei Verwendung von Tranexamsäure als Ausgangsmaterial eine Reihe von N-Hydroxycarboxamiden auf der Suche nach neuen Histondeacetylase (HDAC) Inhibitoren synthetisiert wurden. Weiterhin ergab Strukturoptimierung unter Einbezug der Ersetzung der 1,4-Cyclohexylen Gruppe mit der 1,4-Phenylen Gruppe die viel versprechenden HDAC Inhibitoren, welche ein terminales bicyclisches Arylamid aufweisen.

**[0008]** Die WO 01/38322 beschreibt ebenso Verbindungen und Verfahren zur Inhibierung der enzymatischen Aktivität der Histondeacetylase und zur Behandlung von Zellproliferations-Erkrankungen und Zuständen.

**[0009]** [Fig. 1](#) zeigt die anti-Tumor Wirkung von ITF 2357 durch Bestimmen der Befähigung der Verbindung das Wachstum des Melanoms B16-BL6 der Maus zu verringern.

**[0010]** Es wurde nun gefunden, dass die Verbindung 4-[(6-Diethylaminomethyl)naphth-2-ylmethoxy-carbamoyl]benzohydroxamsäure oder ein annehmbares Salz davon für die Behandlung von Neoplasien verschiedenen Ursprungs verwendet werden kann, insbesondere von Melanomen, Darm-, Lungen- und Brust-Karzinomen, Neuroblastomen, Sarkomen und verschiedenen Formen von Leukämie (Erythroleukämie, akute promye-

loische Leukämie) bei einer oder mehrfachen täglichen Dosen im Bereich von 1 bis 500 mg, in Abhängigkeit von der Erkrankung und pharmazeutischen und toxikologischen Charakteristika der betrachteten Verbindung, welche als geeignete Formulierungen durch die orale, parenterale oder topische Route, beispielsweise durch direkte Perfusion an der Stelle der Tumoreläsion, verabreicht werden kann. Die Verbindung nach Anspruch 1 kann darüber hinaus in Kombination mit anderen bekannten antineoplastischen Agenzien gemäß Polychemotherapie-Protokollen verabreicht werden.

**[0011]** Die Aktivität der Verbindung nach Anspruch 1 wurde in vitro mit kultivierten Tumor Zelllinien und in vivo mit dem Versuchsmodell der Melanome B16-BL6 der Maus gezeigt. Die nachstehenden Beispiele zeigen die Erfindung ausführlicher.

#### Beispiel 1 (in vitro Aktivität)

**[0012]** Die Anti-Tumor Wirkung der Verbindung von Beispiel 12 der EP 901465, 4-[6-(Diethylaminomethyl)napht-2-ylmethoxyloxycarbonyl]benzohydroxamsäure Hydrochlorid (ITF 2357), wurde durch Bestimmen der Befähigung der Verbindung das Wachstum von Tumor Zelllinien verschiedenen Histotyps zu inhibieren in vitro getestet, welche sowohl von festen Tumoren als auch hämatologischen Tumoren abgeleitet sind. Die verwendeten Zelllinien waren: A549 (pulmonares Karzinom), MDA-MB435 (Brustkarzinom) und KG-1 (myeloische Leukämie).

**[0013]** A549 und MDA-MB435 Zellen (welche jeweils in E-MEM und D-MEM Kultivierungsmedium wachsen gelassen wurden, das mit 10% fötalem Kälberserum ergänzt ist) wurden in Platten mit 96 Vertiefungen mit flachem Boden (5000 Zellen/Vertiefung) platziert und ermöglicht für 4 Stunden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre anzuhaften bzw. anzuwachsen. Danach wurde ITF 2357 bei verschiedenen Dosen zu jeder Vertiefung (4 Wiederholungen) hinzugegeben. Nach weiteren 36 Stunden wurde tritiiertes Thymidin (1 µCi/Vertiefung) zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für die folgenden 12 Stunden darin belassen. Danach wurden die Zellen 3 Mal mit Kulturmedium gewaschen und anschließend mit 1N NaOH für 30 Minuten solubilisiert.

**[0014]** Ein Flüssig Szintillation Betazähler wurde für ein Bestimmen der in jeder Probe enthaltenen Radioaktivität verwendet, welche zu der DNA Synthese und damit zu einer Zellproliferation direkt proportional ist. KG-1 Zellen, welche in RPMI 1640 Kultivierungsmedium wachsen gelassen wurden, welches mit 5% fötalem Kälberserum ergänzt ist, wurden in Platten mit 96 Vertiefungen mit flachen Böden (250000 Zellen/Vertiefung) platziert. ITF 2357 wurde bei verschiedenen Dosen sofort hinzugegeben und nach 36 Stunden wurde tritiiertes Thymidin zu jeder Vertiefung (1 µCi/Vertiefung) hinzugegeben und für die folgenden 12 Stunden darin belassen. Schließlich wurden die Zellen mit einem Zellernter gesammelt und die in jeder Probe enthaltene Radioaktivität, welche zu der DNA Synthese und damit zu einer Zellproliferation direkt proportional ist, wurde mit einem Flüssig Szintillation Betazähler bestimmt.

**[0015]** Die Wirkung von verschiedenen Dosen von ITF2357 wurde als Prozentsatz einer Inhibierung einer radioaktiven Aufnahme im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Die Konzentration, welche eine 50% Zellwachstums-Inhibierung (IC<sub>50</sub>) induzieren kann, wurde anschließend durch lineare Regression bestimmt.

**[0016]** Die erhaltenen Ergebnisse werden in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

| Zelllinie             | A549 | MDA-MB435 | KG-1 |
|-----------------------|------|-----------|------|
| IC <sub>50</sub> (nM) | 495  | 73        | 552  |

**[0017]** Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass ITF 2357 das Wachstum der verwendeten Zelllinien bei sehr geringen Dosierungen (Bereich 10<sup>-9</sup>M) in vitro inhibiert. Insbesondere inhibiert ITF 2357 ein Zellwachstum von sowohl von Zellen von festen Tumoren (A549 und MDA-MB435) als auch von Leukämien (KG-1), was dadurch seine Verwendung bei Tumoren verschiedenen Histotyps nahe legt.

#### Beispiel 2 (in vitro Aktivität)

**[0018]** Von menschlichen festen Tumoren verschiedenen Histotyps abgeleitete und in vitro stabilisierte Zelllinien wurden in dem nachstehenden Versuch verwendet. Insbesondere wurden drei Zelllinien von Kopf- und Nacken-Tumoren (KB, Ca127 und Hep2), zwei von Darm-Karzinomen abgeleitete Zelllinien (HT-29 und LoVo) und vier von Melanomen abgeleitete Zelllinien (Colo38, Pes41, Pes43 und Anad) untersucht.

**[0019]** Die Zellen wurden gemäß herkömmlicher Verfahren in Behältern bzw. Kolben wachsen gelassen, welche synthetisches Kultivierungsmedium enthielten, zu welchem fötales Serum bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre hinzugegeben wurde, anschließend in Platten mit 96 Vertiefungen platziert und erlaubt für einige Stunden anzuhängen. ITF 2357 wurde in dreifacher Ausfertigung bei zunehmenden Dosen zu jeder Vertiefung hinzugegeben und die Zellen wurden für weitere 72 Stunden inkubiert. Lebensfähige Zellen wurden durch Einfärben mit Sulforhodamin B markiert und ihre Menge wurde durch spektrophotometrische Bewertung des Farbstoffgehalts in jeder Vertiefung bestimmt. Die Wirkung von ITF 2357 wurde als Prozentsatz einer Inhibierung bei jeder Konzentration der Farbstoff-Aufnahme in ITF 2357 enthaltende Vertiefungen im Vergleich zu Kontrollvertiefungen (Zellen ohne Arzneimittel) berechnet. IC<sub>50</sub> Werte von ITF 2357 wurde mit der Software Calcsyn (Biosoft) gemäß Dosis-Reaktions-Kurven berechnet.

| Zelllinie | Tumor Ursprung | ITF 2357 IC <sub>50</sub> (µM) |
|-----------|----------------|--------------------------------|
| KB        | Kopf-Nacken    | 0,64                           |
| Ca127     | Kopf-Nacken    | 3,4                            |
| Hep-2     | Kopf-Nacken    | 1                              |
| HT-29     | Darm-Karzinom  | 0,7                            |
| LoVo      | Darm-Karzinom  | 2,5                            |
| Colo38    | Melanom        | 2,38                           |
| Pes41     | Melanom        | 1,6                            |
| Pes43     | Melanom        | 1,4                            |
| Anad      | Melanom        | 5,7                            |

Beispiel 3 (in vivo Aktivität)

**[0020]** Die Anti-Tumor Wirkung von ITF 2357 wurde unter Bestimmen der Befähigung der Verbindung untersucht, das Wachstum des Melanoms B16-BL6 der Maus zu verringern.

**[0021]** Der B16-BL6 Tumor ist eine hoch Metastasen-Bildende Variante (Sciumbata T. et al., Invasion and Metastasis, 16 (1996) 132-143) des nativen Tumors B16 und er wächst subkutan in der syngenischen Maus C57BL/6 (Gutman M. et al., Cancer Biother., 9(2) (1994) 163-170).

**[0022]** B16-BL6 Tumorzellen wurden in weibliche C57BL/6 Mäuse (10 Tiere/Gruppe, Gewicht 20-22 Gramm) bei der Dosis von  $2 \times 10^5$  Zellen/Maus subkutan inokuliert. In Wasser gelöstes ITF2357 wurde mit den angezeigten Dosen 10 Minuten vor dem Inoculum der Tumorzellen und anschließend täglich für 6 Tage eine Woche oral verabreicht. Das Tumorwachstum wurde als Tumorgewicht ausgedrückt, welches zweimal in einer Woche durch einen Kaliber, die zwei perpendikularen Durchmesser der Knötchen (nodules), bestimmt wurde. Das Gewicht wurde gemäß der Formel:  $(\text{Durchmesser } 1 \times \text{Durchmesser } 2)^2/2$ , wie in Giavazzi R. et al., Cancer Res., 46 (1986) 1928-1933 beschrieben, berechnet.

**[0023]** Die erzielten Ergebnisse sind in der beigefügten Figur angezeigt.

**[0024]** Es kann beobachtet werden, dass ITF 2357 eine Dosis-abhängige inhibitorische Wirkung auf das Tumorwachstum ausübt, da es um 50% des Volumens des Tumorknötchens nach 15 Tage Behandlung verringert.

### Patentansprüche

1. Verwendung von 4-[6-Diethylaminomethyl)naphth-2-ylmethoxy]carbonyl]benzohydroxamsäure oder ein annehmbares Salz davon zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Neoplasien.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Neoplasien ausgewählt sind unter Melanomen, Darm-, Lungen- und Brust-Karzinomen, Neuroblastomen, Sarkomen und Leukämien.

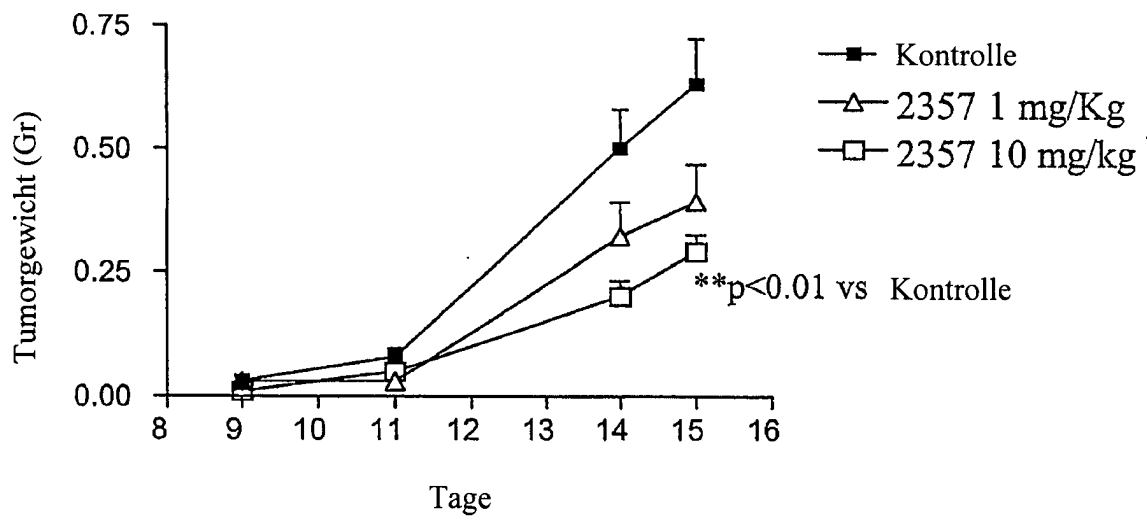
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Leukämie ausgewählt ist unter Erythroleukämie und akuter promyelotischer Leukämie.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß 4-[6-Diethylaminomethyl)naphth-2-ylmethoxy]carbonyl]benzohydroxamsäure oder das annehmbare Salz davon zusammen mit

anderen anti-neoplastischen Mitteln verabreicht wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur