

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 347**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09725004 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **19.01.2011 EP 2274301**

54 Título: **Derivados de indolilalquilamino sustituidos con aza-biciclohexilo como inhibidores novedosos de histona desacetilasa**

30 Prioridad:

27.03.2008 EP 08153370

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.02.2013

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V. (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**FREYNE, EDDY, JEAN, EDGARD;
PILATTE, ISABELLE, NOËLLE, CONSTANCE y
ANGIBAUD, PATRICK, RENÉ**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 395 347 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

Derivados de indolilalquilamino sustituidos con aza-biciclohexilo como inhibidores novedosos de histona desacetilasa

5 Esta invención se refiere a compuestos que tienen actividad enzimática inhibidora de histona desacetilasa (HDAC). Se refiere además a procesos para su preparación, a composiciones que los comprenden, así como a su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, para inhibir HDAC y como medicamento, por ejemplo como medicamento para inhibir estados proliferativos, tales como cáncer y psoriasis.

10 Las histonas nucleares se conocen como componentes integrales y dinámicos de la maquinaria responsable de la regulación de la transcripción génica y otros procesos con molde de ADN tales como replicación, reparación, recombinación y segregación de cromosomas. Son el sujeto de modificaciones postraduccionales incluyendo acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ribosilación de ADP.

15 La(s) histona desacetilasa(s), denominada(s) en el presente documento "HDAC", son enzimas que catalizan la eliminación de la modificación de acetilo en residuos de lisina de proteínas, incluyendo las histonas nucleosómicas del núcleo H2A, H2B, H3 y H4. Junto con histona acetiltransferasa(s), denominada(s) en el presente documento "HAT", las HDAC regulan el nivel de acetilación de las histonas. El balance de acetilación de histonas nucleosómicas desempeña un papel importante en la transcripción de muchos genes. La hipoacetilación de histonas está asociada con una estructura de cromatina condensada dando como resultado la represión de la transcripción génica, mientras que las histonas acetiladas están asociadas con una estructura de cromatina más abierta y una activación de la transcripción.

25 Se han descrito once HDAC estructuralmente relacionadas y se dividen en tres clases. Las HDAC de clase I consisten en HDAC 1, 2, 3, 8, las HDAC de clase II consisten en HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10 mientras que la HDAC 11 representa a la clase IV. Los miembros de la tercera clase de HDAC no están estructuralmente relacionados con las HDAC de clase I, II y clase IV. Las HDAC de clase I/II/IV funcionan mediante mecanismos dependientes de zinc, mientras que las HDAC de clase III son dependientes de NAD.

30 Además de las histonas, otras proteínas también han sido el sustrato para la acetilación, en particular factores de transcripción tales como p53, GATA-1 y E2F; receptores nucleares tales como el receptor de glucocorticoides, los receptores tiroideos, los receptores de estrógeno; y proteínas reguladoras del ciclo celular tales como pRb. Se ha vinculado la acetilación de proteínas con la estabilización de proteínas, tal como la estabilización de p53, acumulación de cofactores y aumento de la unión de ADN. p53 es un supresor tumoral que puede inducir la detención del ciclo celular o la apoptosis en respuesta a una variedad de señales de estrés, tales como daño de ADN. La diana principal para la detención del ciclo celular inducida por p53 parece ser el gen p21. Tras su activación mediante p53, se ha identificado p21 en virtud de su asociación con complejos de ciclina/cinasa dependiente de ciclina que da como resultado la detención del ciclo celular en las fases tanto G1 como G2, su regulación por incremento durante la senescencia y su interacción con el antígeno nuclear de células proliferantes.

El estudio de inhibidores de HDAC indica que desempeñan un papel importante en la detención del ciclo celular, la diferenciación celular, la apoptosis y la inversión de fenotipos transformados.

45 El inhibidor tricostatina A (TSA), por ejemplo, provoca la detención del ciclo celular en las fases tanto G1 como G2, invierte el fenotipo transformado de diferentes líneas celulares e induce la diferenciación de células de leucemia de Friend y otros. Se ha notificado que TSA (y el ácido suberoilanhidroxámico SAHA) inhibe el crecimiento celular, induce la diferenciación terminal y previene la formación de tumores en ratones (Finnin *et al.*, Nature, 401: 188-193, 1999).

50 También se ha notificado que la tricostatina A es útil en el tratamiento de fibrosis, por ejemplo fibrosis hepática y cirrosis hepática. (Geerts *et al.*, solicitud de patente europea EP 0 827 742, publicada el 11 de marzo de 1998).

55 El farmacóforo para inhibidores de HDAC consiste en un dominio de unión a metal, que interacciona con el sitio activo que contiene zinc de las HDAC, un dominio de ligador y un dominio de reconocimiento de superficie o región de ocupación, que interacciona con residuos en el borde del sitio activo.

60 Se ha notificado también que los inhibidores de las HDAC inducen la expresión del gen p21. La activación transcripcional del gen p21 por estos inhibidores se promueve mediante modificación de cromatina, seguido por acetilación de histonas H3 y H4 en la región del promotor de p21. Esta activación de p21 se produce de manera independiente de p53 y por tanto los inhibidores de HDAC funcionan en células con genes p53 mutados, un distintivo de numerosos tumores.

65 Además, los inhibidores de HDAC pueden tener actividades indirectas tales como un aumento de la respuesta inmunitaria del huésped e inhibición de la angiogénesis tumoral y por tanto pueden suprimir el crecimiento de tumores primarios e impedir la metástasis (Mai *et al.*, Medicinal Research Reviews, 25: 261-309, 2005).

En vista de lo anterior, los inhibidores de HDAC pueden tener gran potencial en el tratamiento de enfermedades o estados proliferativos celulares, incluyendo tumores con genes p53 mutados.

5 La solicitud de patente EP 1472216 publicada el 14 de agosto de 2003 da a conocer hidroxamatos bicíclicos como inhibidores de histona desacetilasa.

Las solicitudes de patente EP 1485099, EP 1485348, EP 1485353, EP 1485354, EP 1485364, EP 1485365, EP 1485370, EP 1485378 publicadas el 18 de septiembre de 2003, entre otras, dan a conocer ácidos piperazinilpirimidinilhidroxámicos sustituidos como inhibidores de histona desacetilasa, además el documento EP 10 1485365 da a conocer R306465.

La solicitud de patente EP 1492534 publicada el 9 de octubre de 2003 da a conocer compuestos de ácido carbámico que comprenden un enlace de piperazina, como inhibidores de HDAC.

15 La solicitud de patente EP 1495002 publicada el 23 de octubre de 2003 da a conocer compuestos de piperazinilfenilbenzamida sustituidos, como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente WO 04/009536 publicada el 29 de enero de 2004 da a conocer derivados que contienen un grupo conector alquilo entre el grupo arilo y el hidroxamato, como inhibidores de histona desacetilasas.

20 La solicitud de patente EP 1525199 publicada el 12 de febrero de 2004 da a conocer hidroxamatos bicíclicos sustituidos con (hetero)arilalquenilo, como inhibidores de histona desacetilasas.

25 La solicitud de patente EP 1581484 publicada el 29 de julio de 2004 da a conocer derivados de derivados de N-hidroxi-benzamida con actividad antiinflamatoria y antitumoral.

La solicitud de patente EP 1585735 publicada el 29 de julio de 2004 da a conocer derivados de hidroxamato de arilo sustituidos como inhibidores de histona desacetilasas.

30 La solicitud de patente WO 04/072047 publicada el 26 de agosto de 2004 da a conocer indoles, benzimidazoles y naftimidazoles como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1608628 publicada el 30 de septiembre de 2004 da a conocer hidroxamatos unidos a sistemas de anillo heterocíclico no aromático como inhibidores de histona desacetilasas.

35 La solicitud de patente EP 1611088 publicada el 28 de octubre de 2004 da a conocer derivados de hidroxamato como inhibidores de histona desacetilasas.

40 La solicitud de patente EP 1546326 publicada el 31 de marzo de 2005 da a conocer benzimidazoles como inhibidores de histona desacetilasas.

Las solicitudes de patente WO 05/030704 y EP 1663953 publicadas el 7 de abril de 2005 dan a conocer benzamidas como inhibidores de histona desacetilasas.

45 La solicitud de patente EP 1685094 publicada el 6 de mayo de 2005 da a conocer hidroxamatos conectados a acilurea y conectados a sulfonilurea como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1682538 también publicada el 6 de mayo de 2005 da a conocer hidroxamatos unidos a biarilo como inhibidores de histona desacetilasas.

50 La solicitud de patente EP 1735319 publicada el 6 de octubre de 2005 describe inhibidores novedosos de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1781639 publicada el 2 de febrero de 2006 da a conocer derivados de indolilalquilamino sustituidos como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente US 05/0234033 A1 publicada el 20 de octubre de 2007 da a conocer, entre otros, derivados de azabiciclohexilo como inhibidores de histona desacetilasas.

60 La solicitud de patente EP 1881977 publicada el 23 de noviembre de 2006 da a conocer, entre otros, derivados de azabiciclohexilo como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente WO 07/045844 publicada el 26 de abril de 2007 da a conocer compuestos de benzamida útiles como inhibidores de histona desacetilasas.

65

La solicitud de patente WO 07/055942 publicada el 18 de mayo de 2007 se refiere a una clase novedosa de nicotinamidas que pueden inhibir la histona desacetilasa.

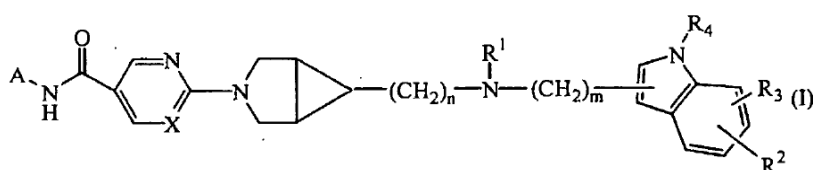
5 Las solicitudes de patente WO 07/082878, WO 07/082880 y WO 07/082882 publicadas el 26 de julio de 2007 dan a conocer derivados de pirimidinas como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente WO 07/091703 publicada el 16 de agosto de 2007 da a conocer pirazinilhidroxiacrilamidas como inhibidores de histona desacetilasa.

10 La solicitud de patente WO 07/100657 publicada el 7 de septiembre de 2007 da a conocer (hetero)arilcarboxamidas como inhibidores de histona desacetilasa.

Los compuestos de la presente invención difieren de la técnica anterior en estructura, en su actividad farmacológica y/o potencia farmacológica.

15 Esta invención se refiere a compuestos de fórmula (I)



20 las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en la que:

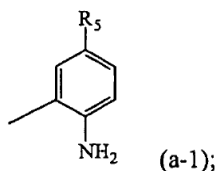
cada n es un número entero con valor 0, 1 ó 2 y cuando n es 0 entonces se entiende que es un enlace directo;

25 cada m es un número entero con valor 1 ó 2;

X es independientemente N o CH;

A es hidroxilo o un radical de fórmula:

30



R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , alquilcarbonilo C_{1-6} , o mono- o di(alquilo C_{1-6})aminosulfonilo;

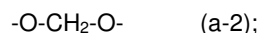
35

R^2 es hidrógeno, hidroxilo, amino, halógeno, alquilo C_{1-6} , ciano, alquenilo C_{2-6} , polihaloalquilo C_{1-6} , nitro, fenilo, alquilcarbonilo C_{1-6} , hidroxicarbonilo, alquilcarbonilamino C_{1-6} , alquilo C_{1-6} , o mono- o di(alquilo C_{1-6})amino;

R^3 es hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} ; o

40

cuando R^2 y R^3 están en átomos de carbono adyacentes, pueden formar el radical bivalente:



45 R^4 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} -alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} , cicloalquilmetilo C_{3-6} , fenilalquilo C_{1-6} ; o

cuando R^2 está en la posición 7 del indolilo entonces R^2 y R^4 juntos pueden formar el radical bivalente;



50



R^5 es hidrógeno o tiofenilo.

Las líneas dibujadas en los sistemas de anillo bicíclico a partir de sustituyentes indican que los enlaces pueden unirse a cualquiera de los átomos de anillo adecuados del sistema de anillo bicíclico.

El término "inhibidor de histona desacetilasas" o "inhibidor de histona desacetilasa" se usa para identificar un compuesto, que puede interactuar con una histona desacetilasa e inhibir su actividad, más particularmente su actividad enzimática. Inhibir la actividad enzimática de histona desacetilasa significa reducir la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. Preferiblemente, tal inhibición es específica, es decir el inhibidor de histona desacetilasa reduce la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir algún otro efecto biológico no relacionado.

Tal como se usa en las definiciones anteriores y a continuación en el presente documento, halógeno es genérico para flúor, cloro, bromo y yodo; alquilo C₁₋₂ radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal que tienen 1 ó 2 átomos de carbono tales como, por ejemplo metilo o etilo; alquilo C₁₋₆ define alquilo C₁₋₂ y radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal y ramificada que tienen de 3 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo propilo, butilo, 1-metiletilo, 2-metilpropilo, pentilo, 2-metil-butilo, hexilo, 2-metilpentilo y similares; y polihaloalquilo C₁₋₆ define alquilo C₁₋₆ que contiene tres sustituyentes de halógeno idénticos o diferentes por ejemplo trifluorometilo; alqueno C₂₋₆ define radicales hidrocarbonados de cadena lineal y ramificada que contienen un doble enlace y tienen de 2 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, etenilo, 2-propenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 3-metil-2-butenilo y similares; cicloalquilo C₃₋₆ incluye grupos hidrocarbonados cíclicos que tienen de 3 a 6 carbonos, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo y similares.

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables abarcan sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, pretenden comprender las formas de sal de adición de ácido no tóxicas terapéuticamente activas que pueden formar los compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades básicas pueden convertirse en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tratando dicha forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálicos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico; ácidos sulfúrico; nítrico; fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiaacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, benzenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-amino-salicílico, pamoico y similares.

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

El término "sales de adición de ácido o base" también comprende los hidratos y las formas de adición de disolvente que pueden formar los compuestos de fórmula (I). Ejemplos de tales formas son por ejemplo hidratos, alcoholatos y similares.

El término "formas estereoquímicamente isoméricas de compuestos de fórmula (I)", tal como se usa en el presente documento, define todos los posibles compuestos constituidos por los mismos átomos unidos mediante la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables, que pueden presentar los compuestos de fórmula (I). A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de un compuesto abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles que puede presentar dicho compuesto. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de fórmula (I) tanto en forma pura como en mezcla entre sí pretenden abarcarse dentro del alcance de la presente invención.

Las formas de *N*-óxido de los compuestos de fórmula (I) pretenden comprender los compuestos de fórmula (I) en la que uno o más átomos de nitrógeno se oxidan para dar el denominado *N*-óxido, particularmente los *N*-óxidos en los que uno o más de los nitrógenos de piperidina, piperazina o piridazinilo están *N*-oxidados.

Algunos de los compuestos de fórmula (I) también pueden existir en sus formas tautoméricas. Tales formas aunque no se indican explícitamente en la fórmula anterior pretenden incluirse dentro del alcance de la presente invención.

Siempre que se use a continuación en el presente documento, el término "compuestos de fórmula (I)" pretende incluir además las sales de adición farmacéuticamente aceptables y todas las formas estereoisoméricas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "histona desacetilasa" y "HDAC" pretenden referirse a una

5 cualquiera de una familia de enzimas que eliminan grupos acetilo de los grupos ϵ -amino de residuos de lisina en el extremo N-terminal de una histona. A menos que se indique lo contrario por contexto, el término "histona" pretende referirse a cualquier proteína de histona, incluyendo H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquier especie. Las proteínas o productos génicos de HDAC humanos, incluyen, pero no se limitan a, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9, HDAC-10 y HDAC-11. La histona desacetilasa también puede derivarse a partir de una fuente protozoaria o fúngica.

10 Un primer grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en los que es aplicable una o más de las siguientes restricciones:

- a) A es hidroxilo;
- b) R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , o mono- o di(alquilo C_{1-6})aminosulfonilo;
- 15 c) R^3 es hidrógeno; o
- d) R^4 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilmetilo C_{3-6} .

20 Un segundo grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) o los compuestos del primer grupo de compuestos interesantes en los que es aplicable una o más de las siguientes restricciones:

- a) cada n es un número entero con valor 0 ó 1;
- b) cada m es un número entero con valor 1;
- 25 c) X es independientemente N;
- d) A es hidroxilo;
- 30 e) R^1 es hidrógeno;
- f) R^2 es hidrógeno, halógeno o ciano;
- g) R^3 es hidrógeno; o
- 35 g) R^4 es alquilo C_{1-6} .

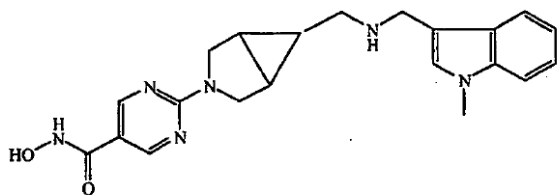
40 Un tercer grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I), los compuestos del primer grupo de compuestos interesantes o los compuestos del segundo grupo de compuestos interesantes en los que es aplicable una o más de las siguientes restricciones:

- a) cada n es un número entero con valor 1;
- 45 b) cada m es un número entero con valor 1;
- c) X es independientemente N;
- d) A es hidroxilo;
- 50 e) R^1 es hidrógeno;
- f) R^2 es hidrógeno;
- g) R^3 es hidrógeno; o
- 55 g) R^4 es alquilo C_{1-6} .

60 Un grupo de compuestos preferidos consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que cada n es un número entero con valor 0 ó 1; cada m es un número entero con valor 1; X es independientemente N; A es hidroxilo; R^1 es hidrógeno; R^2 es hidrógeno, halógeno o ciano; R^3 es hidrógeno; y R^4 es alquilo C_{1-6} .

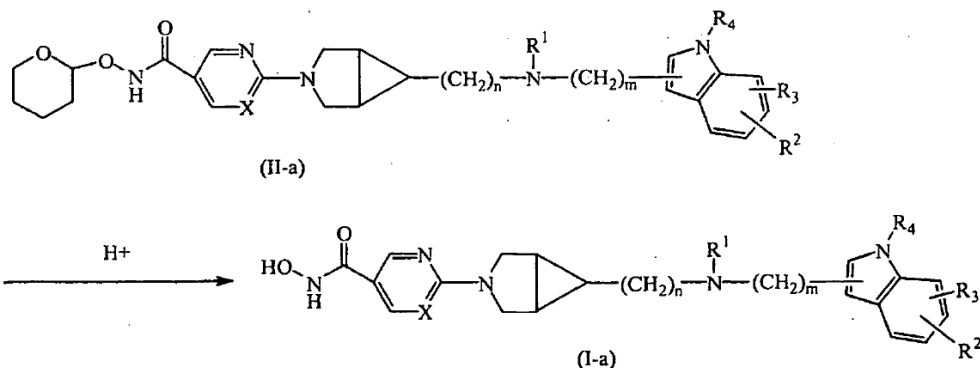
65 Un grupo de compuestos más preferidos consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que cada n es un número entero con valor 1; cada m es un número entero con valor 1; X es independientemente N; A es hidroxilo; R^1 es hidrógeno; R^2 es hidrógeno; R^3 es hidrógeno; y R^4 es alquilo C_{1-6} .

El compuesto más preferido es el compuesto n.^o 1.

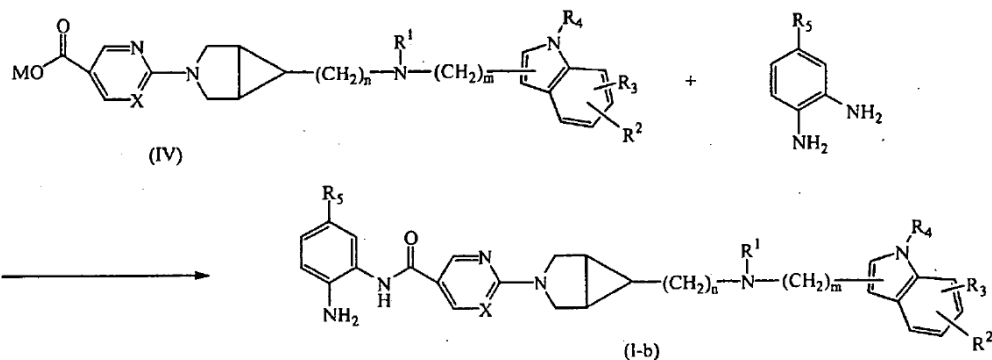


5 Los compuestos de fórmula (I) y (II), sus sales farmacéuticamente aceptables y N-óxidos y formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos pueden prepararse de manera convencional. Los materiales de partida y algunos de los productos intermedios son compuestos conocidos y están comercialmente disponibles o pueden prepararse según procedimientos de reacción convencionales como se conocen generalmente en la técnica o tal como se describen en las solicitudes de patente EP1485099, EP1485348, EP1485353, EP1485354, EP1485364, EP1485365, EP1485370 y EP1485378. A continuación en el presente documento se describirán algunos métodos de preparación en más detalle. En los ejemplos se describen otros métodos para obtener compuestos finales de fórmula (I).

15 a) Los ácidos hidroxámicos de fórmula (I), denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-a), pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (II), en la que Q es tetrahidropiranioloxiaminocarbonilo, denominado en el presente documento producto intermedio de fórmula (II-a), con un ácido apropiado, tal como por ejemplo, ácido trifluoroacético. Dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, metanol o diclorometano.



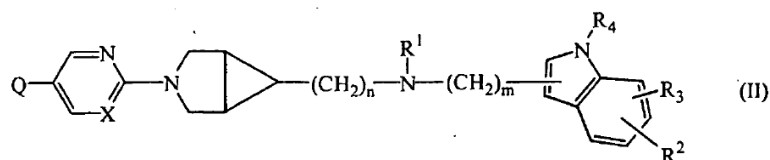
20 b) Los compuestos de fórmula (I) en la que A es un radical de fórmula (a-1), denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-b), pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (IV) en la que M representa hidrógeno o un metal alcalino por ejemplo sodio o litio, con una anilina de fórmula (III), en presencia de una base tal como por ejemplo trietilamina y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfonio (PyBOP). Dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano o diclorometano o una mezcla de los mismos



30 Los compuestos de fórmula (I) también pueden convertirse unos en otros mediante transformaciones de grupo funcional o reacciones conocidas en la técnica. Varias de tales transformaciones ya se describieron anteriormente en el presente documento. Otros ejemplos son hidrólisis de ésteres carboxílicos para dar el alcohol o ácido

carboxílico correspondiente; hidrólisis de amidas para dar las aminas o ácidos carboxílicos correspondientes; hidrólisis de nitrilos para dar las amidas correspondientes; grupos amino en imidazol o fenilo pueden reemplazarse por un hidrógeno mediante reacciones de diazotación conocidas en la técnica y reemplazo posterior del grupo diazo por hidrógeno; los alcoholes pueden convertirse en ésteres y éteres; las aminas primarias pueden convertirse en aminas secundarias o terciarias; los dobles enlaces pueden hidrogenarse para dar el enlace sencillo correspondiente; un radical yodo en un grupo fenilo puede convertirse en un grupo éster mediante inserción de monóxido de carbono en presencia de un catalizador de paladio adecuado.

La presente invención también se refiere a productos intermedios de fórmula (II)



las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en la que:

cada *n* es un número entero con valor 0, 1 ó 2 y cuando *n* es 0 entonces se entiende que es un enlace directo;

cada *m* es un número entero con valor 1 ó 2;

cada *X* es independientemente N o CH;

Q es alquiloxicarbonilo C₁₋₂, hidroxicarbonilo o tetrahidropiraniloxiaminocarbonilo.

*R*¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆; alquylcarbonilo C₁₋₆, o mono- o di(alquilo C₁₋₆)aminosulfonilo;

*R*² es hidrógeno, hidroxilo, amino, halógeno, alquilo C₁₋₆, ciano, alqueno C₂₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, nitro, fenilo, alquylcarbonilo C₁₋₆, hidroxicarbonilo, alquylcarbonilamino C₁₋₆, alquilo xilo C₁₋₆, o mono- o di(alquilo C₁₋₆)amino;

*R*³ es hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆ o alquilo xilo C₁₋₆; y

cuando *R*² y *R*³ están en átomos de carbono adyacentes, pueden formar el radical bivalente:

-O-CH₂-O- (a-2);

*R*⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo xilo C₁₋₆-alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, cicloalquilmétilo C₃₋₆, fenilalquilo C₁₋₆; o

cuando *R*² está en la posición 7 del indolilo entonces *R*² y *R*⁴ juntos pueden formar el radical bivalente;

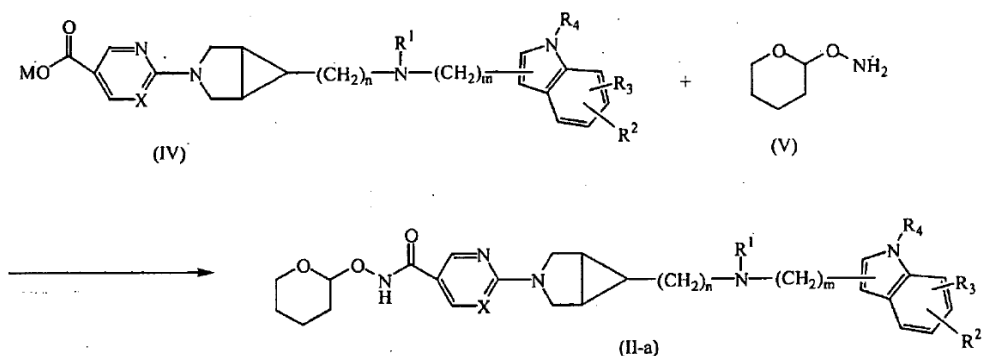
-(CH₂)₂- (a-3), o

-(CH₂)₃- (a-4);

*R*⁵ es hidrógeno o tiofenilo.

Pueden definirse grupos de compuestos interesantes, preferidos, más preferidos y los más preferidos para los compuestos de fórmula (II), según los grupos definidos para los compuestos de fórmula (I).

a) Los productos intermedios de fórmula (II-a) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (IV) en la que M representa un catión de metal alcalino tal como sodio con un producto intermedio de fórmula (V) en presencia de reactivos apropiados tales como monoclóhidrato de *N*-(etilcarbonimidilo)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina (EDC) y 1-hidroxil-1*H*-benzotriazol (HOBT). La reacción puede realizarse en presencia de una base tal como trietilamina, en un disolvente adecuado, tal como, una mezcla de diclorometano y tetrahidrofurano.



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

5

Los compuestos de fórmula (I) tal como se preparan en los procesos descritos anteriormente en el presente documento son generalmente mezclas racémicas de enantiómeros, que pueden separarse entre sí siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) pueden convertirse en las formas de sal diastereoméricas correspondientes mediante reacción con un ácido quirral adecuado. Dichas formas de sal diastereoméricas se separan posteriormente, por ejemplo, mediante cristalización selectiva o fraccionada y los enantiómeros se liberan de la misma mediante álcali. Una manera alternativa para separar las formas enantioméricas de los compuestos de fórmula (I) implica cromatografía de líquidos usando una fase estacionaria quirral. Dichas formas estereoquímicamente isoméricas puras también pueden derivarse de las formas estereoquímicamente isoméricas puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción se produzca de manera estereoespecífica. Preferiblemente si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizaría mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

10

15

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y formas estereoisoméricas de los mismos tienen propiedades farmacológicas valiosas ya que tienen un efecto inhibitor de histona desacetilasa (HDAC).

20

Esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento anómalo de células, incluyendo células transformadas, mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. El crecimiento anómalo de células se refiere al crecimiento celular independiente de mecanismos reguladores normales (por ejemplo pérdida de inhibición de contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento tumoral tanto directamente provocando detención del crecimiento, diferenciación terminal y/o apoptosis de células cancerosas, como indirectamente, inhibiendo la neovascularización de tumores.

25

Esta invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesita dicho tratamiento. En particular, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumores mediante la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención. Ejemplos de tumores que pueden inhibirse son, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (por ejemplo adenocarcinoma e incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas), cánceres pancreáticos (por ejemplo carcinoma pancreático tal como, por ejemplo carcinoma pancreático exocrino), cánceres de colon (por ejemplo carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer de próstata incluyendo la enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de linaje linfóide (por ejemplo leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (LMA)), cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (SMD), tumores de origen mesenquimatoso (por ejemplo fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo cáncer de mama avanzado), carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico.

30

35

40

El compuesto según la invención puede usarse para otros fines terapéuticos, por ejemplo:

45

a) la sensibilización de tumores frente a radioterapia administrando el compuesto según la invención antes, durante o tras la irradiación del tumor para tratar el cáncer;

50

b) tratar artropatías y estados osteopatológicos tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, gota, poliartritis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y lupus eritematoso sistémico;

c) inhibir la proliferación celular de músculo liso incluyendo trastornos proliferativos vasculares, aterosclerosis y

reestenosis;

d) tratar estados inflamatorios y estados dérmicos tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad de injerto contra huésped, conjuntivitis, asma, SDRA, enfermedad de Behcet, rechazo de trasplantes, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, escleroderma, exantema, eczema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística y bronquitis crónica;

e) tratar endometriosis, mioma uterino, sangrado uterino disfuncional e hiperplasia endometrial;

f) tratar la vascularización ocular incluyendo vasculopatía que afecta a los vasos retinianos y coroidales;

g) tratar una disfunción cardíaca;

h) inhibir estados inmunosupresores tales como el tratamiento de infecciones por VIH;

i) tratar la disfunción renal;

j) suprimir los trastornos endocrinos;

k) inhibir la disfunción de gluconeogénesis;

l) tratar una neuropatología por ejemplo enfermedad de Parkinson o una neuropatología que da como resultado un trastorno cognitivo, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o enfermedades neuronales relacionadas con poliglutamina;

m) tratar trastornos psiquiátricos por ejemplo esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, ansiedad y psicosis;

n) inhibir una patología neuromuscular, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica;

o) tratar la atrofia muscular espinal;

p) tratar otros estados patológicos susceptibles de tratamiento potenciando la expresión de un gen;

q) potenciar la terapia génica;

r) inhibir la adipogénesis;

s) tratar parasitosis tal como malaria.

Por tanto, la presente invención da a conocer los compuestos de fórmula (I) para su uso como medicamento así como el uso de estos compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar uno o más de los estados mencionados anteriormente.

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

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

Las muestras biológicas pueden definirse como tejido corporal o fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales son líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero, orina, esputo, saliva y similares.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los compuestos objeto pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto particular, en forma de sal de adición de ácido o base, como principio activo se combina en mezcla profunda con un vehículo farmacéuticamente aceptable, pudiendo adoptar dicho vehículo una amplia variedad de formas dependiendo de la

forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están de manera deseable en una forma de dosificación unitaria adecuada, preferiblemente, para la administración por vía oral, por vía rectal, por vía percutánea o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosificación unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros componentes, para ayudar a la solubilidad por ejemplo. Pueden prepararse disoluciones inyectables, por ejemplo, en las que el vehículo comprende solución salina, disolución de glucosa o una mezcla de solución salina y disolución de glucosa. También pueden prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden emplearse vehículos líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no provocan un efecto perjudicial significativo para la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de diversas maneras, por ejemplo, como parche transdérmico, como formulación de vertido en la cruz o como pomada.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosificación unitarias son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de las mismas.

Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente la cantidad eficaz a partir de los resultados de prueba presentados a continuación en el presente documento. En general se contempla que una cantidad terapéuticamente eficaz sería de desde 0,005 mg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal, y en particular desde 0,005 mg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis en intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis pueden formularse como formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de 0,5 a 500 mg, y en particular de 10 mg a 500 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria.

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

Para el tratamiento de los estados anteriores, los compuestos de la invención pueden emplearse ventajosamente en combinación con uno o más de otros agentes medicinales, más particularmente, con otros agentes anticancerígenos. Ejemplos de agentes anticancerígenos son:

- compuestos de coordinación de platino por ejemplo cisplatino, carboplatino u oxaliplatino;
- compuestos de taxano por ejemplo paclitaxel o docetaxel;
- inhibidores de topoisomerasa I tales como compuestos de camptotecina por ejemplo irinotecán o topotecán;
- inhibidores de topoisomerasa II tales como derivados de podofilotoxina antitumorales por ejemplo etopósido o tenipósido;
- alcaloides de la vinca antitumorales por ejemplo vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- derivados de nucleósido antitumorales por ejemplo 5-fluorouracilo, gemcitabina o capecitabina;
- agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea por ejemplo ciclofosfamida, clorambucilo, carmustina o lomustina;
- derivados de antraciclina antitumorales por ejemplo daunorubicina, doxorubicina, idarubicina o mitoxantrona;
- anticuerpos de HER2 por ejemplo trastuzumab;

- antagonistas de receptores de estrógeno o moduladores de receptores de estrógeno selectivos por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;

5 - inhibidores de aromatasas tales como exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol;

- agentes de diferenciación tales como retinoides, vitamina D y agentes de bloqueo del metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) por ejemplo acutano;

10 - inhibidores de ADN metil transferasa por ejemplo azacitidina;

- inhibidores de cinasa por ejemplo flavoperidol, mesilato de imatinib o gefitinib;

- inhibidores de farnesil transferasa;

15

- otros inhibidores de HDAC;

- inhibidores de la ruta ubiquitina-proteasoma por ejemplo Velcade; o

20 - Yondelis.

El término “compuesto de coordinación de platino” se usa en el presente documento para indicar cualquier compuesto de coordinación de platino que inhibe el crecimiento de células tumorales que proporciona platino en forma de un ion.

25

El término “compuestos de taxano” indica una clase de compuestos que tienen el sistema de anillo de taxano y relacionados con o derivados de extractos de determinadas especies de árboles de tejo (*Taxus*).

30

El término “inhibidores de topoisomerasa” se usa para indicar enzimas que pueden alterar la topología de ADN en células eucariotas. Son críticas para funciones celulares importantes y la proliferación celular. Existen dos clases de topoisomerasas en células eucariotas, concretamente tipo I y tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monomérica de aproximadamente 100.000 de peso molecular. La enzima se une a ADN e introduce una ruptura monocatenaria transitoria, desenrolla la doble hélice (o le permite que se desenrolle) y posteriormente sella nuevamente la ruptura antes de disociarse de la hebra de ADN. La topoisomerasa II tiene un mecanismo de acción similar que implica la inducción de rupturas de hebras de ADN o la formación de radicales libres.

35

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

40

El término “compuestos de podofilotoxina” se usa para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan de la podofilotoxina original, que se extrae de la planta de la mandrágora.

45

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

50

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

55

El término “derivados de antraciclina antitumorales” comprende antibióticos obtenidos del hongo *Strep. peiticus var. caesius* y sus derivados, caracterizados porque tienen una estructura de anillo de tetraciclina con un azúcar no habitual, daunosamina, unido mediante un enlace glicosídico.

60

Se ha mostrado que la amplificación de la proteína del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER 2) en carcinomas de mama primarios se correlaciona con un mal pronóstico clínico para determinados pacientes. El trastuzumab es un anticuerpo anti-IgG1 kappa monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante altamente purificado que se une con alta afinidad y especificidad al dominio extracelular del receptor de HER2.

65

Muchos cánceres de mama tienen receptores de estrógeno y el crecimiento de estos tumores puede estimularse

mediante estrógeno. Los términos “antagonistas de receptores de estrógeno” y “moduladores de receptores de estrógeno selectivos” se usan para indicar inhibidores competitivos de estradiol que se unen al receptor de estrógeno (RE). Los moduladores de receptores de estrógeno selectivos, cuando están unidos al RE, inducen un cambio en la forma tridimensional del receptor, modulando su unión al elemento sensible al estrógeno (ERE) en el ADN.

En mujeres posmenopáusicas, la fuente principal de estrógeno circulante es de la conversión de andrógenos adrenales y ováricos (androstenediona y testosterona) en estrógenos (estrone y estradiol) mediante la enzima aromatasa en tejidos periféricos. La privación de estrógeno a través de la inhibición o inactivación de aromatasa es un tratamiento eficaz y selectivo para algunas pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama dependiente de hormonas.

El término “agente antiestrogénico” se usa en el presente documento para incluir no sólo antagonistas de receptores de estrógeno y moduladores de receptores de estrógeno selectivos sino también inhibidores de aromatasa tal como se comentó anteriormente.

El término “agentes de diferenciación” abarca compuestos que pueden, de diversas maneras, inhibir la proliferación celular e inducir la diferenciación. Se conoce que la vitamina D y los retinoides desempeñan un papel principal en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares normales y malignos. Los agentes de bloqueo del metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) aumentan los niveles de ácidos retinoicos endógenos inhibiendo el catabolismo mediado por citocromo P450 de ácidos retinoicos.

Los cambios de metilación del ADN están entre las anomalías más comunes en la neoplasia humana. La hipermetilación dentro de los promotores de genes seleccionados está asociada habitualmente con la inactivación de los genes implicados. El término “inhibidores de ADN metil transferasa” se usa para indicar compuestos que actúan a través de la inhibición farmacológica de ADN metil transferasa y la reactivación de la expresión del gen oncosupresor.

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

El término “inhibidores de farnesil transferasa” se usa para indicar compuestos que se diseñaron para impedir la farnesilación de Ras y otras proteínas intracelulares. Se ha mostrado que tienen un efecto sobre la proliferación y supervivencia de células malignas.

El término “otros inhibidores de HDAC” comprende pero no se limita a:

- carboxilatos por ejemplo butirato, ácido cinámico, 4-fenilbutirato o ácido valproico;

- ácidos hidroxámicos por ejemplo ácido suberoilanhilidhidroxámico (SAHA), piperazina que contiene análogos de SAHA, hidroxamato de biarilo A-161906 y sus análogos de carbozolil éter, tetrahidropiridina y tetralona, aril-*N*-hidroxicarboxamidas bicíclicas, piroxamida, CG-1521, PXD-101, ácido sulfonamidahidroxámico, LAQ-824, LBH-589, tricostatina A (TSA), oxamflatina, scriptaid, moléculas tricíclicas relacionadas con scriptaid, ácido *m*-carboxicinámico, ácido bishidroxámico (CBHA), ácidos hidroxámicos similares a CBHA, análogo de ácido trapoxinhidroxámico, R306465 y ácidos benzoil y heteroarilhidroxámicos relacionados, aminosuberatos y malonildiamidas;

- tetrapéptidos cíclicos por ejemplo trapoxina, apidicina, depsipéptido, compuestos relacionados con espirucostatina, RedFK-228, tetrapéptidos cíclicos que contienen sulfhidrilo (SCOP), tetrapéptidos cíclicos que contienen ácido hidroxámico (CHAP), TAN-174s y azumamidas;

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

- depudecina.

El término “inhibidores de la ruta ubiquitina-proteasoma” se usa para identificar compuestos que inhiben la destrucción dirigida de proteínas celulares en el proteasoma, incluyendo proteínas reguladoras del ciclo celular.

Para el tratamiento de cáncer, los compuestos según la presente invención pueden administrarse a un paciente tal como se describió anteriormente, junto con irradiación. La irradiación significa radiación ionizante y en particular radiación gamma, especialmente la emitida por aceleradores lineales o por radionúclidos que se usan de manera común hoy en día. La irradiación del tumor mediante radionúclidos puede ser externa o interna.

La presente invención también se refiere a una combinación según la invención de un agente anticancerígeno y un inhibidor de HDAC según la invención.

La presente invención también se refiere a una combinación según la invención para su uso en terapia médica por

ejemplo para inhibir el crecimiento de células tumorales.

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

5 La presente invención también se refiere a un método de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

10 Esta invención proporciona además un método para inhibir el crecimiento anómalo de células, incluyendo células transformadas, administrando una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

15 El otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En el último caso, los dos compuestos se administrarán dentro de un periodo y en una cantidad y manera que sea suficiente para asegurar que se logra un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método y el orden de administración preferidos y las cantidades y regímenes de dosificación respectivos para cada componente de la combinación dependerán del otro agente medicinal e inhibidor de HDAC particular que esté administrándose, su vía de administración, el tumor particular que esté tratándose y el huésped particular que esté tratándose. El método y el orden de administración óptimos y las cantidades y el régimen de dosificación pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica usando métodos convencionales y en vista de la información expuesta en el presente documento.

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

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

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

40 El derivado de podofilotoxina antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 50 a 250 mg/m^2 , particularmente para etopósido en una dosificación de aproximadamente 35 a 100 mg/m^2 y para tenipósido en aproximadamente de 50 a 250 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

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

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

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

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

65 El trastuzumab se administra ventajosamente en una dosificación de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, particularmente de 2 a 4 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

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

Estas dosificaciones pueden administrarse por ejemplo una vez, dos veces o más por ciclo de tratamiento, que puede repetirse por ejemplo cada 7, 14, 21 ó 28 días.

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

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

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

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

La presente invención se refiere además a un producto que contiene como primer principio activo un inhibidor de HDAC según la invención y como segundo principio activo un agente anticancerígeno, como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

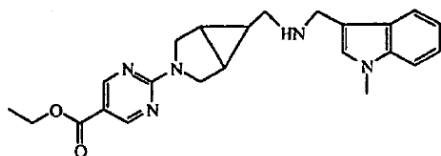
Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines de ilustración. A continuación en el presente documento, "DCM" se define como diclorometano, "DMSO" se define como dimetilsulfóxido, "EDC" se define como monoclóhidrato de *N*'-(etilcarbonimidóil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, "HOBt" se define como 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol, "MeOH" se define como metanol, "TFA" se define como ácido trifluoroacético y "THF" se define como tetrahidrofurano.

A. Preparación de los compuestos intermedios

Ejemplo A1

a) Preparación de producto intermedio 1

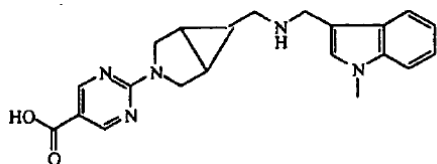


Se agitó una mezcla de éster etílico del ácido 2-(6-aminometil-3-aza-biciclo[3.1.0]hex-3-il)-pirimidina-5-carboxílico (0,11 g, 0,00042 mol) y 1-metil-1*H*-indol-3-carboxaldehído (0,1 g, 0,00063 mol) en MeOH (5 ml) y se sometió a reflujo durante 48 horas, luego se enfrió hasta 10°C. Se añadió DCM (5 ml) y se añadió en porciones tetrahidrobórato de sodio (0,025 g, 0,00067 mol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo (0,17 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo 0,03 g (18%) de producto intermedio 1.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 0,75-0,9 (m, 1H); 1,3 (t, J=7,2 Hz, 3H); 1,5 (s, 2H); 2,6 (d, J= 7,2 Hz, 2H); 3,45-3,6 (m, 2H); 3,7 (s, 3H); 3,8-4,0 (m, 4H); 4,3 (q, J=7,2 Hz, 2H); 6,95 (s, 1H); 7,1 (t, J=7,5 Hz, 1H); 7,15-7,3 (m, 3H); 7,5 (d,

J=7,5 Hz, 1H); 8,7 (s, 2H).

b) Preparación de producto intermedio 2



5

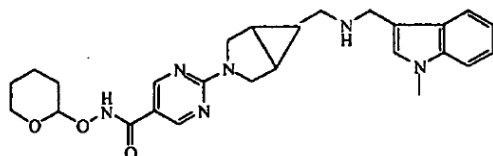
Se agitó una mezcla de producto intermedio 1 (0,03 g, 0,00074 mol) e hidróxido de sodio 1 M (0,59 ml, 0,0006 mol) en THF (1 ml) y MeOH (175 μ l) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evaporaron los disolventes y se acidificó la disolución acuosa resultante hasta pH: 3 – 4 con HCl 1 N, se evaporó el residuo hasta sequedad, produciendo 0,028 g de producto intermedio 2.

10

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): 0,9 (m, 1H); 1,8 (s, 2H); 2,9 (d, J=7,6 Hz, 2H); 3,55 (d, J=11,6 Hz, 2H); 3,8 (s, 3H); 3,85 (d, J=11,6 Hz, 2H); 4,25 (s, 2H); 7,1 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,2 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,45 (d, J=7,6 Hz, 1H); 7,5 (s, 1H); 7,75 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,7 (s, 2H).

15

c) Preparación de producto intermedio 3



20 Se añadieron EDC (0,0551 g, 0,000355 mol), HOBT (0,0479 g, 0,000355 mol) luego trietilamina (0,063 ml, 0,00044 mol) y O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0416 g, 0,000355 mol) a temperatura ambiente a una mezcla de producto intermedio 2 (0,028 g, 0,000074 mol) en DCM (0,8 ml) y THF (4 ml) bajo flujo de N_2 . Después se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Se añadieron de nuevo las mismas cantidades de EDC, HOBT, trietilamina y O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante otros 7 días. Se vertió la disolución en agua helada y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo (0,155 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (3,5 μm) (eluyente: DCM/MeOH/ NH_4OH 98/2/0,2). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente hasta sequedad produciendo 0,016 g (46%) de producto intermedio 3.

25

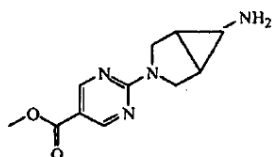
30 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): 0,7-0,85 (m, 1H); 1,5-1,75 (m, 8H); 3,35 (s, 2H); 3,5-3,55 (m, 3H); 3,75 (s, 3H); 3,8 (d, J=11,6 Hz, 2H); 3,85 (s, 2H); 3,95-4,05 (m, 1H); 4,9-4,95 (m, 1H); 7 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,1 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,2 (s, 1H); 7,35 (d, J=7,6 Hz, 1H); 7,6 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,65 (s, 2H); 11,3 (s a, 1H).

30

Ejemplo A2

35

a) Preparación de producto intermedio 4



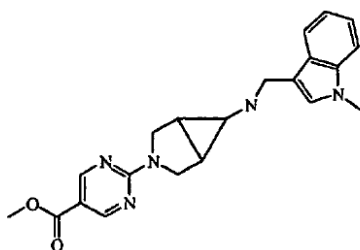
40 Bajo N_2 a temperatura ambiente, se añadió en porciones éster metílico del ácido 2-cloro-pirimidina-5-carboxílico (4,75 g, 0,028 mol) a una disolución de 3-aza-biciclo[3.1.0]hex-6-ilamina (3 g, 0,0306 mol) y carbonato de potasio (6,327 g, 0,046 mol) en acetonitrilo (80 ml). Se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 3 horas. Se vertió la disolución en agua enfriada, se extrajo el producto con DCM, se secó la fase orgánica sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo (3 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/ NH_4OH 97/3/0,5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente hasta sequedad. Se llevó el residuo (1,60 g) a dietil éter. Se filtró y se secó el precipitado, produciendo 1,55 g (22%) de producto intermedio 4, punto de fusión: 149°C.

45

50 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) 1,55 (s, 2H); 1,9 (s a, 2H); 1,95 (s, 1H); 3,5-3,6 (m, 2H); 3,7 (d, J=11,6 Hz, 2H); 3,8 (s, 3H); 8,75 (s, 2H).

50

b) Preparación de producto intermedio 5



5

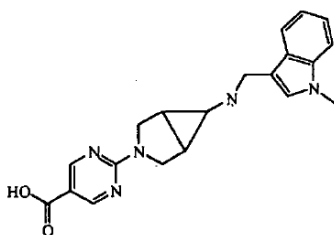
Se calentó una disolución de producto intermedio 4 (1,5 g, 0,0064 mol) y 1-metilindol-3-carboxaldehído (1,53 g, 0,0096 mol) en D (50 ml) durante 24 horas. Se enfrió la disolución a 5°C, se añadieron DCM (50 ml) y tetrahidroborato de sodio (0,39 g, 0,01025 mol). Se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 4 horas. Se vertió la disolución en agua enfriada y se extrajo con DCM. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo (5,2 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente hasta sequedad. Se llevó el residuo (1,73 g, 72%) a dietil éter. Se filtró y se secó el precipitado, produciendo 1,6 g (66%) de producto intermedio 5, punto de fusión: 179°C.

10

¹H-RMN (400 MHz, d₆-DMSO) 1,7 (s, 2H); 1,8 (s, 1H); 3,5-3,6 (m, 2H); 3,7-3,75 (m, 5H); 3,8 (s, 3H); 3,85 (s, 2H); 7,0 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,1 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,2 (s, 1H); 7,35 (d, J=7,6 Hz, 1H); 7,6 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,75 (s, 2H).

15

c) Preparación de producto intermedio 6



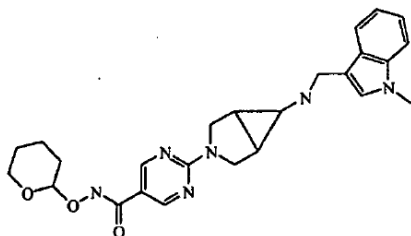
20

Se agitó una mezcla de producto intermedio 5 (1,6 g, 0,00424 mol) e hidróxido de sodio 1 M (33,9 ml, 0,034 mol) en MeOH (1,9 ml) y THF (9,8 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se eliminaron los disolventes a vacío y se acidificó la disolución acuosa resultante hasta pH: 3 – 4. Se filtró y se secó el precipitado, produciendo 1,47g (93%) de producto intermedio 6.

25

¹H-RMN (400 MHz, d₆-DMSO): 1,8 (s a, 2H); 2 (s a, 1H); 3,5-3,6 (m, 2H); 3,7-3,8 (m, 5H); 4 (s a, 2H); 7 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,15 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,3 (s, 1H); 7,4 (d, J=7,6 Hz, 1H); 7,65 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,7 (s, 2H).

d) Preparación de producto intermedio 7



35

Se añadieron EDC (1,2 g, 0,0077 mol), HOBt (1,044 g, 0,0077 mol) luego trietilamina (1,36 ml, 0,0097 mol) y O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,042 g, 0,0097 mol) a temperatura ambiente a una mezcla de producto intermedio 6 (1,17 g, 0,00322 mol) en DCM (6 ml) y THF (30 ml) bajo flujo de N₂. Tras agitar a temperatura ambiente durante 6 días, se vertió la disolución en agua helada y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo (0,17 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente hasta sequedad, produciendo 0,7 g (47%) de producto intermedio 7.

40

¹H-RMN (400 MHz, d₆-DMSO): 1,5-1,73 (m, 8H); 1,8 (s, 1H); 3,5-3,55 (m, 3H); 3,65-3,75 (m, 5H); 3,85 (s, 2H); 3,95-

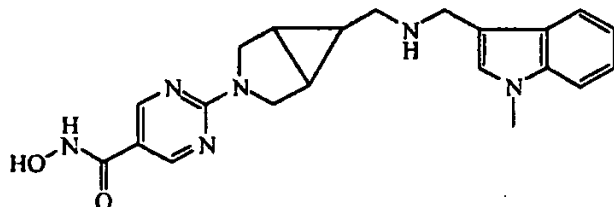
4,05 (m, 1H); 4,9-4,95 (m, 1H); 7,0 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,1 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,2 (s, 1H); 7,35 (d, J=7,6 Hz, 1H); 7,6 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,6 (s, 2H); 11,4 (s a, 1H).

B. Preparación de los compuestos finales

5

Ejemplo B1

Preparación de compuesto 1



10

Se añadió 1,1 C₂HF₃O₂ TFA (78 µl) a una mezcla de producto intermedio 3 (16 mg, 0,000034 mol) en MeOH (1,6 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evaporó el disolvente. Se cristalizó el residuo en dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 9 mg (52%) de compuesto 1 como sal de trifluoroacetato, punto de fusión: 150°C.

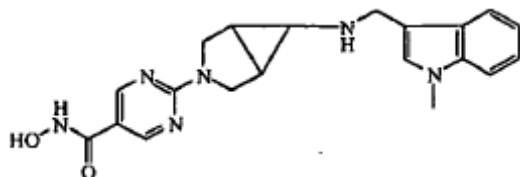
15

¹H-RMN (400 MHz, d₆-DMSO): 0,85-0,95 (m, 1H); 1,8 (s, 2H); 2,95-3,0 (m, 2H); 3,5- 3,55 (m, 2H); 3,8 (s, 3H); 3,85 (d, J=11,6 Hz, 2H); 4,3 (s, 2H); 7,1 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,2 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,45-7,5 (m, 2H); 7,75 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,55-8,7 (m, 3H); 9,0 (s, 1H); 11,1 (s, 1H).

20

Ejemplo B2

Preparación de compuesto 2



25

Se añadió 0,87 C₂HF₃O₂ TFA (0,5 ml) a temperatura ambiente a una mezcla de producto intermedio 7 (0,1 g, 0,00022 mol) en MeOH (10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evaporó el disolvente hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en CH₃CN/dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 90 mg (87%) de compuesto 2 como sal de trifluoroacetato, punto de fusión 157°C.

30

¹H-RMN (400 MHz, d₆-DMSO): 2,15 (s, 2H); 2,55 (s, 1H); 3,5-3,55 (m, 2H); 3,8-3,85 (m, 5H); 4,45 (s, 2H); 7,1 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,2 (t, J=7,6 Hz, 1H); 7,5-7,55 (m, 2H); 7,75 (d, J=7,6 Hz, 1H); 8,65 (s, 2H); 9,1-9,2 (m, 3H); 11,1 (s, 1H).

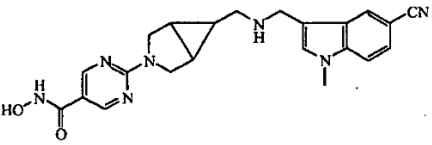
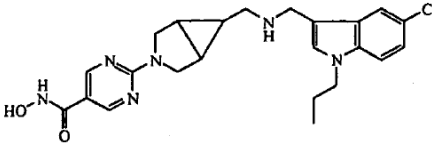
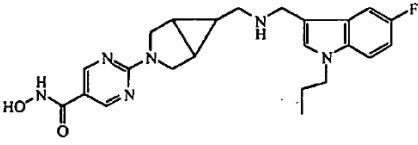
35

La tabla F-1 enumera los compuestos que se prepararon según uno de los ejemplos anteriores. Se usaron las siguientes abreviaturas en las tablas: .C₂HF₃O₂ representa la sal de trifluoroacetato.

Tabla F-1 (compuestos finales)

40

.1,1 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 1; Ej. [B1]; pf: 150°C	0,87 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 2; Ej. [B2]; pf: 157°C
.1,2 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 3; Ej. [B1]; pf: 154°C	.1,1 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 4; Ej. [B1]; pf: 165°C

	
.1,3 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 5; Ej. [B1]; pf: 170°C	.1,7 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 6; Ej. [B1]; pf: 153°C
	
.1,0 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. n.º 7; Ej. [B1]; pf: 184°C	

C. Ejemplo farmacológico:

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

10 Se determinó la actividad celular de los compuestos de fórmula (I) en células tumorales HCT116 usando un ensayo colorimétrico para toxicidad o supervivencia celular (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983) (véase el ejemplo C.2).

Ejemplo C.1.: Ensayo *in vitro* para inhibición de histona desacetilasa:

Ejemplo C.1.a.: Ensayo *in vitro* con sustrato marcado con [³H]:

15 Se incubaron extractos nucleares de HeLa (proveedor: Biomol) a 60 µg/ml con 75 µM de sustrato. Como sustrato para medir la actividad de HDAC se usó un péptido sintético, es decir los aminoácidos 14-21 de histona H4. Se biotiniló el sustrato en la parte NH₂-terminal con un espaciador de ácido 6-aminohexanoico, y se protege en la parte COOH-terminal mediante un grupo amida y se [³H]-acetila específicamente en la lisina 16. Se añadió el sustrato, biotin-(6-aminohexanoico)Gly-Ala-([³H]-acetil-Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂), en un tampón que contenía Hepes 25
20 mM, sacarosa 1 M, BSA 0,1 mg/ml y Triton X-100 al 0,01% a pH 7,4. Tras 30 min. se terminó la reacción de desacetilación mediante la adición de HCl y ácido acético (concentración final 0,035 mM y 3,8 mM respectivamente). Tras detener la reacción, se extrajo el ³H-acetato libre con acetato de etilo. Tras mezclar y centrifugar, se contó la radiactividad en una alícuota de la fase superior (orgánica) en un contador de centelleo.

25 Para cada experimento, se ejecutaron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear de HeLa y DMSO sin compuesto), una incubación blanco (que contenía DMSO pero sin extracto nuclear de HeLa o compuesto) y muestras (que contenían compuesto disuelto en DMSO y extracto nuclear de HeLa). En primer lugar, se sometieron a prueba los compuestos a una concentración de 10⁻⁵ M. Cuando los compuestos mostraron actividad a 10⁻⁵ M, se realizó una curva concentración-respuesta en la que los compuestos se sometieron a prueba a concentraciones de
30 entre 10⁻⁵ M y 10⁻¹² M. En cada prueba se restó el valor blanco de los valores tanto control como de muestra. La muestra control representaba el 100% de desacetilación de sustrato. Para cada muestra se expresó la radiactividad como porcentaje del valor medio de los controles. Cuando era apropiado, se calcularon los valores de CI₅₀ (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos hasta el 50% del control) usando análisis de probit para datos corregidos. En el presente documento los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pCI₅₀ (el valor log negativo del valor CI₅₀) (véase la tabla F-3).

Ejemplo C.1.b.: Ensayo *in vitro* con sustrato marcado de manera fluorescente:

40 Se usó el kit de ensayo de actividad fluorescente de HDAC/descubrimiento de fármaco de Biomol (n.º de cat.: AK-500-0001). El ensayo de actividad fluorescente de HDAC se basa en el sustrato Fluor de Lys (histona desacetilasa lisil fluorogénica) y combinación de revelado. El sustrato Fluor de Lys comprende una cadena lateral de lisina acetilada. La desacetilación del sustrato sensibiliza el sustrato de modo que, en la segunda etapa, el tratamiento con el revelador de Fluor de Lys produce un fluoróforo.

45 Se incubaron extractos nucleares de HeLa (proveedor: Biomol) a 60 µg/ml con 75 µM de sustrato. Se añadió el sustrato Fluor de Lys en un tampón que contenía Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y MgCl₂·6H₂O 1 mM a pH 7,4. Tras 30 min., se añadió 1 volumen del revelador. Se excitó el fluoróforo con 355 nm de luz y la luz emitida (450 nm) se detectó en un lector de placas fluorométrico.

50 Para cada experimento, se ejecutaron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear de HeLa y tampón), una incubación blanco (que contenía tampón pero sin extracto nuclear de HeLa) y muestras (que contenían compuesto

disuelto en DMSO y diluido además en tampón y extracto nuclear de HeLa). En primer lugar, se sometieron a prueba los compuestos a una concentración de 10^{-5} M. Cuando los compuestos mostraron actividad a 10^{-5} M, se realizó una curva concentración-respuesta en la que los compuestos se sometieron a prueba a concentraciones de entre 10^{-5} M y 10^{-9} M. Todas las muestras se sometieron a prueba 4 veces. En cada prueba se restó el valor blanco de los valores tanto control como de muestra. La muestra control representaba el 100% de desacetilación de sustrato. Para cada muestra la fluorescencia se expresó como porcentaje del valor medio de los controles. Cuando era apropiado, se calcularon los valores de CI_{50} (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos hasta el 50% del control) usando análisis de probit para datos corregidos. En el presente documento los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pCI_{50} (el valor log negativo del valor CI_{50}) (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.1.c.: Ensayo *in vitro* para inhibición de histona desacetilasa:

Se incubaron extractos nucleares de HeLa (preparados mediante extracción con sal elevada de núcleos de HeLa, J.D. Dignam *et al.*, S. M. Abmayr *et al.*) con 9 mg/ml en KCl 0,1 M, HEPES/NaOH 20 mM, pH 7,9, glicerol al 20% (v/v), EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF de enzima 0,5 mM. Tras 45 min., a 37°C se terminó la reacción de desacetilación. Se realizó una lectura de la reacción del revelador (también a 37°C) de una manera dependiente del tiempo durante una hora. Para cada experimento, se ejecutaron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear de HeLa y DMSO sin compuesto) y muestras (que contenían compuesto disuelto en DMSO y extracto nuclear de HeLa). Se sometieron a prueba los compuestos a concentraciones de entre 10^{-5} M y 10^{-12} M. La muestra control representaba el 100% de desacetilación de sustrato. Para cada muestra se expresó la actividad como porcentaje del valor medio de los controles. Se calcularon los valores de CI_{50} apropiados (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos hasta el 50% del control) usando el programa Prism. En el presente documento los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pCI_{50} (el valor log negativo del valor CI_{50}) (véase la tabla F-2). El trabajo fue realizado por Reaction Biology Corp. (Malvern, PA, EE.UU.).

Referencias:

1: J.D. Dignam *et al.* Nucl. Acids Res. 1983, 11, 1475

2: S.M. Abmayr *et al.* Genes Devel. 1988, 2, 542

Ejemplo C.2: Determinación de actividad antiproliferativa en células HCT116

Se cultivaron células HCT116 de carcinoma de colon humano obtenidas de la ATCC en medio 5A de McCoy complementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 μ g/ml y suero de ternero fetal inactivado con calor al 10%.

Reactivos usados en el ensayo Alamar Blue

Se adquirió resazurina de Aldrich (n.^o de prod. 199303). Se adquirieron ferrocianuro de potasio, ferricianuro de potasio, KH_2PO_4 y K_2HPO_4 de Sigma (n.^{os} de prod. P9387, P8131, P5655 y P8281, respectivamente).

Se preparó tampón fosfato de potasio 0,1 M (PPB) tal como sigue: se disolvieron 2,72 gramos de KH_2PO_4 y 13,86 gramos de K_2HPO_4 en 500 ml de H_2O mili-Q, se ajustó el pH a pH 7,4 y se llevó el volumen a 1 litro con H_2O mili-Q; se esterilizó con filtración el tampón y se almacenó a temperatura ambiente. Se preparó disolución madre de resazurina (PPB-A) fresca disolviendo 45 mg de resazurina en 15 ml de PBS. Se preparó ferricianuro de potasio 30 mM (PPB-B) disolviendo 0,987 gramos de ferricianuro de potasio en 100 ml de PPB. Se preparó ferrocianuro de potasio 30 mM (PPB-C) disolviendo 1,266 gramos de ferrocianuro de potasio en 100 ml de PPB.

Se preparó una mezcla de PPB-A, PPB-B y PPB-C mezclando volúmenes iguales de las disoluciones respectivas. Se preparó disolución de trabajo de resazurina (denominada en el presente documento disolución "Alamar Blue") diluyendo dicha mezcla 20x (vol/vol) en PPB y esterilizando con filtración; la disolución Alamar Blue podría mantenerse a 4°C durante un máximo de 2 semanas.

Procedimiento del ensayo Alamar Blue

Para experimentos en placas de 384 pocillos se sembraron las células a una densidad de $4,5 \times 10^3$ células/ml en placas de cultivo Falcon de 384 pocillos (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), negras con fondo transparente, en 45 μ l de medio de cultivo. Se permitió que las células se adhirieran al plástico durante 24 h. Se diluyó previamente el compuesto sometido a prueba (1/50 en medio de cultivo) y se añadieron 5 μ l de compuesto diluido previamente a los pocillos. Tras una incubación de 4 días, se añadieron 10 μ l de la disolución Alamar Blue a cada pocillo y se incubaron adicionalmente las células durante 4 h (HCT116) o 24 h (PC-3) a 37°C. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada pocillo en un lector de placas de fluorescencia (Fluorskan, Labsystems, 540 nm de excitación y 590 nm de emisión).

Se calculó la actividad antiproliferativa como porcentaje de células viables restantes en condiciones tratadas frente a control (células no tratadas). Dentro de un experimento, el resultado para cada condición experimental es la media

de 3 pocillos duplicados. Cuando era apropiado, se repitieron los experimentos para establecer curvas completas de concentración-respuesta. Cuando era apropiado, se calcularon los valores de CI_{50} (concentración del fármaco necesaria para reducir el crecimiento celular hasta el 50% del control) usando análisis de probit para datos corregidos (Finney, D. J., Probit Analyses, 2ª Ed. Capítulo 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). En el presente documento los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pCI_{50} (el valor log negativo del valor CI_{50}) (véase la tabla F-2).

Tabla F-2: enumera los resultados de los compuestos que se sometieron a prueba según el ejemplo C.1 y C.2.

Número de compuesto	Actividad enzimática pCI_{50} C.1.c.	Actividad celular pCI_{50} C.2
1	8,39	7,05
2	8,62	6,18
3		7,12
4		7,09
5		6,40
6		7,45
7		7,59

D. Ejemplo de composición: Comprimidos recubiertos con película

Preparación de núcleo de comprimido

Se mezcla bien una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón y después se humidifica con una disolución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinilpirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. Se tamiza la mezcla de polvo húmeda, se seca y se tamiza de nuevo. Luego se añaden 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. Todo se mezcla bien y se comprime para formar comprimidos, proporcionando 10.000 comprimidos, comprendiendo cada uno 10 mg de un compuesto de fórmula (I).

Recubrimiento

A una disolución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se le añade una disolución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. Luego se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanodiol, se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Se añade la última disolución a la primera y luego se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión de color concentrada y todo se homogeniza. Los núcleos de comprimido se recubren con la mezcla así obtenida en un aparato de recubrimiento.

Lista de secuencias

<110> Janssen Pharmaceutica NV

Freyne, Eddy

Pilatte, Isabelle

Patrick, Angibaud

<120> Derivados de indolilalquilamino sustituidos con aza-biciclohexilo como inhibidores novedosos de histona desacetilasa

<130> Documento PRD2845-PCT

<160> 1

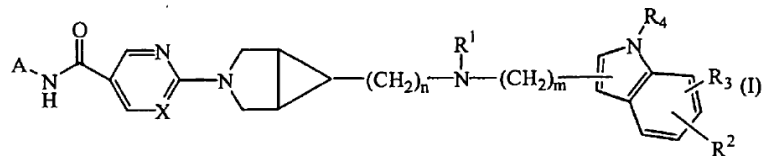
<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> péptido sintético
10 <220>
<221> MOD_RES
15 <222> (1) .. (1)
<223> Acp
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
25 <223> ACETILACIÓN
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (9) .. (9)
<223> AMIDACIÓN
35 <400> 1
Lys Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I),



5

las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en la que:

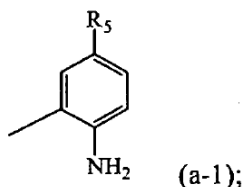
10 cada *n* es un número entero con valor 0, 1 ó 2 y cuando *n* es 0 entonces se entiende que es un enlace directo;

cada *m* es un número entero con valor 1 ó 2;

X es independientemente N o CH;

15

A es hidroxilo o un radical de fórmula:



20 R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , alquilcarbonilo C_{1-6} o mono- o di(alquilo C_{1-6})aminosulfonilo;

R^2 es hidrógeno, hidroxilo, amino, halógeno, alquilo C_{1-6} , ciano, alquenilo C_{2-6} , polihaloalquilo C_{1-6} , nitro, fenilo, alquilcarbonilo C_{1-6} , hidroxicarbonilo, alquilcarbonilamino C_{1-6} , alquiloxilo C_{1-6} , o mono- o di(alquilo C_{1-6})amino;

25

R^3 es hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} o alquiloxilo C_{1-6} ; o

cuando R^2 y R^3 están en átomos de carbono adyacentes, pueden formar el radical bivalente:

30 $-O-CH_2-O-$ (a-2);

R^4 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquiloxi C_{1-6} -alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} , cicloalquilmetilo C_{3-6} , fenilalquilo C_{1-6} ; o

cuando R^2 está en la posición 7 del indolilo entonces R^2 y R^4 juntos pueden formar el radical bivalente;

35

$-(CH_2)_2-$ (a-3), o

$-(CH_2)_3-$ (a-4);

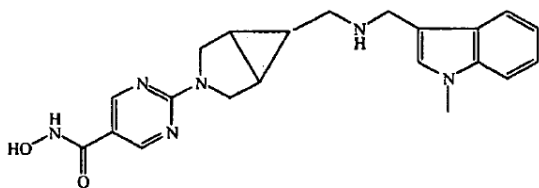
40 R^5 es hidrógeno o tiofenilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que cada *n* es un número entero con valor 0 ó 1; cada *m* es un número entero con valor 1; X es independientemente N; A es hidroxilo; R^1 es hidrógeno; R^2 es hidrógeno, halógeno o ciano; R^3 es hidrógeno; y R^4 es alquilo C_{1-6} .

45

3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que cada *n* es un número entero con valor 1; cada *m* es un número entero con valor 1; X es independientemente N; A es hidroxilo; R^1 es hidrógeno; R^2 es hidrógeno; R^3 es hidrógeno; y R^4 es alquilo C_{1-6} .

50 4. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho compuesto es el compuesto n.º 1



5. Composición farmacéutica que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables y como principio activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 4.

5

6. Proceso de preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en el que los vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto según las reivindicaciones 1 a 4 se mezclan íntimamente.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.

10

8. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

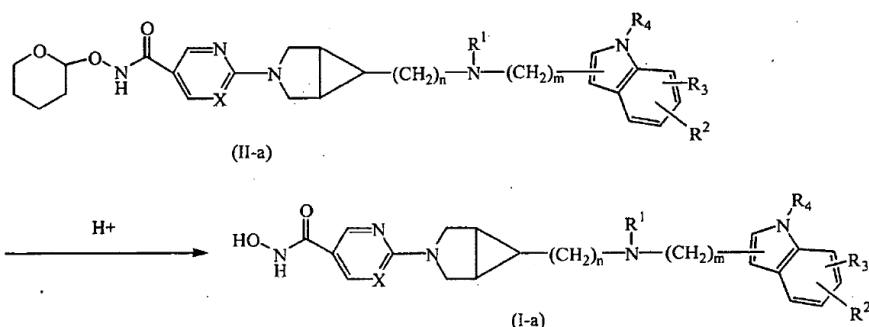
9. Combinación de un agente anticancerígeno y un inhibidor de HDAC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15

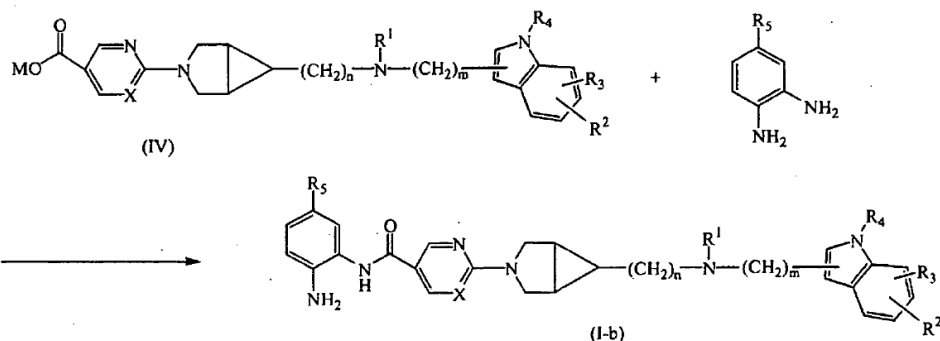
10. Proceso para preparar un compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por

a) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (II), en la que Q es tetrahidropiraniloxiaminocarbonilo, denominado en el presente documento producto intermedio de fórmula (II-a), con un ácido apropiado, produciendo un ácido hidroxámico de fórmula (I-a);

20

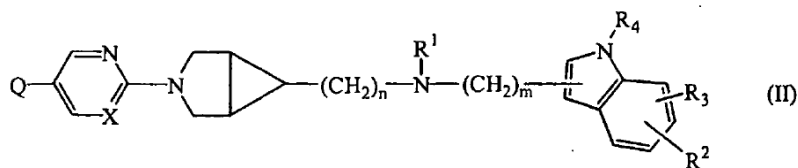


b) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (IV) en la que M representa hidrógeno o un metal alcalino, con una anilina de fórmula (III), en presencia de una base y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfonio (PyBOP) en un disolvente apropiado.



30

11. Compuesto de fórmula (II),



las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en la que:

- 5 cada *n* es un número entero con valor 0, 1 ó 2 y cuando *n* es 0 entonces se entiende que es un enlace directo;
- cada *m* es un número entero con valor 1 ó 2;
- 10 cada *X* es independientemente N o CH;
- Q* es alquiloxicarbonilo C₁₋₂, hidroxycarbonilo o tetrahidropiraniioxiaminocarbonilo;

15 *R*¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, o mono- o di(alquilo C₁₋₆)aminosulfonilo;

*R*² es hidrógeno, hidroxilo, amino, halógeno, alquilo C₁₋₆, ciano, alquenilo C₂₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, nitro, fenilo, alquilcarbonilo C₁₋₆, hidroxycarbonilo, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilo xilo C₁₋₆, o mono- o di(alquilo C₁₋₆)amino;

20 *R*³ es hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆ o alquilo xilo C₁₋₆; y

cuando *R*² y *R*³ están en átomos de carbono adyacentes, pueden formar el radical bivalente:

-O-CH₂-O- (a-2);

25 *R*⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo xilo C₁₋₆-alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, cicloalquilmetilo C₃₋₆, fenilalquilo C₁₋₆; o

cuando *R*² está en la posición 7 del indolilo entonces *R*² y *R*⁴ juntos pueden formar el radical bivalente;

30 -(CH₂)₂- (a-3), o

-(CH₂)₃- (a-4);

*R*⁵ es hidrógeno o tiofenilo.

- 35 12. Proceso para preparar un compuesto según la reivindicación 11, caracterizado por hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II), en la que *M* representa un catión de metal alcalino, denominado en el presente documento compuesto de fórmula (II-a), con un producto intermedio de fórmula (V) en presencia de reactivos apropiados tales como monoclóridato de *N*-(etilcarbonimidilo)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina (EDC) y 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (HOBT) con la formación de un compuesto de fórmula (II-a),
- 40

