

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 823**

51 Int. Cl.:

**C07D 513/18** (2006.01)

**C07K 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08829476 .4**

96 Fecha de presentación: **09.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2190449**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **Compuestos macrocíclicos y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:

**09.09.2007 US 970986 P**

**03.01.2008 US 9903 P**

**24.02.2008 US 30993 P**

**24.04.2008 US 125542 P**

**15.08.2008 US 189093 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**28.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**28.12.2012**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
P.O. Box 115500 Gainesville  
Florida 32611-5500 , US**

72 Inventor/es:

**LUESCH, HENDRIK;  
PAUL, VALERIE, J. y  
TAORI, KANCHAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 393 823 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

Compuestos macrocíclicos y métodos de tratamiento

## ANTECEDENTES

5 La identificación de nuevos farmacóforos es de suma importancia biomédica y, en este empeño, los productos naturales han recuperado recientemente gran atención.<sup>1</sup> Este renacimiento está íntimamente ligado a la exitosa explotación del ambiente marino, el cual alberga una incomparable biodiversidad que es supuestamente concomitante con una diversidad química.<sup>2</sup> En particular, las cianobacterias marinas son prolíficos productores de metabolitos secundarios bioactivos,<sup>3</sup> muchos de los cuales son péptidos modificados o híbridos de péptido-policétido con prometedoras actividades antitumorales, tales como dolastatina 10,<sup>4</sup> curacina A,<sup>5</sup> y apratoxina A.<sup>6</sup> Como resultado de continuas investigaciones para identificar nuevas pistas de fármacos procedentes de cianobacterias en Florida, presentamos aquí la determinación estructural y una caracterización biológica preliminar de un metabolito cianobacteriano marino con un nuevo andamio químico y una actividad antiproliferativa nanomolar. Estos hallazgos proporcionan nuevas alternativas para afrontar las insatisfechas necesidades en el tratamiento de enfermedades y trastornos de la proliferación. También se ha hallado ahora que los presentes compuestos median en procesos de la histona desacetilasa (HDAC; del inglés, histone deacetylase) (por ejemplo, inhibición) y que, como tales, son útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos o síntomas de los mismos, mediado por inhibición de la histona desacetilasa (HDAC). Estos hallazgos proporcionan nuevas alternativas para afrontar las necesidades insatisfechas en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por HDAC.

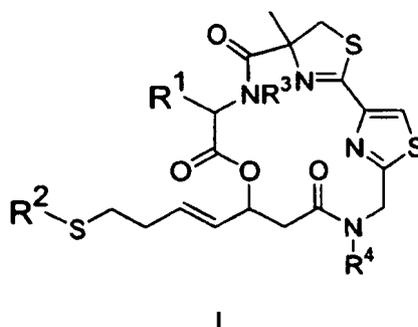
En el Documento US 2007/18507112 se describen compuestos con similitud estructural.

## 20 BREVE SUMARIO DEL INVENTO

El invento se dirige hacia compuestos macrocíclicos, y métodos para tratar enfermedades y trastornos, incluyendo enfermedades y trastornos de la proliferación, y enfermedades y trastornos mediados por HDAC, mediante el uso de los compuestos y composiciones de los mismos.

25 El invento se dirige hacia compuestos macrocíclicos, métodos para modular la actividad de proliferación, y métodos para tratar enfermedades y trastornos de la proliferación.

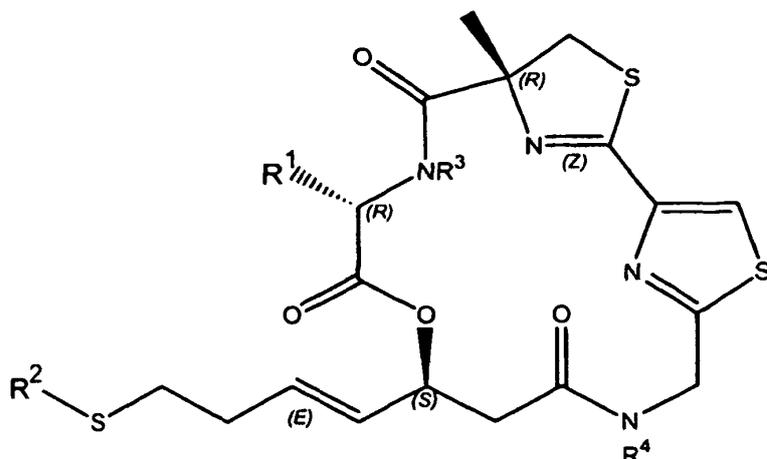
En una realización, el invento proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



en que:

- 30 cada R es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido;  
 cada R<sup>1</sup> es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido;  
 cada R<sup>2</sup> es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido o C(O)R;  
 cada R<sup>3</sup> es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido, C(O)OR o C(O)NRR; y  
 cada R<sup>4</sup> es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido, C(O)OR o C(O)NRR;
- 35 y sales, solvatos o hidratos del mismo farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto es un compuesto de fórmula Ia (y sales, solvatos o hidratos del mismo farmacéuticamente aceptables), en que R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se definen en la fórmula I:



Fórmula Ia

Otras realizaciones incluyen un compuesto de cualquiera de las fórmulas presentes, en que  $R^3$  y  $R^4$  son H; en que  $R^1$  es isopropilo; en que  $R^2$  es alquilo; en que  $R^2$  es alquil-C(O)-; en que  $R^2$  es H; en que el compuesto es cualquiera de los Compuestos 1-8 de la Tabla A; o en que el compuesto es largazol.

En ciertos casos, los compuestos del invento son seleccionados de entre los siguientes de fórmula (I) (incluyendo la fórmula Ia) que tienen la estructura:

Tabla A

Nº de compuesto	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$
1	isopropilo	n-heptil-C(O)-	H	H
2	isopropilo	n-heptil-C(O)-	H	Me
3	isopropilo	Me	H	H
4	isopropilo	n-heptil-C(O)-	H	metil-C(O)-
5	isopentilo	n-heptil-C(O)-	H	H
6	etilo	n-heptil-C(O)-	Me	Me
7	isopropilo	CH <sub>3</sub> C(O)-	H	H
8	isopropilo	H	H	H

En otro aspecto, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otros aspectos, el invento proporciona un método para tratar una enfermedad, trastorno o síntoma de los mismos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto de cualquiera de las fórmulas presentes (por ejemplo, la fórmula I o la fórmula Ia). En otro aspecto, el compuesto se administra en una cantidad y bajo unas condiciones suficientes para mejorar la enfermedad, el trastorno o el síntoma de los mismos en un sujeto.

En otros aspectos, el invento proporciona un método para modular la actividad HDAC en un sujeto, que comprende poner el sujeto en contacto con un compuesto de cualquiera de las fórmulas presentes (por ejemplo, la fórmula I o la fórmula Ia) en una cantidad y bajo unas condiciones suficientes para modular la actividad HDAC. En otro aspecto, la modulación es una inhibición.

En otros aspectos, el invento proporciona un método para modular la actividad de proliferación en un sujeto, que comprende poner el sujeto en contacto con un compuesto de fórmula I en una cantidad y bajo unas condiciones suficientes para modular la actividad de proliferación.

En un aspecto, el invento proporciona un método para tratar a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o una enfermedad relacionados con la proliferación, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I.

5 En otro aspecto, el invento proporciona un método para tratar a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o una enfermedad relacionados con una actividad relacionada con la proliferación, en que el sujeto ha sido identificado por estar necesitado de un tratamiento para un trastorno o una enfermedad relacionados con la proliferación, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I a dicho sujeto que lo necesita, por lo que dicho sujeto es tratado en cuanto a dicho trastorno.

10 En otro aspecto, el invento proporciona un método para tratar a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o una enfermedad relacionados con la proliferación celular, en que el sujeto ha sido identificado por estar necesitado de un tratamiento para un trastorno o una enfermedad relacionados con la proliferación celular, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I a dicho sujeto que lo necesita, por lo que se modula (por ejemplo, se infrarregula) la proliferación celular en dicho sujeto. En otro aspecto, los compuestos aquí descritos se dirigen preferentemente a células cancerosas en vez de a células no transformadas.

15 En un aspecto específico, el invento proporciona un método para tratar el cáncer, el crecimiento tumoral, el cáncer de colon, de mama, de huesos, de cerebro y otros (por ejemplo, osteosarcoma, neuroblastoma y adenocarcinoma de colon), que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto aquí descrito (por ejemplo, de fórmula I) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Otros cánceres que pueden ser tratados mediante las composiciones y métodos del invento incluyen cáncer cardiaco (por ejemplo, sarcoma, mixoma, rabioma, fibroma, lipoma y teratoma); cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico, carcinoma alveolar, adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso y mesotelioma); diversos cánceres gastrointestinales (por ejemplo, cánceres de esófago, estómago, páncreas, intestino delgado e intestino grueso); cáncer del tracto genitourinario (por ejemplo, de riñón, vejiga y uretra, próstata y testículo); cáncer de hígado (por ejemplo, hepatoma, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular y hemangioma); cáncer de huesos (por ejemplo, sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno, linfoma cutáneo de células T, mieloma múltiple, cordoma tumoral maligno de células gigantes, osteocondroma, condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes); cánceres del sistema nervioso (por ejemplo, del cráneo, las meninges, el cerebro y la médula espinal); cánceres ginecológicos (por ejemplo, de útero, cérvix, ovarios, vulva y vagina); cáncer hematológico (por ejemplo, cánceres relativos a la sangre, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin); cáncer de piel (por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevi displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides y psoriasis); y cánceres de las glándulas suprarrenales (por ejemplo, neuroblastoma). Otras enfermedades y trastornos que pueden ser tratados incluyen trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, infecciones por protozoos e infecciones virales latentes, y trastornos (fibro)proliferativos.

En otro aspecto, el invento proporciona un método para inhibir la histona desacetilasa (HDAC) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto aquí descrito (por ejemplo, de fórmula I) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

40 En otro aspecto, el invento proporciona un método para el tratamiento de enfermedades, trastornos o síntomas de los mismos mediado por inhibición de la histona desacetilasa (HDAC) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto aquí descrito (por ejemplo, de fórmula I) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Recientemente, se ha hallado que los inhibidores de HDAC mejoran el progreso de los modelos de atrofia muscular espinal (SMA; del inglés, spinal muscular atrophy), enfermedad de la neurona motora y enfermedad de Huntington en ratón. Parece que la función neuroprotectora de los inhibidores de HDAC se extiende a otras enfermedades que comparten mecanismos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis de células neuronales. Los inhibidores de HDAC también presentan amplios efectos moduladores sobre la expresión génica en el sistema inmune y han sido exitosamente utilizados en los modelos de las enfermedades autoinmunes lupus y artritis reumatoide. Recientemente, se ha establecido la eficacia de la tricostatina A, un inhibidor de HDAC, en cuanto a mejorar la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE; del inglés, experimental autoimmune encephalomyelitis) y el modelo animal de esclerosis múltiple (MS; del inglés, multiple sclerosis). En ciertos aspectos, los compuestos presentes son útiles para tratar la MS, una enfermedad autoinmune, desmielinizante y degenerativa del sistema nervioso central (CNS; del inglés, central nervous system) humano. En ciertos aspectos, los compuestos presentes son útiles para tratar el accidente cerebrovascular. En otros aspectos, los compuestos inhibidores de HDAC son útiles para tratar o prevenir la pérdida de memoria, para inducir neurogénesis, para potenciar la retención de memoria, para potenciar la formación de memoria, para aumentar el potencial o la transmisión sinápticas, o para aumentar la potenciación a largo plazo (LTP; del inglés, long term potential). Las histona desacetilasas (HDAC) están también asociadas con una diversidad de represores transcripcionales que controlan la diferenciación y la proliferación celulares. La modulación de la expresión génica a través de la inhibición de HDAC puede controlar el destino de las células madre y afectar a la diferenciación, la desdiferenciación o la transdiferenciación. De este modo, los compuestos presentes son útiles para mejorar la eficacia de la reprogramación; permitir

una inducción eficaz de células madre pluripotenciales; hacer que las células madre pluripotenciales dejen de proliferar y entren en vías de diferenciación terminal; inhibir la diferenciación hasta oligodendrocitos, donde la actividad HDAC2 inhibe específicamente la diferenciación hasta astrocitos mientras que es necesaria la actividad HDAC1 para la diferenciación hasta neuronas; potenciar la diferenciación en terapia con células madre; su utilización como suplementos de medio que estabilicen el fenotipo de células primarias en cultivo; estimular la maduración de osteoblastos; implementar la construcción de tejido óseo; inducir la diferenciación miogénica; suprarregular la actividad basal de la transcripción a partir de un informador sensible a MyoD; e inducir la expansión *ex vivo* de células madre hematopoyéticas (HSC; del inglés, hematopoietic stem cells) humanas. En ciertos aspectos, los compuestos presentes son útiles para tratar en un sujeto estados que incluyen, pero no se limitan a, miogénesis, neurogénesis, osteogénesis y maduración de osteoblastos.

En otro aspecto, el invento proporciona un método para tratar enfermedades, trastornos o síntomas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto aquí descrito (por ejemplo, de fórmula I) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Dichos métodos son útiles para tratar la pérdida de memoria, inducir neurogénesis, potenciar la retención de memoria, potenciar la formación de memoria, aumentar el potencial o la transmisión sinápticas, o aumentar la potenciación a largo plazo (LTP). Dichos métodos son también útiles para tratar enfermedades y trastornos asociados con el destino de las células madre y que son afectados por la diferenciación, la desdiferenciación o la transdiferenciación, y, por lo tanto, incluyen, pero no se limitan a, miogénesis, neurogénesis, osteogénesis y maduración de osteoblastos.

En otro aspecto, los compuestos de cualesquiera de las fórmulas presentes [por ejemplo, de fórmula (I)] son compuestos que presentan selectividad hacia HDAC de clase I y son por ello útiles como agentes anticancerosos, y, además de presentar selectividad hacia HDAC de clase I frente a HDAC de clase II, proporcionan también un perfil terapéutico más deseable ya que se indica que la inhibición de ciertas HDACs específicas de clase II puede tener consecuencias indeseables, incluyendo, por ejemplo, la promoción de hipertrofia cardíaca. Véanse, Furumai et al., *Cancer Research* 2002, 62, 4916-4921; y Yurek-George et al., *J. Med. Chem.* 2007, 50, 5720-5726. De esta manera, en un aspecto, los compuestos y métodos presentes son aquellos en que los compuestos presentan selectividad en cuanto a la selectividad hacia HDAC de clase I/clase II (por ejemplo, al menos 2 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor, o al menos X veces mayor, siendo X cualquier número entre 1 y 100.000 inclusive).

Los métodos aquí descritos incluyen aquellos en que el sujeto es identificado por tener necesidad de un tratamiento expuesto particular. La identificación de la necesidad de dicho tratamiento en un sujeto puede radicar en el juicio de un sujeto o un profesional de la asistencia sanitaria y puede ser subjetiva (por ejemplo, una opinión) u objetiva (por ejemplo, mensurable mediante una prueba o un método diagnóstico).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El presente invento es adicionalmente descrito a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no restrictivos y con referencia a las siguientes figuras, en que:

La Figura 1 representa vías de disociación del largazol y estructuras de productos iónicos.

La Figura 2 representa resultados de la inhibición de HDAC.

Las Figuras 3-9 son espectros de resonancia magnética nuclear (NMR; del inglés, nuclear magnetic resonance) del largazol.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### Definiciones

Con objeto de que el invento pueda ser entendido más fácilmente, se definen primero aquí ciertos términos por conveniencia.

Como aquí se utiliza, el término "tratar" un trastorno abarca prevenir, mejorar, mitigar y/o gestionar el trastorno y/o los estados que pueden causar el trastorno. El término "tratamiento" se refiere a un método para aliviar o mitigar una enfermedad y/o sus síntomas concomitantes. De acuerdo con el presente invento, "tratar" incluye prevenir, bloquear, inhibir, atenuar, proteger frente a, modular, invertir los efectos de, y reducir la aparición de, por ejemplo, los efectos nocivos de un trastorno.

Como aquí se usa, "inhibir" abarca prevenir, reducir y detener la progresión.

El término "modular" se refiere a aumentos o disminuciones de la actividad de una célula en respuesta a la exposición a un compuesto del invento.

Las expresiones "aislado", "purificado" y "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancial o esencialmente exento de los componentes que lo acompañan normalmente cuando se encuentra en su estado nativo. La

pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida y cromatografía de alta eficacia en fase líquida. Particularmente, en las realizaciones, el compuesto tiene una pureza de al menos 85%, más preferiblemente una pureza de al menos 90%, más preferiblemente una pureza de al menos 95% y muy preferiblemente una pureza de al menos 99%.

5 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan aquí indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácido son compuestos miméticos químicos artificiales de los correspondientes aminoácidos presentes en la naturaleza, así como a polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza y polímeros de aminoácidos no presentes en la naturaleza.

10 Un "péptido" es una secuencia de al menos dos aminoácidos. Los péptidos pueden consistir en secuencias de aminoácidos cortas y también largas, incluyendo las proteínas.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos presentes en la naturaleza y aminoácidos sintéticos, así como a compuestos análogos de aminoácido y compuestos miméticos de aminoácido que actúan de una manera similar a la de los aminoácidos presentes en la naturaleza. Los aminoácidos presentes en la naturaleza son los codificados por el código genético así como los aminoácidos que son modificados más tarde, tales como, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. "Compuestos análogos de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que los aminoácidos presentes en la naturaleza, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tales como, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido y metionina-metil-sulfonio. Dichos compuestos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, la norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que los aminoácidos presentes en la naturaleza. "Compuestos miméticos de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es distinta de la estructura química general de un aminoácido pero que actúan de una manera similar a la de los aminoácidos presentes en la naturaleza.

25 El término "proteína" se refiere a una serie de restos de aminoácido conectados entre sí por enlaces peptídicos entre grupos amino y carboxilo alfa de restos adyacentes.

A los aminoácidos se puede hacer referencia aquí por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

30 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, quien tiene experiencia reconocerá que una sustitución, supresión o adición individual en una secuencia peptídica, polipeptídica o proteica que altera, añade o suprime un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada" cuando la alteración da lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica son bien conocidas las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares.

35 Las estructuras macromoleculares tales como las estructuras polipeptídicas pueden ser descritas en términos de diversos niveles de organización. Para una discusión general sobre esta organización, véanse, por ejemplo, Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell* (3ª edición, 1994), y Cantor y Schimmel, *Biophysical Chemistry Part I. The Conformation of Biological Macromolecules* (1980). La "estructura primaria" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido concreto. La "estructura secundaria" se refiere a estructuras tridimensionales localmente ordenadas en un polipéptido. Estas estructuras son comúnmente conocidas como "dominios". Los dominios son porciones de un polipéptido que forman una unidad compacta del polipéptido y tienen típicamente una longitud de 50 a 350 aminoácidos. Los dominios típicos están compuestos de secciones de menor organización tales como tramos de láminas  $\beta$  y hélices  $\alpha$ . La "estructura terciaria" se refiere a la estructura tridimensional completa de un monómero polipeptídico. La "estructura cuaternaria" se refiere a la estructura tridimensional formada por la asociación no covalente de unidades terciarias independientes. Los términos anisotrópicos son también conocidos como términos de energía.

45 El término "administración" incluye las vías de introducción de el(los) compuesto(s) en un sujeto para que lleve(n) a cabo su función prevista. Los ejemplos de vías de administración que se pueden utilizar incluyen las vías por inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal e intratecal), tópica, oral, por inhalación, rectal y transdérmica.

50 La expresión "cantidad eficaz" incluye una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado deseado. Una cantidad eficaz de un compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como el estado morbosos, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para obtener la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también una con la que los efectos tóxicos o perjudiciales (por ejemplo, los efectos secundarios) del compuesto inhibidor de elastasa pesan menos que los efectos terapéuticamente beneficiosos.

55 Las frases "administración sistémica" "sistémicamente administrado", "administración periférica" y "periféricamente administrado", como aquí se usan, significan la administración de un(os) compuesto(s), un fármaco u otro material

de modo que entre en el sistema del paciente y, por lo tanto, sea sometido al metabolismo y otros procesos similares.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto que se administra que es suficiente para evitar el desarrollo, o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas, del estado o trastorno que se trata.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto (es decir, una dosificación eficaz) puede variar de aproximadamente 0,005 µg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 500 nM. El técnico experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo, un sujeto es tratado con un compuesto en el intervalo de entre aproximadamente 0,005 µg/kg y aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, y aún más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. También se apreciará que la dosificación eficaz de un compuesto utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse a su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles a su imagen especular.

El término "diastereómeros" se refiere a estereoisómeros con dos o más centros de disimetría y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí.

El término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla equimolar de dos enantiómeros es denominada "mezcla racémica" o "racemato".

El término "isómeros" o "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica pero que difieren en cuanto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

El término "profármaco" incluye compuestos con grupos que pueden ser metabolizados *in vivo*. Generalmente, los profármacos son metabolizados *in vivo* por esterasas o por otros mecanismos hasta fármacos activos. Los ejemplos de profármacos y sus usos son bien conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Berge et al. (1977), "Pharmaceutical Salts", J. Phar. Sci. 66: 1-19]. Los profármacos pueden ser preparados *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o al hacer reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente esterificante adecuado. Los grupos hidroxilo pueden ser convertidos en ésteres por medio de tratamiento con un ácido carboxílico. Los ejemplos de grupos de profármaco incluyen grupos éster de alquilo inferior sustituido y no sustituido, ramificado o no ramificado (por ejemplo, ésteres del ácido propiónico), ésteres de alqueno inferior, ésteres de dialquilo inferior-amino-alquilo inferior (por ejemplo, un éster de dimetilaminoetilo), ésteres de acilamino-alquilo inferior (por ejemplo, un éster de acetiloximetilo), ésteres de aciloxi-alquilo inferior (por ejemplo, un éster de pivaloiloximetilo), ésteres arílicos (un éster fenílico), ésteres de aril-alquilo inferior (por ejemplo, un éster de bencilo), ésteres de arilo y aril-alquilo inferior sustituidos (por ejemplo, con sustituyentes metilo, halo o metoxilo), amidas, alquilo inferior-amidas, dialquilo inferior-amidas, e hidroxiamidas. Los grupos de profármaco preferidos son ésteres del ácido propiónico y ésteres acílicos. También se incluyen profármacos que son convertidos *in vivo* en formas activas a través de otros mecanismos. En ciertos aspectos, los compuestos del invento son profármacos de cualesquiera de las fórmulas presentes.

El término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Además, los compuestos del invento incluyen olefinas que tienen cualquier geometría: "Z" se refiere a lo que es referido como conformación "cis" (mismo lado), mientras que "E" se refiere a lo que es referido como conformación "trans" (lados opuestos). Con respecto a la nomenclatura de un centro quiral, los términos de configuración "d" y "l" son como definen las IUPAC Recommendations. En cuanto al uso de los términos "diastereómero", "racemato", "epímero" y "enantiómero", se usarán en su contexto normal para describir la estereoquímica de las preparaciones.

Como aquí se usa, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 12 átomos de carbono. La expresión "alquilo inferior" se refiere a una cadena alquílica C1-C6. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, terc-butilo y n-pentilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

El término "alqueno" se refiere a una cadena hidrocarbonada insaturada, cadena que puede ser lineal o ramificada,

que contiene de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenoilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

5 El término "alquinilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada insaturada, cadena que puede ser lineal o ramificada, que contiene de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

Los carbonos  $sp^2$  y  $sp$  de un grupo alquenoilo y un grupo alquinilo, respectivamente, pueden ser opcionalmente el punto de fijación de los grupos alquenoilo y alquinilo.

El término "alcoxilo" se refiere a un radical -O-alquilo.

Como aquí se usan, los términos "halógeno", "hal" y "halo" significan -F, -Cl, -Br o -I.

10 El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado monocíclico de 3-8 miembros o bicíclico de 7-14 miembros que tiene al menos un anillo saturado o que tiene al menos un anillo no aromático, en que el anillo no aromático puede tener cierto grado de insaturación. Los grupos cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. En una realización, 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo de un grupo cicloalquilo pueden estar sustituidos con un sustituyente. Los ejemplos representativos del grupo cicloalquilo incluyen ciclopropilo, 15 ciclopentilo, ciclohexilo, ciclobutilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo y similares.

20 El término "arilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado aromático monocíclico, bicíclico o tricíclico. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. En una realización, 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de cada anillo de un grupo arilo pueden estar sustituidos con un sustituyente. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, antracenoilo, fluorenilo, indenilo, azulenoilo y similares.

25 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-4 heteroátomos anulares si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, siendo seleccionados dichos heteroátomos de entre O, N y S y siendo carbonos los restantes átomos del anillo (con apropiados átomos de hidrógeno a menos que se indique otra cosa). Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. En una realización, 0, 30 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo de un grupo heteroarilo pueden estar sustituidos con un sustituyente. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, quinoleinilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, isoquinoleinilo, indazolilo y similares.

30 El término "heterocicloalquilo" se refiere a un sistema anular no aromático monocíclico de 3-8 miembros, bicíclico de 7-12 miembros o tricíclico de 10-14 miembros que comprende 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, siendo seleccionados dichos heteroátomos de entre O, N, S, B, P y Si, en que el sistema anular no aromático está completamente saturado. Los grupos heterocicloalquilo pueden estar 35 opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. En una realización, 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo de un grupo heterocicloalquilo pueden estar sustituidos con un sustituyente. Los grupos heterocicloalquilo representativos incluyen piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, 1,3-dioxolano, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tiirenilo y similares.

40 El término "alquilamino" se refiere a un sustituyente amino que está además sustituido con uno o dos grupos alquilo. El término "aminoalquilo" se refiere a un sustituyente alquilo que está además sustituido con uno o más grupos amino. Los términos "hidroxialquilo" e "hidroxilalquilo" se refieren a un sustituyente alquilo que está además sustituido con uno o más grupos hidroxilo. La porción alquílica o arílica de los grupos alquilamino, aminoalquilo, mercaptoalquilo, hidroxialquilo, mercaptoalcoxilo, sulfonilalquilo, sulfonilarilo, alquilcarbonilo y alquilcarbonilalquilo puede estar 45 opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes.

45 Los ácidos y las bases útiles en los métodos presentes son conocidos en la técnica. Los catalizadores ácidos son cualquier producto químico ácido, que puede ser de naturaleza inorgánica (por ejemplo, los ácidos clorhídrico, sulfúrico y nítrico, y el tricloruro de aluminio) u orgánica (por ejemplo, ácido canfosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido acético y triflato de iterbio). Los ácidos son útiles en cantidades catalíticas o estequiométricas para facilitar reacciones químicas. Las bases son cualquier producto químico básico, que puede ser de naturaleza inorgánica (por 50 ejemplo, bicarbonato sódico e hidróxido potásico) u orgánica (por ejemplo, trietilamina y piridina). Las bases son útiles en cantidades catalíticas o estequiométricas para facilitar reacciones químicas.

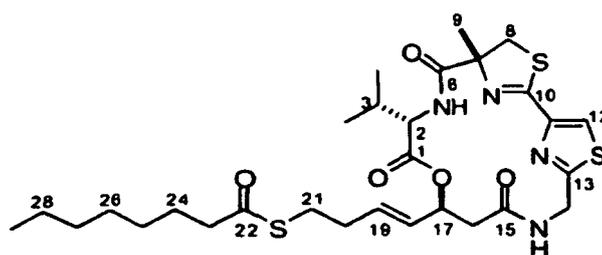
55 Los agentes alquilantes son cualquier reactivo que es capaz de efectuar la alquilación del grupo funcional en cuestión (por ejemplo, el átomo de oxígeno de un alcohol o el átomo de nitrógeno de un grupo amino). Los agentes alquilantes son conocidos en la técnica, incluyendo en las referencias aquí citadas, e incluyen haluros de alquilo (por ejemplo, yoduro de metilo y bromuro o cloruro de bencilo), sulfatos de alquilo (por ejemplo, sulfato de metilo), y otras combinaciones de grupos conocidas en la técnica que dejan grupos alquilo. Los grupos lábiles son cualquier especie estable que se puede separar de una molécula durante una reacción (por ejemplo, una reacción de eliminación o

una reacción de sustitución), son conocidos en la técnica, incluyendo en las referencias aquí citadas, e incluyen haluros (por ejemplo, I-, Cl-, Br- y F-), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, -OMe y -O-t-Bu), aniones aciloxi [por ejemplo, -OAc y -OC(O)CF<sub>3</sub>], sulfonatos (por ejemplo, mesilo y tosilo), acetamidas [por ejemplo, -NHC(O)Me], carbamatos [por ejemplo, N(Me)C(O)O-t-Bu], fosfonatos [por ejemplo, -OP(O)(OEt)<sub>2</sub>], agua o alcoholes (condiciones próticas), y similares.

En ciertas realizaciones, los sustituyentes de cualquier grupo (tales como, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo) pueden estar en cualquier átomo de ese grupo, en que cualquier grupo que puede estar sustituido (tal como, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo) puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes (que pueden ser iguales o diferentes), reemplazando cada uno a un átomo de hidrógeno. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, haloalquilo, ciano, nitro, alcoxilo, ariloxilo, hidroxilo, hidroxilalquilo, oxo (es decir, carbonilo), carboxilo, formilo, alquilcarbonilo, alquilcarbonilalquilo, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxilo, ariloxycarbonilo, heteroariloxilo, heteroariloxycarbonilo, tio, mercapto, mercaptoalquilo, arilsulfonilo, amino, aminoalquilo, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilo, alcoxycarbonilamino, alquilamino, arilamino, diarilamino, alquilcarbonilo, y arilo sustituido con arilamino; arilalquilamino, aralquilaminocarbonilo, amido, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, dialquilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, imino, carbamido, carbamilo, tioureido, tiocianato, sulfoamido, sulfonilalquilo, sulfonilarilo y mercaptoalcoxilo.

#### Compuestos del invento y elucidación de estructuras

Se recogió una muestra de *Symploca* sp. de Key Largo, Florida Keys, y se sometió a extracción con disolventes orgánicos. El extracto crudo citotóxico resultante fue sometido a un fraccionamiento, guiado por un bioensayo, mediante reparto entre disolventes, cromatografía en gel de sílice y HPLC en fase inversa, para obtener largazol (1) en forma de sólido amorfo e incoloro [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +22 (c = 0,1, MeOH).



Largazol (1)

Los datos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-NMR acoplados a un pico [M+H]<sup>+</sup> de m/z = 623,2397 en el HR-ESI/APCI-MS de 1 sugerían una fórmula molecular de C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub> (calculado para C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub>, 623,2396). El espectro de <sup>1</sup>H-NMR presentaba dos señales características de amidas secundarias ( $\delta_{2-NH}$  de 7,15,  $\delta_{14-NH}$  de 6,45). Otro análisis por NMR bidimensional en CDCl<sub>3</sub> usando datos de COSY, HSQC y HMBC indicaba que estos protones intercambiables pertenecen a restos de valina y glicocola modificada, respectivamente (Tabla 1 e Información de Apoyo). El supuesto carbonilo de glicocola ( $\delta_{C-13}$  de 167,9) era parte de una unidad de tiazol 2,4-disustituido, según se evidenciaba por HMBCs del único metino aromático ( $\delta_{H-12}$  de 7,76,  $\delta_{C-12}$  de 124,2) a C-13 y a otro carbono sp<sup>2</sup> cuaternario, C-11 ( $\delta_C$  de 147,4). Además, HMBCs de un singlete metílico ( $\delta_{H-9}$  de 1,87) al carbonilo C-6 ( $\delta_C$  de 173,5), el carbono cuaternario C-7 ( $\delta_C$  de 84,4) y el carbono metilénico C-8 ( $\delta_C$  de 43,3), combinados con una HMBC del H-8a ( $\delta_H$  de 4,04) a C-10 ( $\delta_C$  de 164,6), sugerían la presencia de una unidad de ácido tiazolina-4-metil-4-carboxílico 2-sustituido (C-6 a C-10). La otra única HMBC a C-10 era del protón H12 de tiazol, lo que indicaba que C-10 lleva el sustituyente tiazol. Basándose en datos de HMBC (Tabla 1), la tiazolina-carboxilato de metilo y el extremo amínico del resto de valina estaban inequívocamente conectados por medio de un enlace amida. Las señales restantes del espectro de <sup>1</sup>H-NMR pertenecían a dos sistemas de espín, según se concluyó del análisis por COSY (Información de Apoyo). Una de las unidades era un grupo ácido 3-hidroxi-hept-4-enoico 7-sustituido (C-15 a C-21) con geometría E en el doble enlace, basándose en una gran constante de acoplamiento para <sup>3</sup>J<sub>H-18, H-19</sub> de 15,6 Hz, consistente con picos cruzados, por NOESY, entre H-18 y H<sub>2</sub>-20. Esta unidad estaba unida al extremo amínico de la unidad procedente de glicocola, como muestran las HMBCs de 14-NH y H-14a/b a C-15 así como los picos cruzados, por ROESY, entre 14-NH y H-16a y H-16b. La última unidad era un grupo n-octanoilo (C-22 a C-29) que estaba conectado con C-21, basándose en HMBC de H<sub>2</sub>-21 a C-22. El desplazamiento químico a bajo campo para C-22 ( $\delta_C$  de 199,4) unido al hecho de que aún quedaba por asignar un átomo de azufre era una acusada evidencia de una función tioéster. Finalmente, para justificar los requisitos de fórmula molecular y el desplazamiento químico a bajo campo de H-17 ( $\delta_H$  de 5,66), sugerente de un sustituyente aciloxilo, C-17 había de estar enlazado por éster al extremo carboxílico de la valina. Esto fue adicionalmente respaldado por un débil NOE entre H-17 y H<sub>3</sub>-5 ( $\delta_H$  de 0,50), lo que condujo a la estructura bidimensional cíclica mostrada para 1.

Para asignar la configuración absoluta de los tres centros quirales, la estrategia fue generar fragmentos ópticamente

activos, para lo cual se dispone fácilmente de patrones enantiómeros (Esquema 1). Específicamente, una ozonólisis seguida de un proceso oxidativo y una hidrólisis ácida generaba ácido 2-metilcisteico, valina y ácido málico. La mezcla de productos fue sometida a un análisis por HPLC quiral, comparándose los tiempos de retención con los de patrones auténticos. Este análisis permitió identificar L-valina, ácido (R)-2-metilcisteico y ácido L-málico, estableciéndose la configuración absoluta de **1** como 2S,7R,17S.

5

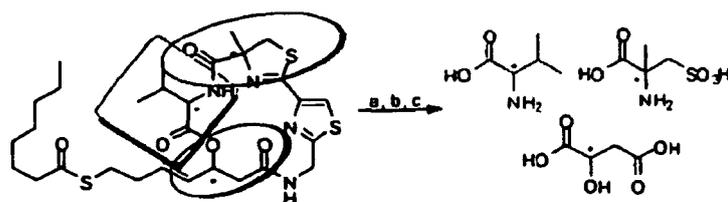
**Tabla 1.** Datos espectrales de RMN para largazol (**1**) en CDCl<sub>3</sub> (600 MHz)

nº de C/H	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$ , mult.	HMBC <sup>a,b</sup>
1		168,9, qC*	
2	4,61, dd (9,2, 3,3)	57,7, CH	1, 3, 4, 5, 6
3	2,10, m	34,2, CH	1 <sup>c</sup> , 2 <sup>c</sup>
4	0,68, d (7,2)	18,9, CH <sub>3</sub>	2, 3, 5
5	0,50, d (7,2)	16,6, CH <sub>3</sub>	2, 3, 4
2-NH	7,15, d (9,2)		1, 6 <sup>c</sup>
6		173,5, qC	
7		84,4, qC	
8a	4,04, d (-11,4)	43,3, CH <sub>2</sub>	6, 7, 10
8b	3,27, d (-11,4)		6, 7, 9
9	1,87, s ancho	24,2, CH <sub>3</sub>	6, 7, 8
10		164,6, qC	
11	147,4, qC	147,4, qC	
12	7,76, s	124,2, CH	10 <sup>c</sup> , 11, 13
13		167,9, qC	
14a	5,29, dd (-17,4, 9,6)	41,1, CH	13, 15
14b	4,27, dd (-17,4, 2,5)		13, 15
14-NH	6,45, dd (9,6, 2,5)		15 <sup>c</sup>
15		169,4, qC	
16a	2,86, dd (-16,5, 10,5)	40,5, CH <sub>2</sub>	15, 17, 18
16b	2,68, dd (-16,5, 1,8)		15
17	5,66, ddd (10,5, 7,2, 1,8)	72,0, CH	
18	5,51, dd (15,6, 7,2)	128,4, CH	17, 20
19	5,82, dt (15,6, 7,2)	132,7, CH	17, 20
20	2,31, q ancho (7,2) (2H)	32,3, CH <sub>2</sub>	18, 19, 21
21	2,90, t (7,2) (2H)	27,9, CH <sub>2</sub>	19, 20, 22

22		199,4 qC	
23	2,52, t (7,5) (2H)	44,1, CH <sub>2</sub>	22, 24, 25
24	1,64, m (2H)	25,6, CH <sub>2</sub>	22, 23, 25/26
25	1,29, m (2H)	28,9, CH <sub>2</sub>	26
26	1,25, m (2H)	28,9, CH <sub>2</sub>	25, 27
27	1,26, m (2H)	31,6, CH <sub>2</sub>	
28	1,28, m (2H)	22,6, CH <sub>2</sub>	
29	0,87, t ancho (6,9)	14,0, CH <sub>3</sub>	27, 28

<sup>a</sup>Protones que presentan correlaciones HMBC con el carbono indicado. <sup>b</sup>Optimizado para <sup>n</sup>J = 7 Hz si no se indica otra cosa. <sup>c</sup>Optimizado para <sup>n</sup>J = 3,5 Hz. \*qC = carbono cuaternario.

Esquema 1: Estrategia de degradación para liberar subunidades quirales



a) O<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25 °C, 30 min; b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HCO<sub>2</sub>H (1:2), 70 °C, 20 min; c) 6 N HCl 110 °C, 24 h

5 El largazol (1) posee una densa combinación de características estructurales poco habituales, incluyendo una 4-me-  
 10 tiltiazolina sustituida linealmente fusionada con un tiazol, previamente sólo hallada en el dideshidromirabazol<sup>7</sup>, un  
 miembro del grupo de citotoxinas cianobacterianas terrestres de *Scytonema mirabile* con selectividad hacia tumores  
 sólidos<sup>8</sup>. Otro elemento estructural notable es el grupo tioéster. Se ha informado previamente de metabolitos secundarios  
 que contienen tioéster procedentes de esponjas<sup>9</sup>, algas eucarióticas<sup>10</sup> y bacterias<sup>11</sup>, pero no de cianobacterias.  
 La unidad de ácido 3-hidroxi-7-tio-hept-4-enoico de 1 no tiene precedentes en productos naturales. Muy significati-  
 vamente, las potentes actividad y selectividad biológicas hacia células cancerosas justifican una investigación  
 adicional en cuanto al modo de acción, el potencial quimioterapéutico contra el cáncer y la biosíntesis de largazol  
 (1).

15 Los compuestos del invento pueden prepararse por medios conocidos en el campo de la síntesis orgánica. En la  
 técnica se conocen métodos para optimizar las condiciones de reacción si fuera necesario minimizar los subproduc-  
 tos competitivos. En la optimización de reacciones y el paso a una escala superior se pueden utilizar ventajosamente  
 equipos para síntesis paralela a alta velocidad y microrreactores controlados por ordenador (por ejemplo, "Design  
 and Optimization in Organic Synthesis", 2ª edición, redactado por R. Carlson, 2005, Elsevier Science Ltd.; K.  
 Jähnisch et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2004, 43: 406; y las referencias ahí citadas). El técnico experto puede  
 20 determinar esquemas y protocolos de reacción adicionales mediante el uso de programas comercialmente asequi-  
 bles con bases de datos para búsquedas estructurales, tales como, por ejemplo, SciFinder<sup>®</sup> (CAS Division of the  
 American Chemical Society) y CrossFire Beilstein<sup>®</sup> (Elsevier MDL), o mediante la búsqueda apropiada de palabras  
 clave usando un motor de búsqueda en Internet tal como Google<sup>®</sup> o bases de datos de palabras clave, tal como la  
 base de datos de textos del Departamento de Patentes y Marcas Registradas de EE.UU.

25 Los compuestos presentes pueden contener también uniones (por ejemplo, enlaces carbono-carbono) cuya rotación  
 de enlace está restringida alrededor de esa unión particular, tal como, por ejemplo, la restricción que resulta de la  
 presencia de un anillo o un doble enlace. En consecuencia, todos los isómeros *cis/trans* y *E/Z* están expresamente  
 incluidos en el presente invento. Los compuestos presentes pueden ser también representados en múltiples formas  
 tautómeras; en dichos casos, en el invento se incluyen expresamente todas las formas tautómeras de los compues-  
 30 tos aquí descritos aun cuando sólo se pueda representar una única forma tautómera. Todas las citadas formas isó-  
 meras de dichos compuestos presentes están expresamente incluidas en el presente invento. Todas las formas  
 cristalinas y los polimorfos de los compuestos aquí descritos están expresamente incluidos en el presente invento.

- 5 También se incluyen extractos y fracciones que comprenden compuestos del invento. Con el término "isómeros" se pretende incluir diastereoisómeros, enantiómeros, regioisómeros, isómeros estructurales, isómeros rotacionales, tautómeros y similares. Para compuestos que contienen uno o más centros estereogénicos, por ejemplo, compuestos quirales, los métodos del invento pueden ser llevados a cabo con un compuesto enantioméricamente enriquecido, un racemato o una mezcla de diastereómeros.
- Los compuestos enantioméricamente enriquecidos preferidos tienen un exceso enantiomérico de 50% o más, más preferiblemente el compuesto tiene un exceso enantiomérico de 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o más. En realizaciones preferidas, sólo se administra un enantiómero o diastereómero de un compuesto quiral del invento a células o a un sujeto.
- 10 Métodos de tratamiento
- El invento se dirige a compuestos macrocíclicos y a métodos para tratar enfermedades y trastornos usando los aquí descritos compuestos o composiciones de los mismos.
- 15 En otros aspectos, el invento proporciona un método para tratar a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con HDAC, en que el sujeto ha sido identificado por tener necesidad de tratamiento para un trastorno o enfermedad relacionado con HDAC, que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I, de modo que dicho sujeto es tratado en cuanto a dicho trastorno. La identificación de la necesidad de dicho tratamiento en un sujeto puede radicar en el juicio de un sujeto o un profesional de la asistencia sanitaria y puede ser subjetiva (por ejemplo, una opinión) u objetiva (por ejemplo, mensurable mediante una prueba o un método diagnóstico).
- 20 En un aspecto, el invento proporciona un método para modular la actividad de proliferación de una célula en un sujeto, que comprende poner el sujeto en contacto con un compuesto de fórmula I en una cantidad y bajo unas condiciones suficientes para modular la actividad de proliferación celular.
- En una realización, la modulación es una inhibición.
- 25 En otro aspecto, el invento proporciona un método para tratar a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I.
- 30 En otros aspectos, el invento proporciona un método para tratar a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular, en que el sujeto ha sido identificado por tener necesidad de tratamiento para un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular, que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I, de modo que dicho sujeto es tratado en cuanto a dicho trastorno.
- En ciertas realizaciones, el invento proporciona un método como el anteriormente descrito en que el compuesto de fórmula I es largazol.
- 35 En ciertas realizaciones, el invento proporciona un método para tratar un trastorno, en que el trastorno es un cáncer (por ejemplo, de mama o colon) o un tumor sólido.
- En ciertas realizaciones, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un primate o un ser humano.
- 40 En otra realización, el invento proporciona un método como el anteriormente descrito en que la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de aproximadamente 0,005 µg/kg a aproximadamente 200 mg/kg. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg. En otra realización, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de aproximadamente 10 mg/kg a 100 mg/kg.
- 45 En otras realizaciones, el invento proporciona un método como el anteriormente descrito en que la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 500 nM. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz varía de aproximadamente 10,0 pM a aproximadamente 1000 pM. En otra realización, la cantidad eficaz varía de aproximadamente 1,0 nM a aproximadamente 10 nM.
- En otra realización, el invento proporciona un método como el anteriormente descrito en que el compuesto de fórmula I se administra intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracerebroventricular, oral o tópicamente.
- 50 En otra realización, el invento proporciona un método como el anteriormente descrito en que el compuesto de fórmula I presenta selectividad (por ejemplo, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor o al menos X veces mayor, siendo X cualquier número entre 1 y 20 inclusive) en cuanto a la actividad de crecimiento celular (por ejemplo, en células MDA-MB-231/NMuMG o U2OS/NIH3T3, transformadas/no transformadas). En otro aspecto, el compuesto de fórmula I presenta selectividad en cuanto a modular la actividad de crecimiento celular (por ejemplo, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor o al menos X veces ma-

por, siendo X cualquier número entre 1 y 20 inclusive) con respecto a otra terapia anticancerosa estándar (por ejemplo, paclitaxel, actinomicina D o doxorubicina).

5 En otras realizaciones, el invento proporciona un método como el anteriormente descrito en que el compuesto de fórmula I se administra solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes. En otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente anticanceroso, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénesis, un agente citotóxico o un agente antiproliferación. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mosta-  
10 zas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-azacitidina, hidroxourea, desoxicofurformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, vincristina, vinblastina, etopósido, trimetrexato, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, en general, "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 15ª edición, páginas 1206-1228, redactado por Berkow et al., Rahay, New York, 1987).

15 Otro objeto del presente invento es el uso de un compuesto como el aquí descrito (por ejemplo, de cualquier fórmula presente) en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad de la proliferación celular, o para afectar a la diferenciación, desdiferenciación o transdiferenciación celular. Otro objeto del presente invento es el uso de un compuesto como el aquí descrito (por ejemplo, de cualquier fórmula presente) para  
20 uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad de la proliferación celular, o para afectar a la diferenciación, desdiferenciación o transdiferenciación celular.

#### Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica en que el compuesto de fórmula I es largazol, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende además un agente terapéutico adicional. En una realización más, el agente terapéutico adicional es un agente anticanceroso, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénesis, un agente citotóxico o un agente antiproliferación.

30 En un aspecto, el invento proporciona un kit que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, en una forma de dosificación unitaria, junto con instrucciones para administrar el compuesto a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, una enfermedad o trastorno mediado por HDAC, incluyendo la pérdida de memoria, inducción de la neurogénesis, potenciación de la retención de memoria, potenciación de la formación de memoria, aumento del potencial o la transmisión sinápticas, aumento de la potenciación a largo plazo (LTP), etc.

35 En un aspecto, el invento proporciona un kit que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, en una forma de dosificación unitaria, junto con instrucciones para administrar el compuesto a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, una enfermedad o trastorno de la proliferación celular, incluyendo cáncer, un tumor sólido, angiogénesis, etc.

40 Con la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se quiere incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente atóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares hallados en los compuestos aquí descritos. Cuando los compuestos del presente invento contienen funciones relativamente ácidas, se pueden obtener sales por adición de base al poner la forma neutra de dichos compuestos en contacto con una cantidad suficiente de la base deseada, sea neta o sea en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables por adición de base incluyen las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico y magnesio, y sales similares. Cuando los compuestos del presente invento contienen funciones relativamente básicas, se pueden obtener sales por adición de ácido al poner la forma neutra de dichos compuestos en contacto con una cantidad suficiente del ácido deseado, sea neto o sea en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables por adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogeno-  
45 carbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente atóxicos tales como los ácidos acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como el arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como los ácidos glucurónico, galacturónico y similares [véase, por ejemplo, Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science 66: 1-19 (1977)].  
50 Ciertos compuestos específicos del presente invento contienen funciones tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos sean convertidos en sales por adición de base o de ácido. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica son adecuados para el presente invento.

Se pueden regenerar las formas neutras de los compuestos al poner la sal en contacto con una base o un ácido y aislar el compuesto parental del modo convencional. La forma parental del compuesto difiere de las diferentes formas salinas en ciertas propiedades físicas, tal como la solubilidad en disolventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a la forma parental del compuesto para los fines del presente invento.

5 Además de las formas salinas, el presente invento proporciona compuestos que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos aquí descritos son los compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos del presente invento. Además, los profármacos pueden ser convertidos en los compuestos del presente invento mediante métodos químicos o bioquímicos en un ambiente *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos pueden ser convertidos lentamente en los compuestos del presente  
10 invento cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuado.

Ciertos compuestos del presente invento pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que queden abarcadas dentro del alcance del presente invento. Ciertos compuestos del presente invento pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para  
15 los usos contemplados por el presente invento y se pretende que queden dentro del alcance del presente invento.

El invento también proporciona una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto aquí descrito y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el compuesto se administra al sujeto usando una formulación farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una formulación farmacéuticamente aceptable que proporciona un suministro continuo del compuesto al sujeto durante al menos 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48  
20 horas, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de que se ha administrado la formulación farmacéuticamente aceptable al sujeto.

Se pueden variar los niveles de dosificación reales y el curso temporal de la administración de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas del invento con objeto de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la deseada respuesta terapéutica para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sea tóxica (o inaceptablemente tóxica) para el paciente.  
25

En uso, se administra al menos un compuesto de acuerdo con el presente invento en una cantidad farmacéuticamente eficaz a un sujeto que lo necesita, en un vehículo farmacéutico, mediante inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o intracerebroventricular o mediante administración oral o aplicación tópica. De acuerdo con el presente invento, se puede administrar un compuesto del invento solo o junto con un segundo agente terapéutico diferente. Por "junto con" se quiere significar conjuntamente, de forma sustancialmente simultánea o secuencial. En una realización, se administra un compuesto del invento durante poco tiempo. Por lo tanto, el compuesto del invento se puede administrar durante un corto curso de tratamiento, tal como durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 semana. En otra realización, el compuesto del invento se puede administrar a lo largo de un periodo más prolongado de tiempo para mejorar trastornos crónicos, tal como, por ejemplo, durante aproximadamente una semana a varios meses dependiendo del estado que se trate.  
30  
35

Por "cantidad farmacéuticamente eficaz", como aquí se usa, se quiere significar una cantidad de un compuesto del invento lo suficientemente elevada para modificar de forma significativamente positiva el estado que se trata, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves (para una razonable relación de beneficio/riesgo), dentro del alcance de un buen juicio médico. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto del invento variará con la finalidad particular que se quiere alcanzar, la edad y el estado físico del paciente que se trata, la gravedad de la enfermedad subyacente, la duración del tratamiento, la naturaleza de una terapia concurrente y el compuesto de organozinc específico empleado. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto del invento administrado a un niño o un neonato se reducirá proporcionalmente de acuerdo con un buen juicio médico. De este modo, la cantidad eficaz de un compuesto del invento será la cantidad mínima que proporcione el efecto deseado.  
40  
45

Una acusada ventaja práctica del presente invento es que el compuesto se puede administrar de un modo conveniente, tal como por vías de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral o intracerebroventricular o por aplicación tópica, tal como en cremas o geles. Dependiendo de la vía de administración, puede que sea necesario que los ingredientes activos que comprenden un compuesto del invento sean revestidos con un material para proteger al compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto. Con objeto de administrar un compuesto del invento mediante una administración distinta de la parenteral, el compuesto puede ser revestido o administrado con un material para evitar su inactivación.  
50

El compuesto puede ser administrado parenteral o intraperitonealmente. También se pueden preparar dispersiones en, por ejemplo, glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites.

55 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso por inyección incluyen disoluciones (cuando es soluble en agua) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda ser fácilmente utilizable con una jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El

vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, DMSO, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina y mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de una dispersión. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares y cloruro sódico. Se puede alcanzar una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina, en las composiciones.

Se preparan disoluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto del invento, en la cantidad requerida, al disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes anteriormente enumerados, según se requieran, seguida de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones al incorporar los diversos compuestos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de entre los anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado bajo vacío y la técnica de liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

Para administración terapéutica oral, el compuesto puede ser incorporado a excipientes y ser utilizado en forma de tabletas, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, sellos y similares para ingestión. Se preparan composiciones o preparaciones de acuerdo con el presente invento de modo que una forma unitaria de dosificación oral contenga una concentración de compuesto suficiente para tratar un trastorno en un sujeto.

Son algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como vehículos farmacéuticos: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetatos de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tales como aceites de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y manteca de cacao; polioles, tales como propilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; agar; ácidos alginicos; agua exenta de pirógenos; disolución salina isotónica y disolución tampón de fosfato; leche desnatada en polvo; y también otras sustancias compatibles atóxicas utilizadas en formulaciones farmacéuticas, tales como, por ejemplo, vitamina C, estrógeno y equinácea. También pueden estar presentes agentes humectantes y lubricantes tales como el laurilsulfato sódico, así como agentes colorantes, agentes saboreadores, lubricantes, excipientes, agentes para formación de tabletas, estabilizantes, antioxidantes y conservantes.

La enumeración de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable presente incluye definiciones de esa variable como un grupo individual o una combinación de grupos enumerados. La enumeración de una realización para una variable presente incluye esa realización como una realización individual o en combinación con cualesquier otras realizaciones o porciones de las mismas.

### **Ejemplos**

Se demostrará ahora el presente invento usando ejemplos específicos que no han de ser considerados restrictivos.

#### **Procedimientos experimentales generales**

Se obtuvieron datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -NMR mediante un espectrómetro Bruker Avance 600 MHz con una sonda de 5 mm que funcionaba a 600 y 150 MHz, respectivamente. Se registraron datos de NMR 2D en un Bruker Avance II 600 MHz provisto de una sonda criogénica superconductora de 1 mm, triple resonancia y elevada temperatura, usando las señales del disolvente residual ( $\delta_{\text{H}}$  de 7,26 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  de 77,0 ppm) como patrones internos. Los experimentos de HSQC se optimizaron para  $^1J_{\text{CH}} = 145$  Hz, y los experimentos de HMBC para  $^nJ_{\text{CH}} = 7$  ó 3,5 Hz. Se obtuvieron datos de LC-MS usando un equipo Agilent 1100 provisto de un aparato ThermoFinnigan LQC por ESI (modo positivo). Se obtuvieron datos de HRMS usando un espectrómetro de masas Agilent LC-TOF provisto de un detector de fuente de iones multimodo ESI/APCI. Se obtuvieron patrones enantioméricos del ácido 2-metilcisteico por oxidación de las (R)- y (S)-2-metilcisteínas (véase más adelante), que fueron proporcionadas por ResCom (DSM Pharma Chemicals). Los patrones de valina, glicocola y ácido málico se obtuvieron de Sigma. El paclitaxel, la actinomicina D y la doxorubicina se obtuvieron de EMD Chemicals Inc.

#### **Ejemplo 1: Extracción y aislamiento**

Se recogió una muestra de *Symploca* sp. de Pillars, Key Largo (Florida Keys, EE.UU.) en agosto de 2003. Las muestras tenían filamentos erguidos de color marrón dorado, con forma de pluma, consistentes con este género. Los filamentos medían 5-6  $\mu\text{m}$  de ancho, incluyendo una fina vaina, y 8-9  $\mu\text{m}$  de largo. La *Symploca* sp. fue liofilizada y sometida a extracción con MeOH-EtOAc (1:1). El extracto lipófilo resultante (0,29 g) fue sometido a reparto entre hexanos y MeOH acuoso al 20%. La capa de MeOH acuoso fue concentrada y sometida a fraccionamiento por cromatografía en gel de Si usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  que contenía cantidades crecientes de i-PrOH, seguido de MeOH. La fracción que resultó eluida con i-PrOH al 5% fue luego sometida a HPLC en fase inversa (YMC-Pack ODS-AQ, 250 x 10 mm, 2,0 ml/min; detección a 220 y 254 nm) usando un gradiente lineal de MeOH-H<sub>2</sub>O (40-100% durante 75 minutos

y luego MeOH al 100% durante 10 minutos). El Compuesto 1 era eluido en  $t_R$  de 61,5 minutos (1,2 mg).

**Largazol (1):** sólido amorfo incoloro;  $[\alpha]_D^{20} = +22$  ( $c = 0,1$ , MeOH); UV (MeOH) ( $\log e$ ): 210 (4,07), 260 (hombro, 3,61); IR (película),  $\nu_{\max}$ : 2924, 2853, 1725, 1694, 1611, 1659, 1641, 1630, 1596, 1512, 1249, 1117, 1067, 1034, 894  $\text{cm}^{-1}$ ; datos de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  y HMBC: véase la Tabla 1; HR-ESI/APCI-MS,  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 623,2397 (calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_3$ : 623,2396).

**Análisis por LC-MS.** Se analizó una muestra de compuesto 1 por LC-MS [columna: Waters Corp., Atlantis dC18, 3  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm; fase móvil: HCOOH al 0,5% en MeOH (A), en HCOOH al 0,5% en  $\text{H}_2$  (B); caudal: 0,15 ml/min] usando un gradiente lineal (5-95% durante 65 minutos). Se llevaron a cabo una (+) ESI-MS ( $m/z$  de 200-1600) del ión más intenso del intervalo de MS ( $t_R$  de 51,1 minutos,  $m/z$  de 623) así como una MS/MS/MS dependiente y una MS/MS del ión  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de  $m/z$  623 (véase la Figura 1).

#### Ejemplo 2: Síntesis de los ácidos (R)- y (S)-2-metilcisteico

Se trató una muestra de (R)-2-metilcisteína (5,0 mg) con 2 ml de una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HCO}_2\text{H}$  (1:9) a 0 °C durante 2 horas. La mezcla de productos fue concentrada hasta sequedad por evaporación para obtener el ácido (R)-2-metilcisteico. El residuo fue luego reconstituido en 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para el análisis de aminoácidos por HPLC quiral. Similarmente, se hizo reaccionar (S)-2-metilcisteína para obtener el ácido (S)-2-metilcisteico.

#### Ejemplo 3: Determinación de la configuración absoluta

Se disolvió una muestra de compuesto 1 (~ 100  $\mu\text{g}$ ) en 4 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se sometió la disolución a ozonólisis a temperatura ambiental durante 30 minutos. Se evaporó el disolvente y se trató el residuo con 0,6 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{HCO}_2\text{H}$  (1:2) a 70 °C durante 20 minutos. Se evaporó el disolvente y se hidrolizó el producto de oxidación resultante con 0,5 ml de HCl 6 N a 110 °C durante 24 horas. El producto hidrolizado fue secado y fue analizado por HPLC quiral [columna Phenomenex Chirex, fase 3126 N,S-dioctil-(D)-penicilamina, 4,60 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; disolvente 1:  $\text{CuSO}_4$  2 mM en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (95:5), pH de 4,50; disolvente 2:  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  0,5 mM/ $\text{NH}_4\text{OAc}$  0,1 M en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (85:15), pH de 4,6; caudal: 1,0 ml/min; detección a 254 nm]. La configuración absoluta de los aminoácidos en el producto de hidrólisis se determinó por comparación directa con los tiempos de retención de patrones auténticos. Los tiempos de retención ( $t_R$ , min) para el disolvente 1 fueron los siguientes: Gly (5,3), L-Val (12,6), D-Val (16,4), ácido (S)-2-Me-cisteico (20,0) y ácido (R)-2-Me-cisteico (23,9). Los tiempos de retención ( $t_R$ , min) de los componentes del producto de hidrólisis fueron 5,3, 12,6 y 23,9, lo que indica la presencia de Gly, L-Val y ácido (R)-2-Me-cisteico en la mezcla de productos. Se usó el disolvente 2 para detectar ácido málico. El patrón de ácido L-málico era eluido a un  $t_R$  de 7,6 min y el de ácido D-málico a un  $t_R$  de 20,4 min. En el producto de hidrólisis, el ácido málico era eluido después de 7,6 min, lo que indica la presencia del isómero L. Resultaron eluidos Gly, L-Val y ácido (R)-2-Me-cisteico después de 4,0, 5,8 y 6,5 minutos, respectivamente.

#### Ejemplo 4: Cultivo celular

Se obtuvo el medio para cultivo celular de Invitrogen y el suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum) de Hyclone. Se propagaron y mantuvieron las células en medio DMEM (elevado nivel de glucosa) complementado con FBS al 10%, en aire humidificado y  $\text{CO}_2$  al 5% a 37 °C.

#### Ejemplo 5: Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron células suspendidas en DMEM que contenía FBS al 10%, en placas de 96 pocillos (MDA-MB-231: 12.000 células; NMuMG: 5000 células; U2OS: 5000 células; HT29: 10.000 células; IMR-32: 30.000 células; NIH3T3: 5000 células), se incubaron (37 °C,  $\text{CO}_2$  al 5%) y, 24 horas más tarde, se trataron con compuesto 1 en diferentes concentraciones o con disolvente testigo (EtOH al 1%). Después de otras 48 horas de incubación, se midió la viabilidad celular usando MTT de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega).

#### Ejemplo 6: Actividad de los agentes terapéuticos anticancerosos

También se trataron de la misma manera células MDA-MB-231 y NMuMG con paclitaxel (en DMSO), actinomicina D (en DMSO), doxorubicina (en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y el correspondiente disolvente testigo (al 1%). Se calcularon los valores de  $\text{GI}_{50}$  y  $\text{LC}_{50}$  del modo previamente descrito (K. D. Pauli, E. Hamel y L. Malspeis, "Cancer Chemotherapeutic Agents, redactado por W. E. Foye, American Chemical Society, Washington, DC, 1995, páginas 10-11).

$$(T - T_0)$$

$$\text{GI}_{50}: \text{concentración en que } 100 \times \frac{(T - T_0)}{(T_0 - T_0)} = 50$$

$$(C - T_0)$$

$$(T - T_0)$$

$$LC_{50}: \text{concentración en que } 100 \times \frac{\quad}{T_0} = -50$$

5 [T = absorbancia en los pocillos tratados (48 h); T<sub>0</sub> = absorbancia a tiempo cero; C = absorbancia en los pocillos testigo (48 h)]

### Ejemplo 7: Actividad del largazol

10 Basándose en el ensayo con MTT, el largazol (**1**) inhibía potentemente el crecimiento de células epiteliales mamarias humanas transformadas muy invasivas (MDA-MB-231), de una forma dependiente de la dosis (GI<sub>50</sub> = 8 nM) y provocaba citotoxicidad en concentraciones mayores (LC<sub>50</sub> = 117 nM). Por contraste, células epiteliales mamarias murinas no transformadas (NMuMG) eran significativamente menos sensibles al compuesto **1** (GI<sub>50</sub> de 122 nM, LC<sub>50</sub> de 272 nM). Similarmente, mientras que las células U2OS de osteosarcoma fibroblástico eran muy sensibles al largazol (**1**) con una GI<sub>50</sub> de 55 nM y una LC<sub>50</sub> de 94 nM, la viabilidad de los fibroblastos NIH3T3 no transformados resultaba significativamente menos comprometida tras el tratamiento con **1** (GI<sub>50</sub> de 480 nM) sin toxicidad aparente alguna. La actividad diferencial de 8 a 15 veces mayor en cuanto a inhibir el crecimiento de fibroblastos o células epiteliales transformados con respecto al crecimiento de los no transformados, respectivamente, y la selectividad en cuanto a matar fibroblastos transformados con respecto a los fibroblastos no transformados, sugieren que **1** se dirige preferentemente a células cancerosas. El crecimiento de líneas celulares cancerosas procedentes de colon (HT29) y neuroblastoma (IMR-32) también resultó acusadamente inhibido por **1** (valores de GI<sub>50</sub> de 12 nM y 16 nM, respectivamente), acompañado de citotoxicidad (LC<sub>50</sub> de 22 nM para ambas líneas celulares).

20 El largazol (**1**) también presenta una notable selectividad que no se observa con otros productos naturales antitumorales validados, examinados en paralelo. Véase, por ejemplo, la Tabla 2, relativa a células MDA-MB-231/NMuMG y células U2OS/NIH3T3.

**Tabla 2.** Actividad inhibitoria del crecimiento (GI<sub>50</sub>), de fármacos de productos naturales

Compuesto	MDA-MB-231	NMuMG	U2OS	NIH3T3
Largazol ( <b>1</b> )	7,7 nM	122 nM	55 nM	480 nM
Paclitaxel	7,0 nM	5,9 nM	12 nM	6,4 nM
Actinomicina D	0,5 nM	0,3 nM	0,8 nM	0,4 nM
Doxorrubicina	310 nM	63 nM	220 nM	47 nM

### 25 Ejemplo 8: Inhibición de HDAC

30 Para probar esta hipótesis, se determinó la actividad HDAC celular tras un tratamiento con largazol en células HCT-116, de las que se ha hallado que poseen una elevada actividad HDAC intrínseca. Se incubaron conjuntamente un sustrato artificial fluorogénico de HDAC que penetra en las células (*fluor de Lys*<sup>TM</sup>, BIOMOL) y largazol (**1**), y se determinó que el tratamiento con largazol durante 8 horas daba lugar a una disminución de la actividad HDAC según un modo de dosis-respuesta (Figura 2a) y que, de forma importante, la IC<sub>50</sub> para la inhibición de HDAC se correspondía fielmente con la GI<sub>50</sub> del largazol en esta línea celular (Figura 2a, Tabla 3). Esta correlación sugería que HDAC es la relevante diana responsable del efecto antiproliferativo del largazol. Como confirmación, un análisis por inmunotransferencia de un sustrato endógeno de HDAC, la histona H3 acetilada, reveló la misma relación de dosis-respuesta (Figura 2b).

35 El largazol (**1**) inhibía la actividad HDAC de un extracto de proteínas nucleares de células HeLa, rico en HDACs 1, 2 y 3 de clase I (BIOMOL); sin embargo, es posible que se escinda el tioéster bajo las condiciones de ensayo. Para investigar si el tiol **9** es una especie reactiva, se liberó **9** del compuesto análogo acetílico **8** de largazol (**1**) y se midió directamente la actividad enzimática; el tiol **9** inhibía las HDACs del extracto nuclear de células HeLa con un valor de IC<sub>50</sub> similar (Tabla 3). El largazol (**1**) y el tiol **9** presentaban actividades celulares similares contra HDACs procedentes de extractos nucleares de células HeLa así como actividades antiproliferativas similares.

**Tabla 3.** Valores de IC<sub>50</sub> y GI<sub>50</sub> para HDAC e inhibición del crecimiento (nM)

Inhibición del crecimiento	Ensayo celular de	HDACs de extracto
----------------------------	-------------------	-------------------

	de HCT-116	HDAC en HCT-116	nuclear de HeLa
1	44 ± 10	51 ± 3	37 ± 11
8	33 ± 2	50 ± 18	52 ± 27
9	38 ± 5	209 ± 15	42 ± 29

5 **Ensayo de actividad HDAC celular in vitro.** Se siembran células HCT-116 en 100 µl de medio por pocillo, en una densidad de  $3,5 \times 10^3$  células/pocillo, y se cultivan durante 24 horas en una placa estéril de 96 pocillos y fondo uniforme. El ensayo se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BIOMOL). En resumen, después de 24 horas, se sustituye el medio por 50 µl/pocillo de medio que contiene sustrato *fluor de Lys*<sup>TM</sup> 200 µM y tricostatina A 1 µM (testigo positivo) y compuestos de ensayo (largazol, derivado acetílico) en concentraciones que varían de 1 µM a 3,2 nM (lg/diluciones al doble) y compuesto tiólico en concentraciones que varían de 10 µM a 300 pM. Se incuban las placas a 37 °C durante 8 horas. Después del tiempo de tratamiento, se añaden 50 µl por pocillo de Revelador *fluor de Lys*<sup>TM</sup> 1x que contiene TSA en concentración 2 µM. Después de la adición del revelador, se incuban las placas a 37 °C durante 15 minutos y se lee la fluorescencia (Exc. a 360 nm, Emis. a 460 nm).

15 **Análisis por inmunotransferencia.** Se siembran células HCT-116 (650.000 células/placa) en placas de 10 cm y, 24 horas más tarde, se tratan con largazol o tricostatina en diferentes concentraciones o con disolvente testigo (EtOH para el largazol y DMSO para la tricostatina). Después de una incubación de 8 horas, se preparan lisados de células completas usando tampón de lisis PhosphoSafe (Novagen), se extraen las proteínas y se mide la concentración de proteínas usando el método del BCA (Pierce). Los lisados celulares que contienen cantidades iguales de proteína son separados por SDS-PAGE, transferidos a membranas de PVDF, sondados con anticuerpos y detectados con el kit Supersignal Femto para transferencia Western (Pierce). Los anticuerpos primarios anti-acetil-histona H3 (Lys9/18) y anti-histona H3 se obtienen de Millipore y el anticuerpo secundario anti-conejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante, se obtiene de Cell Signaling.

20 **Ensayo enzimático exento de células.** Se añaden tampón de ensayo (25µl en el blanco y 10 µl en el testigo), tricostatina 1 µM e inhibidores de ensayo (concentraciones que varían de 10 µM a 300 pM) a los pocillos de muestra de ensayo de la placa para microtitulación. Se añade extracto de proteínas nucleares de células HeLa, enriquecido en HDAC (BIOMOL; 5 µg en 15 µl), a todos los pocillos salvo al testigo sin enzima. Se equilibra la placa de ensayo a 37 °C y luego se añaden 25 µl de sustrato *fluor de Lys*<sup>TM</sup> en una concentración final de 116 µM. Se deja que transcurra la reacción de la HDAC durante 15 minutos y luego se detiene por adición de 50 µl por pocillo de Revelador *fluor de Lys*<sup>TM</sup> 1x que contiene TSA en concentración 2 µM. Después de la adición del revelador, se incuban las placas a 37 °C durante 15 minutos y se lee la fluorescencia (Exc. a 360 nm, Emis. a 460 nm).

30 **Ensayo de HDAC usando enzimas purificadas.** De un modo similar al anterior en que se usaba extracto nuclear de HeLa como fuente de actividad HDAC, se pueden ejecutar los ensayos usando diferentes HDACs puras de clase I y clase II para evaluar la especificidad.

35 **Ensayos de diferenciación/desdiferenciación/transdiferenciación celulares.** Se evalúan los compuestos presentes en cuanto a su capacidad para provocar diferenciación/desdiferenciación/transdiferenciación celulares al someterlos a condiciones de ensayo esencialmente como las descritas en protocolos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los descritos por Wu et al., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 14.520-14.521; Ding et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 7632-7637; y Chen et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 410-411.

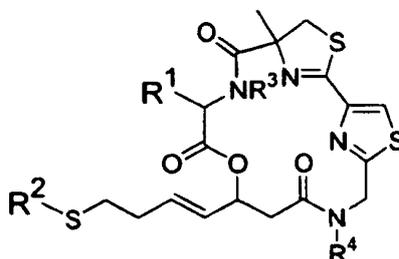
#### Referencias

- (1) (a) F. E. Koehn y G. T. Carter, Nat. Rev. Drug Discov. 2005, 4, 206-220. (b) I. Paterson y E. A. Anderson, Science 2005, 310, 451-453.
- (2) W. Fenical y P. R. Jensen, Nat. Chem. Biol. 2006, 2, 666-673.
- 40 (3) W. H. Gerwick, L. T. Tan y N. Sitachitta, Alkaloids Chem. Biol. 2001, 57, 75-184.
- (4) H. Luesch, R. E. Moore, V. J. Paul, S. L. Mooberry y T. H. Corbett, J. Nat. Prod. 2001, 64, 907-910.
- (5) (a) W. H. Gerwick, P. J. Proteau, D. G. Nagle, E. Hamel, A. Blokhin y D. L. Slate, J. Org. Chem. 1994, 59, 1243-1245. (b) P. Verdier-Pinard, J.-Y. Lai, H.-D. Yoo, J. Yu, B. Marquez, D. G. Nagle, M. Nambu, J. D. White, J. R. Falck, W. H. Gerwick, B. W. Day y E. Hamel, Mol. Pharmacol. 1998, 53, 62-76.
- 45 (6) (a) H. Luesch, W. Y. Yoshida, R. E. Moore, V. J. Paul y T. H. Corbett, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 5418-5423. (b) H. Luesch, S. K. Chanda, M. R. Raya, P. D. DeJesus, A. P. Orth, J. R. Walker, J. C. Izpisua Belmonte y P. G. Schultz, Nat. Chem. Biol. 2006, 2, 158-167.

- (7) (a) S. Carmeli, R. E. Moore y G. M. L. Patterson, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 2593-2596. (b) G. Pattenden y S. M. Thom, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1993, 1629-1636. (c) R. J. Boyce y G. Pattenden, *Tetrahedron* 1995, 51, 7313-7320.
- (8) S. Carmeli, R. E. Moore y G. M. L. Patterson, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 8195-8197.
- 5 (9) P. Horton, W. D. Inman y P. Crews, *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 143-151.
- (10) (a) P. Roller, K. Au y R. E. Moore, *Chem. Commun.* 1971, 503-504. (b) N. Sata, H. Abinsay, W. Y. Yoshida, F. D. Horgen, N. Sitachitta, M. Kelly y P. J. Scheuer, *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1400-1403.
- (11) (a) J. Pérez Baz, L. M. Cañedo, J. L. Fernández Puentes y M. V. Silva Elipe, *J. Antibiot. (Tokyo)* 1997, 50, 738-741. (b) D. G. Boger y S. Ichikawa, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 2956-2957.
- 10 (12) Documento US 2007/185071 (A1).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:



I

5 en que:

cada R es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido;

cada R<sup>1</sup> es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido;

cada R<sup>2</sup> es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido o C(O)R;

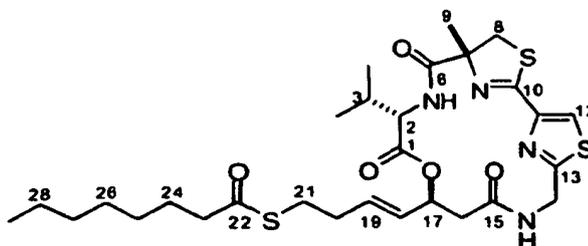
cada R<sup>3</sup> es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido, C(O)OR o C(O)NRR; y

10 cada R<sup>4</sup> es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido, C(O)OR o C(O)NRR;

y sales, solvatos o hidratos del mismo farmacéuticamente aceptables, preferiblemente

en que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son H, y preferiblemente

en que R<sup>1</sup> es isopropilo, preferiblemente en que R<sup>2</sup> es alquilo, más preferiblemente en que R<sup>2</sup> es alquil-C(O)-, y aún más preferiblemente en que el compuesto es:



15

(largazol)

2. El compuesto de la Reivindicación 1, en que el compuesto es cualquiera de los compuestos 1-8:

Nº de compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
1	isopropilo	n-heptil-C(O)-	H	H
2	isopropilo	n-heptil-C(O)-	H	Me
3	isopropilo	Me	H	H
4	isopropilo	n-heptil-C(O)-	H	metil-C(O)-
5	isopentilo	n-heptil-C(O)-	H	H
6	etilo	n-heptil-C(O)-	Me	Me
7	isopropilo	CH <sub>3</sub> C(O)-	H	H
8	isopropilo	H	H	H

3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la Reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica (Reivindicación 2) de la Reivindicación 3, en que el compuesto de la Reivindicación 1 es cualquiera de los compuestos 1-8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable,
- 5 que además comprende preferiblemente un agente terapéutico adicional,  
 en que el agente terapéutico adicional es preferiblemente un agente anticanceroso, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénesis, un agente citotóxico o un agente antiproliferación.
5. Un kit que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la Reivindicación 1, en una forma de dosificación unitaria.
- 10 6. Un compuesto de fórmula I de la Reivindicación 1 para uso en la modulación de la actividad de proliferación celular en un sujeto, en que preferiblemente la modulación es inhibición, y el compuesto se usa en una cantidad y bajo unas condiciones suficientes para modular la proliferación celular.
7. Un compuesto de fórmula I de la Reivindicación 1 para uso en la modulación de la actividad de toda proliferación en un sujeto de acuerdo con la Reivindicación 6, **caracterizado por que** la célula es una célula cancerosa,
- 15 o  
 en que la célula es una célula tumoral.
8. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular, en que el sujeto ha sido identificado por estar necesitado de un tratamiento para un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular, usando una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de fórmula I, por lo que dicho sujeto es tratado en cuanto a dicho trastorno.
- 20 9. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular de acuerdo con la Reivindicación 6 u 8, **caracterizado por que** el compuesto de fórmula I es uno de la Reivindicación 2.
- 25 10. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular de acuerdo con la Reivindicación 6 u 8, **caracterizado por que**
- 30 el trastorno es un cáncer, un tumor sólido, cáncer de colon, de mama, de huesos, de cerebro y otros, por ejemplo, osteosarcoma, neuroblastoma, adenocarcinoma de colon y similares, o  
 en que el trastorno es un trastorno de la angiogénesis.
- 35 11. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular de acuerdo con la Reivindicación 6 u 8, **caracterizado por que**  
 el sujeto es un mamífero, preferiblemente  
 en que el sujeto es un primate o un ser humano.
- 40 12. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular de acuerdo con la Reivindicación 6 u 8, **caracterizado por que**  
 la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de 0,005 µg/kg a 200 mg/kg, preferiblemente  
 45 en que la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, preferiblemente  
 en que la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de 10 mg/kg a 100 mg/kg, o  
 en que la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I varía de 1,0 pM a 500 nM.
13. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica

de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular de acuerdo con la Reivindicación 6 u 8, **caracterizado por que**

5 el compuesto de fórmula I se usa intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracerebroventricular, oral o tópicamente.

14. Una cantidad eficaz de los compuestos de fórmula I de la Reivindicación 1 o de una composición farmacéutica de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, un trastorno o enfermedad relacionado con la proliferación celular de acuerdo con la Reivindicación 6 u 8, **caracterizado por que**

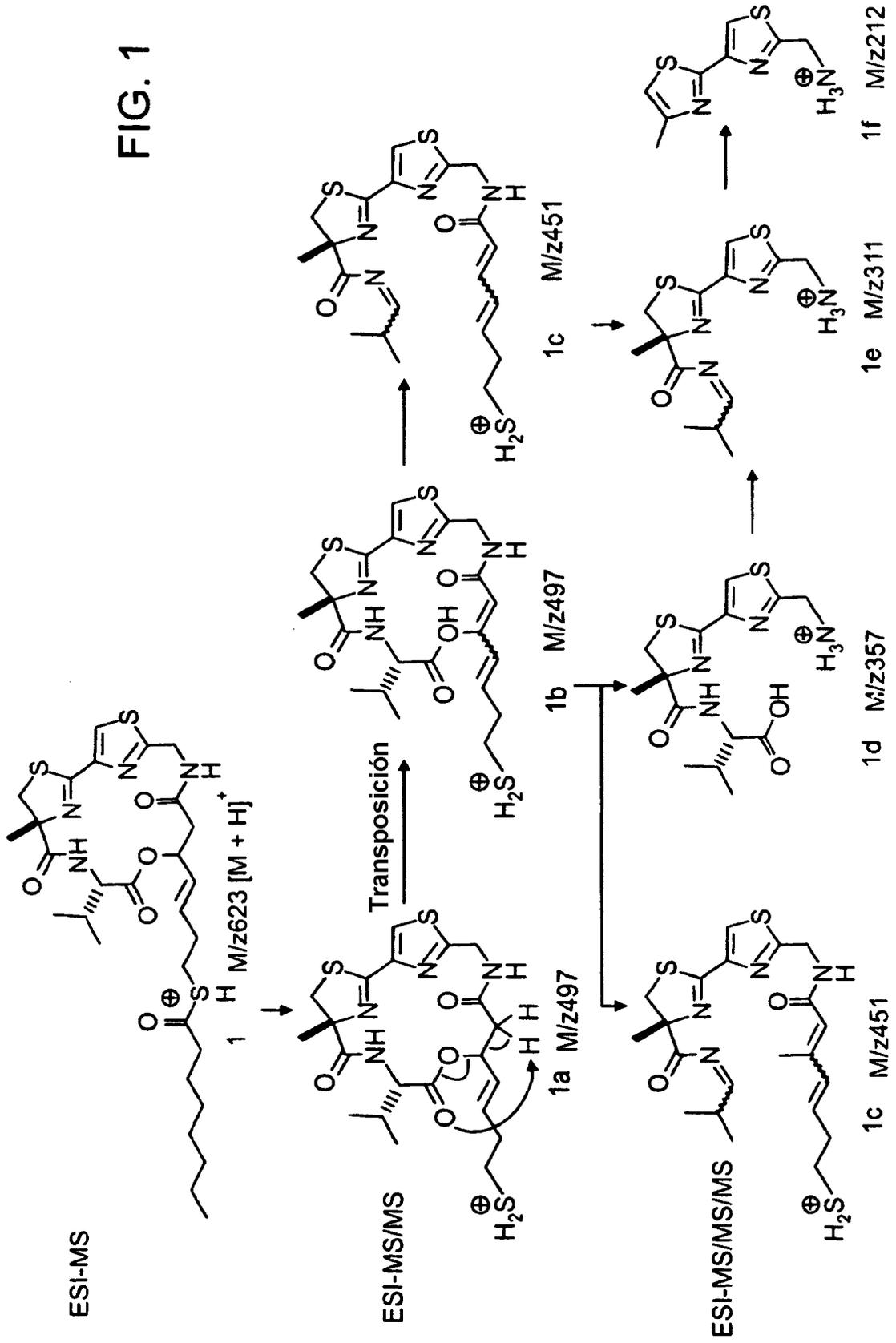
10 el compuesto de fórmula I se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos, en que el agente terapéutico adicional es preferiblemente un agente anticanceroso, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénesis, un agente citotóxico o un agente antiproliferación.

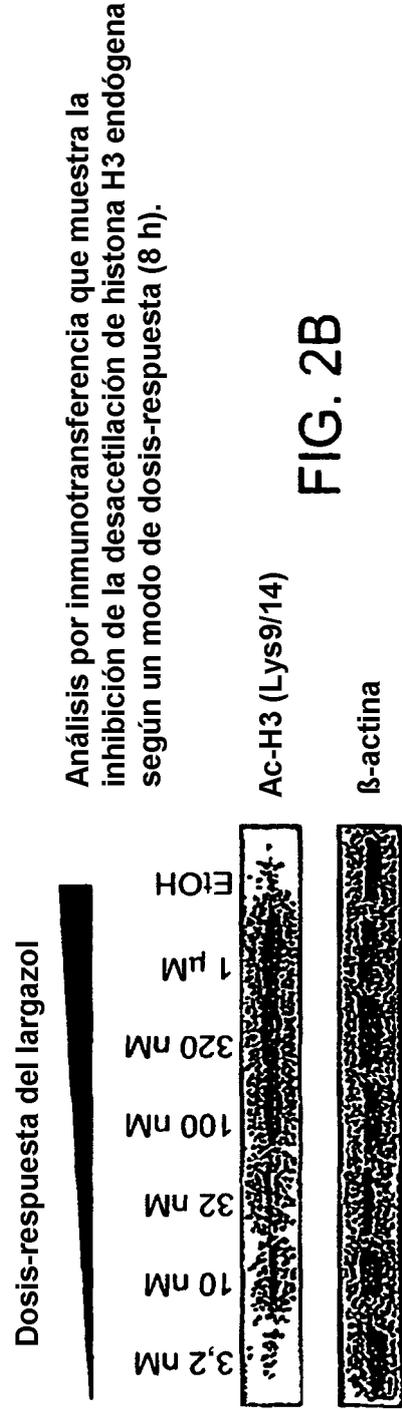
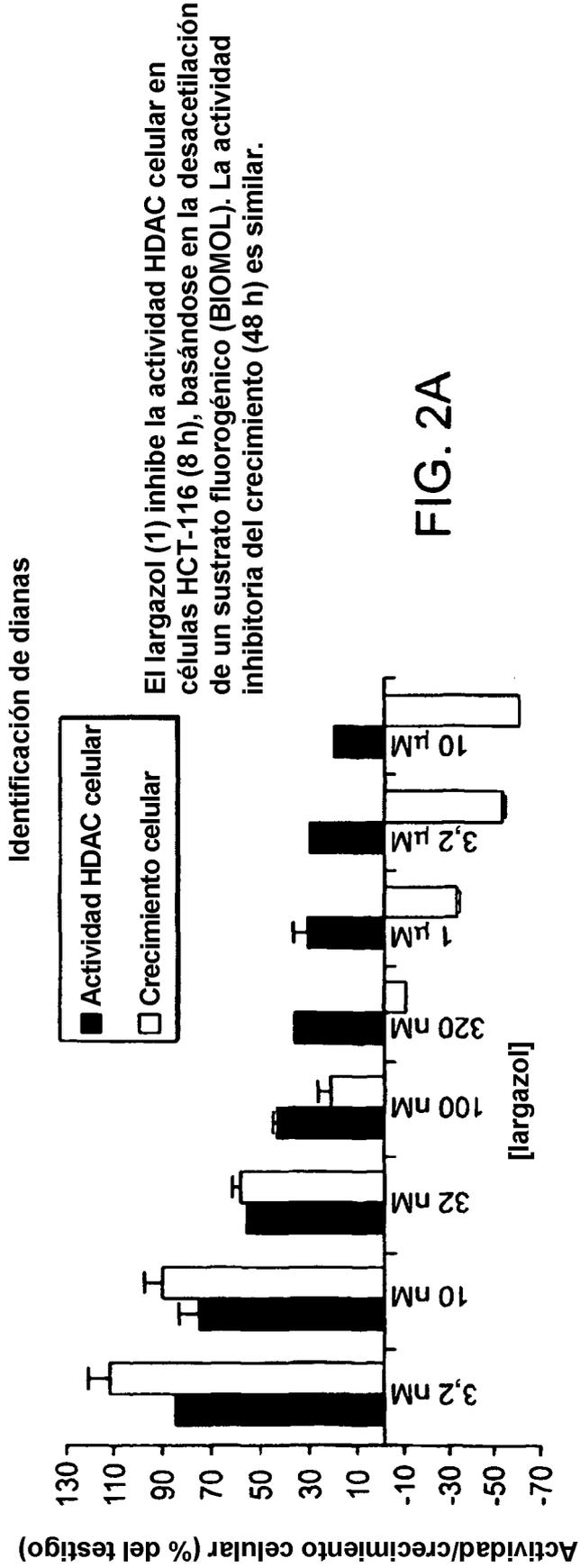
15. Una cantidad eficaz de cualquiera de los compuestos de la Reivindicación 2 para uso en el tratamiento de cánceres o tumores, una enfermedad o trastorno mediado por histona desacetilasa (HDAC) o un linfoma cutáneo de células T, que comprende usar una cantidad eficaz de cualquiera de los compuestos y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o

20 uso de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I de la Reivindicación 1 para uso en el tratamiento de la pérdida de memoria, la inducción de neurogénesis, la potenciación de la retención de memoria, la potenciación de la formación de memoria, el aumento del potencial o la transmisión sinápticas, o el aumento de la potenciación a largo plazo (LTP) en un sujeto, o de enfermedades y trastornos asociados con el destino de células madre y que son afectados por la diferenciación, desdiferenciación o transdiferenciación celulares en un sujeto, que comprende

usar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I de la Reivindicación 1 o de sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

(+) ESI-MS<sup>n</sup> de los iones m/z 623 [M+H]<sup>+</sup>. Vías de disociación y estructuras de productos iónicos del largazol (1)





**FIG. 2B**

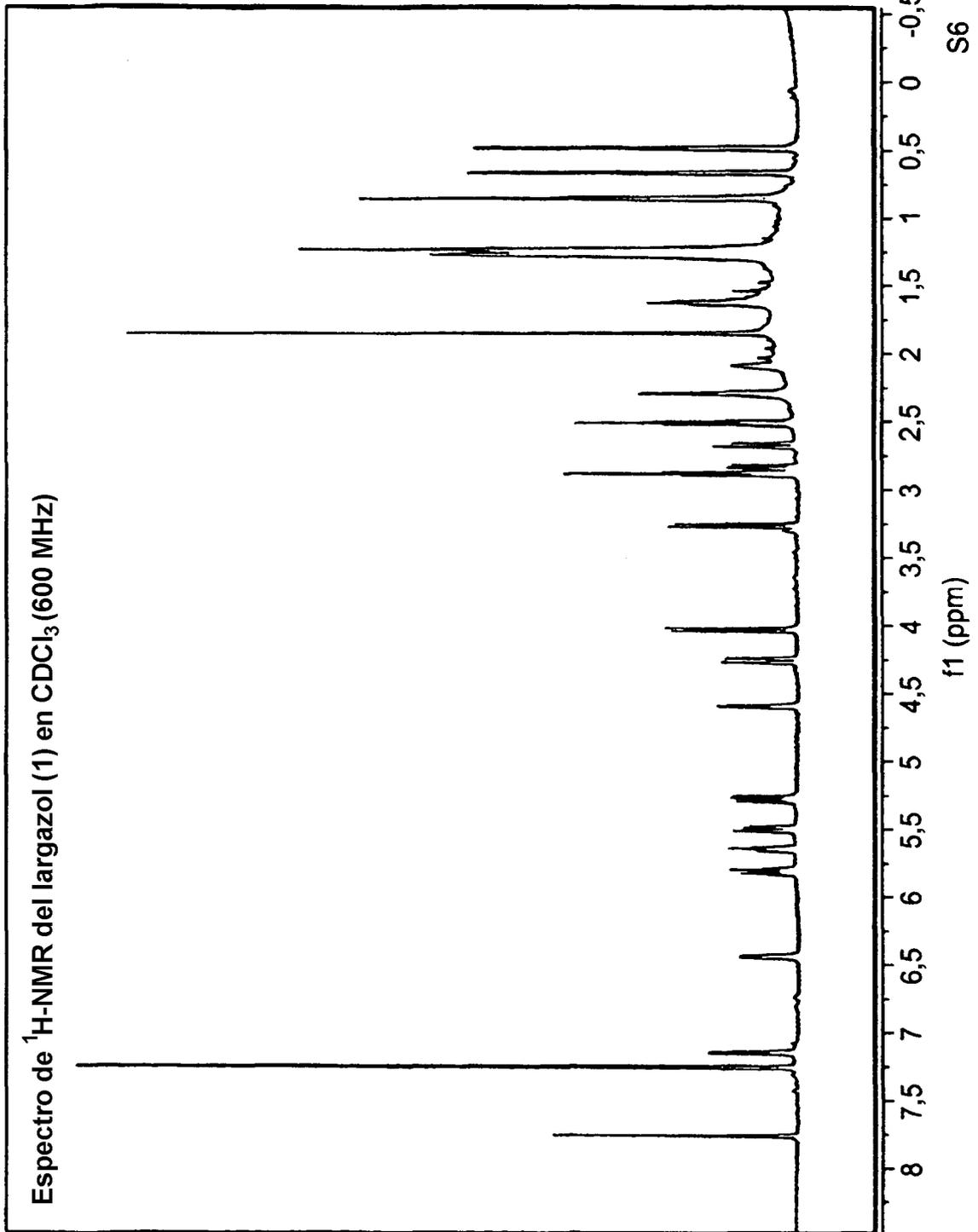


FIG. 3

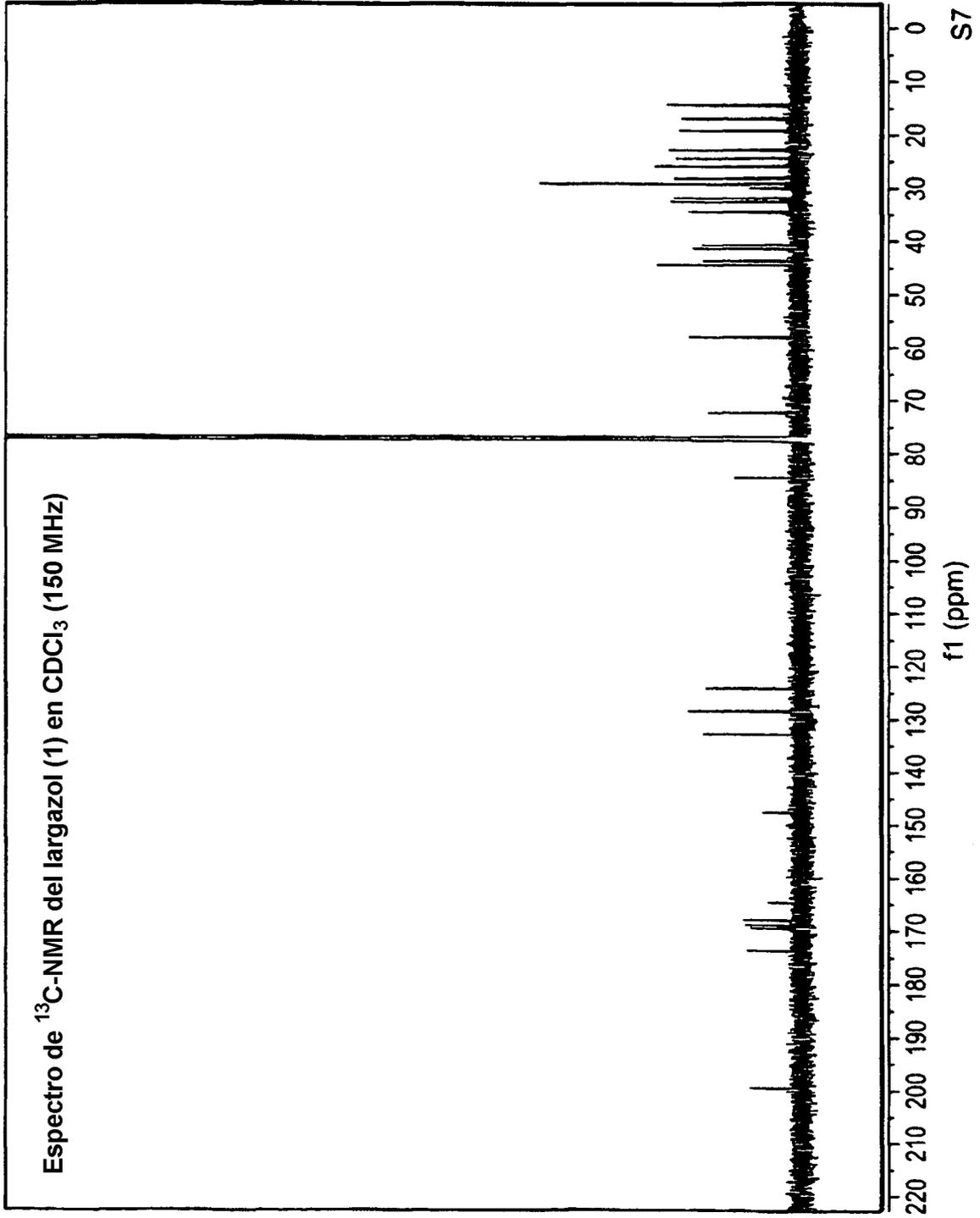
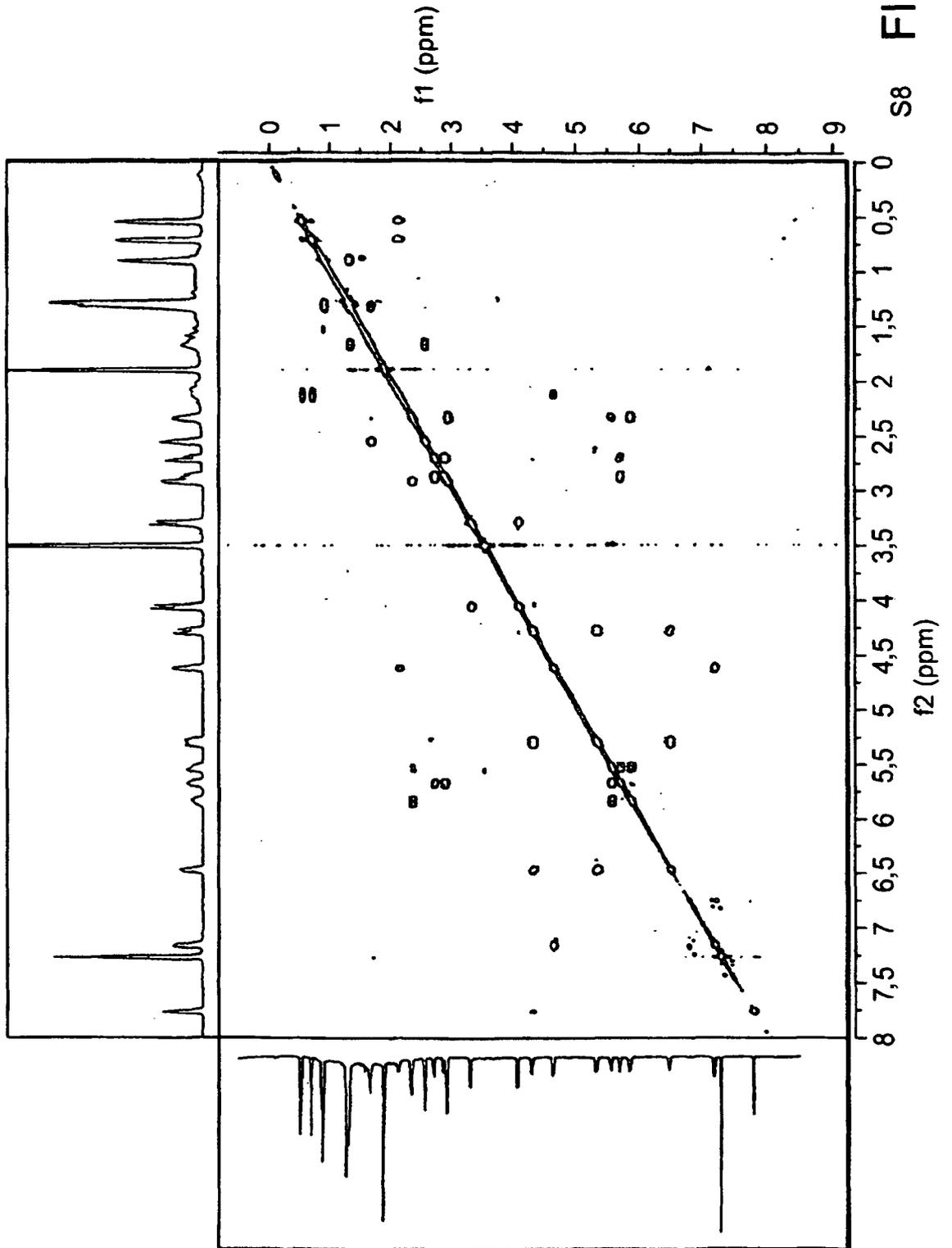


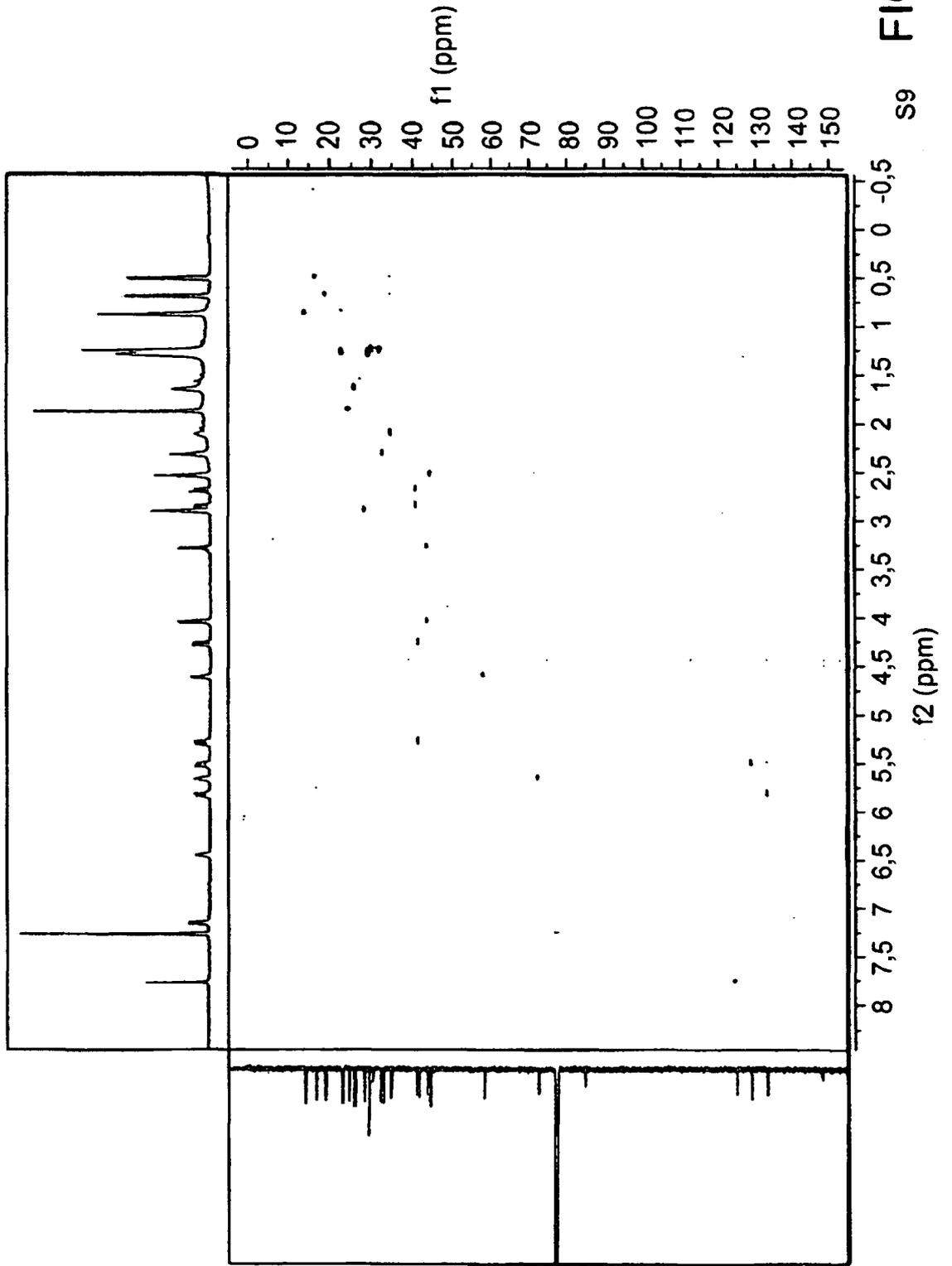
FIG. 4

Espectro COSY del largazol (1) en  $\text{CDCl}_3$



S8 FIG. 5

Espectro HSQC del largazol (1) en  $\text{CDCl}_3$



S9 FIG. 6

Espectro HMBC del largazol (1) en  $\text{CDCl}_3$  (optimizado para  $J_{\text{CH}} = 7 \text{ Hz}$ )

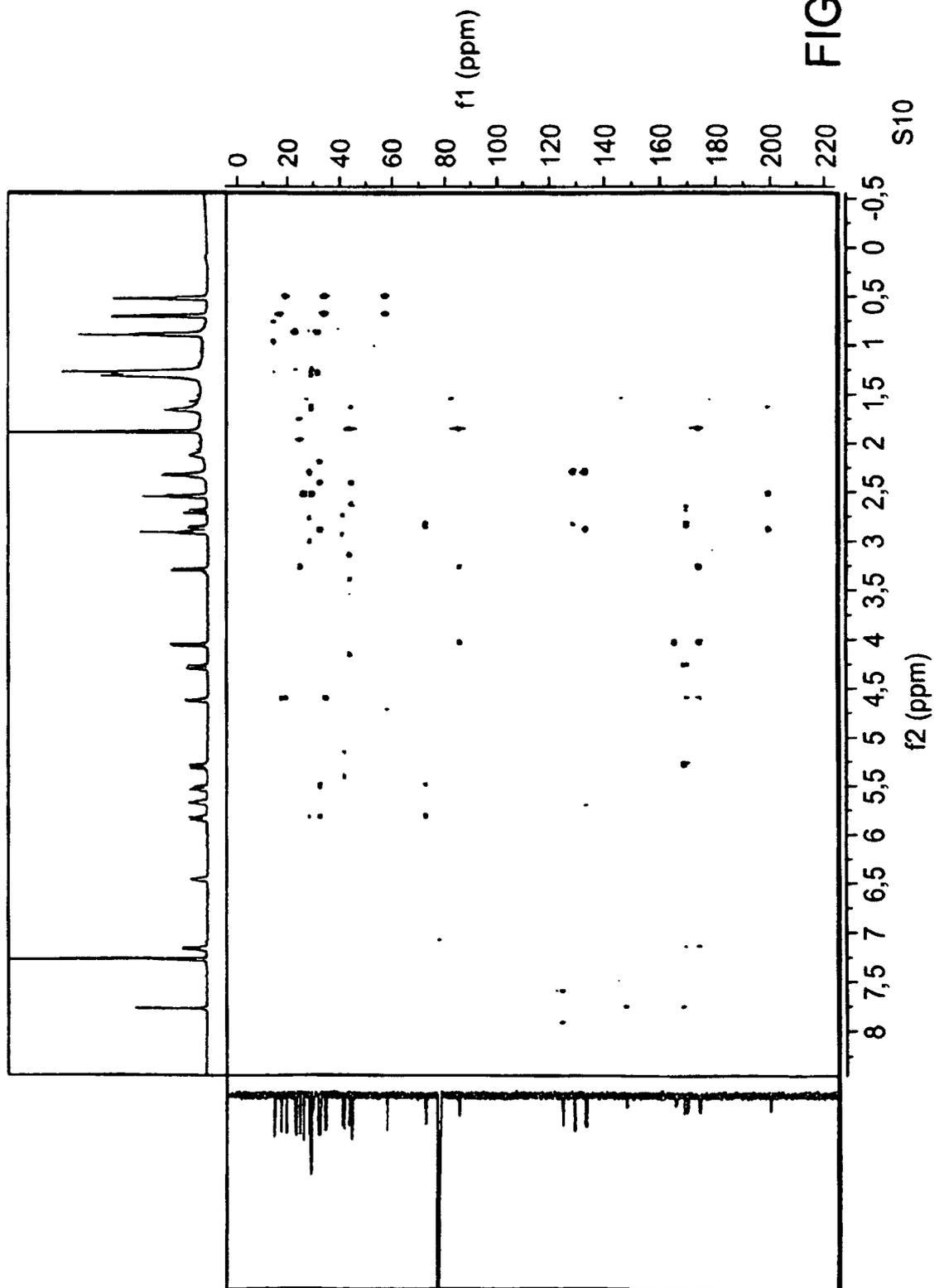
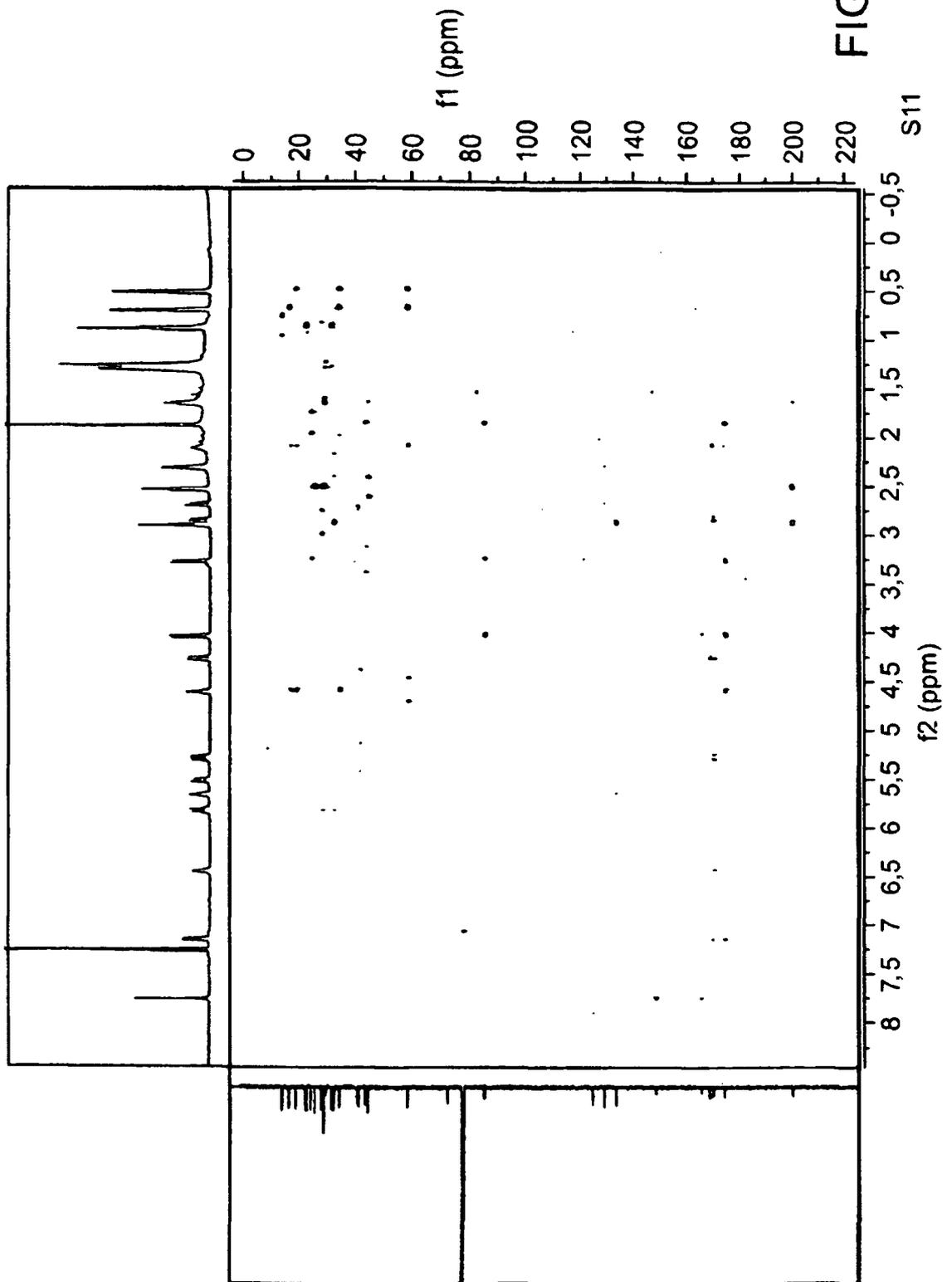


FIG. 7

Espectro HMBC del largazol (1) en  $\text{CDCl}_3$  (optimizado para  $^n J_{\text{CH}} = 3,5 \text{ Hz}$ )



Espectro NOESY del largazol (1) en  $\text{CDCl}_3$

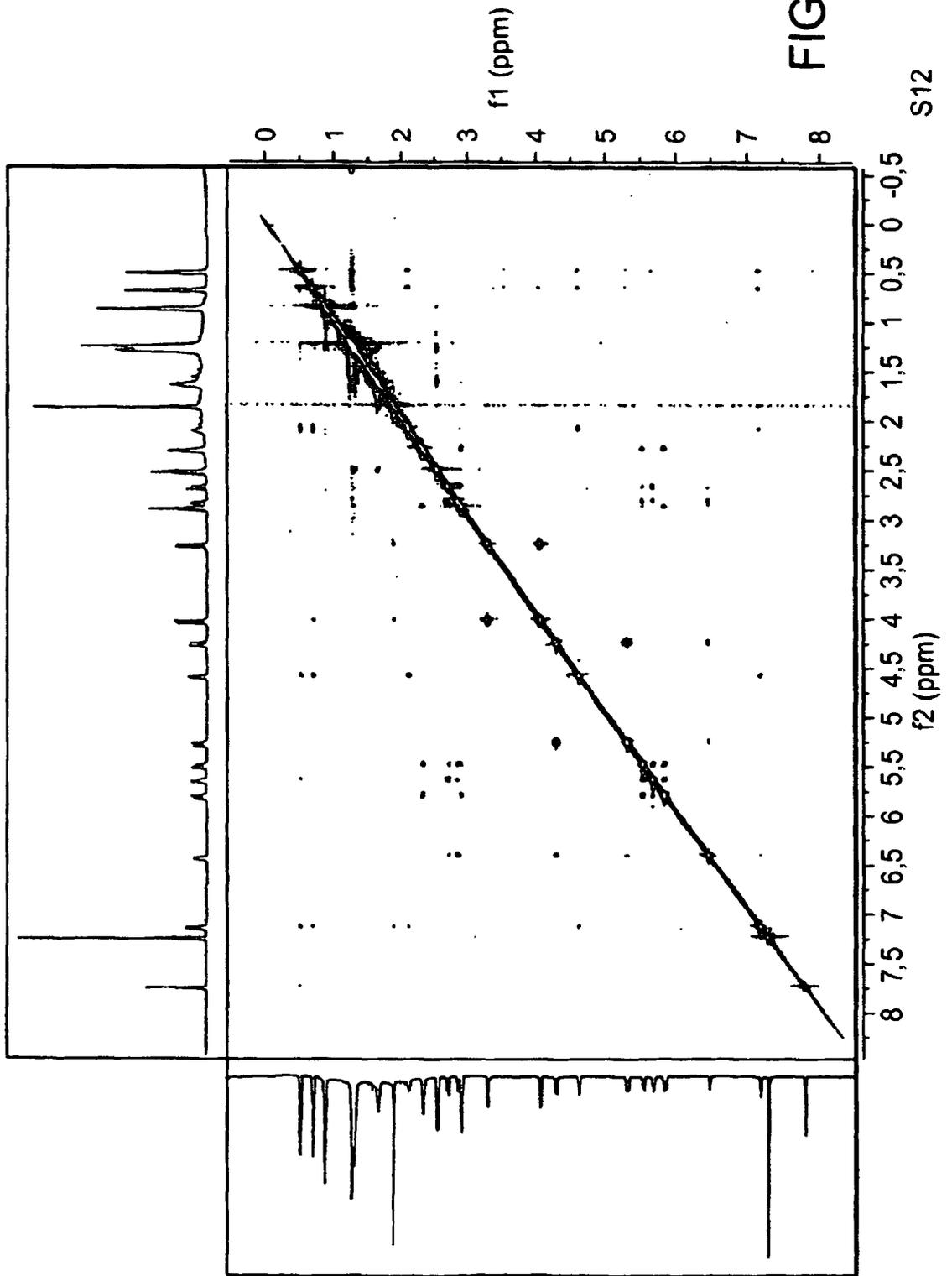


FIG. 9