

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 670**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 07803397 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2066327**

54 Título: **Inhibidores de histona desacetilasa con actividad combinada sobre histona desacetilasas de clase I y clase IIB en combinación con inhibidores del proteasoma**

30 Prioridad:

15.09.2006 EP 06120726

03.05.2007 US 915895 P

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

02.04.2013

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)

TURNHOUTSEWEG 30

2340 BEERSE, BE

72 Inventor/es:

ARTS, JANINE;

HELLEMANS, PETER WILLEM JAN;

JANICOT, MICHEL MARIE FRANÇOIS y

PAGE, MARTIN JOHN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 399 670 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de histona desacetilasa con actividad combinada sobre histona desacetilasas de clase I y clase IIB en combinación con inhibidores del proteasoma

5 La presente invención se refiere a inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) con actividad combinada sobre histona desacetilasas de clase I y clase II. Se refiere a combinaciones y composiciones que los comprenden, así como a su uso, como medicamento, por ejemplo como medicamento para inhibir tumores hematopoyéticos tales como linfomas y leucemias.

10 La familia de enzimas HDAC lleva el nombre de su primer sustrato identificado, es decir, las proteínas histona nucleares. Las proteínas histona (H2A, H2B, H3 y H4) forman un complejo de octámero, alrededor del cual se enrolla la hélice de ADN con el fin de establecer una estructura de cromatina condensada. El estado de acetilación de histonas está en equilibrio dinámico gobernado por histona acetil transferasas (HAT), que acetilan y HDAC que son responsables de la desacetilación de colas de histona. La inhibición de la enzima HDAC promueve la acetilación de las colas de histona del nucleosoma, favoreciendo una estructura de cromatina más competente desde el punto de vista de la transcripción, que a su vez conduce a la expresión alterada de genes implicados en procesos celulares tales como diferenciación, apoptosis y proliferación celular. En los últimos años, se ha identificado un número creciente de sustratos de HDAC distintos de histonas adicionales.

20 Se observa reclutamiento de HDAC no regulado y constante conjuntamente con factores de transcripción oncogénicos para la cromatina en formas específicas de leucemia y linfoma, tales como leucemia promielocítica aguda (LPA), linfoma no Hodgkin y leucemia mieloide aguda (LMA). Se observó regulación por incremento de HDAC1 al nivel de proteína en células de cáncer de próstata, a medida que la enfermedad evoluciona desde lesiones malignas y adenocarcinoma de próstata que responde a andrógenos bien diferenciado hacia el cáncer de próstata insensible a andrógenos desdiferenciado de manera fenotípica. Además, se encuentra un aumento de la expresión de HDAC2 en la mayoría de los explantes de cáncer de colon humanos que se desencadena por la pérdida del supresor de tumores poliposis coli adenomatosa (APC).

30 En concordancia con el equilibrio de actividad HDAC/HAT en cáncer, se ha mostrado que los inhibidores de HDAC inducen detención del ciclo celular, diferenciación terminal y/o apoptosis en un amplio espectro de líneas de células tumorales humanas *in vitro*, inhiben la angiogénesis y presentan actividad antitumoral *in vivo* en modelos de xenoinjerto humano en ratones desnudos.

35 La familia de HDAC de enzimas se divide comúnmente en 3 clases: es decir, clases I, II y III. Sólo las clases I y II se han implicado predominantemente en la mediación de los efectos de inhibidores de HDAC actualmente en desarrollo clínico.

40 Se ha mostrado que las HDAC del grupo de clase I, que consiste en los miembros 1-3 y 8 de la familia de HDAC, son cruciales para la proliferación de células tumorales.

45 Entre la amplia variedad de factores de transcripción que utilizan HDAC de clase I para silenciar promotores específicos, el ejemplo mejor conocido es la clase de receptores de hormonas nucleares, que solamente se unen a HDAC3 en ausencia de su ligando, y por tanto mantienen un estado de silenciamiento transcripcional. El complejo se disocia de una manera dependiente del ligando, por ejemplo, por retinoides, estrógenos, andrógenos, etcétera, dando como resultado expresión génica y diferenciación. Otro ejemplo clave es el silenciamiento dependiente de HDAC1 del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p21^{waf1,cip1}. El papel crucial de la inducción de p21^{waf1,cip1} en los efectos antiproliferativos de inhibidores de HDAC se demostró mediante estudios que muestran un aumento de 6 veces en la resistencia al inhibidor de HDAC tricostatina A (TSA) en células deficientes en p21^{waf1,cip1} en comparación con las células HCT-116 originales. Además, a diferencia de genes supresores de tumores genuinos, p21^{waf1,cip1} está presente de manera ubicua en células tumorales, y se induce por inhibidores de HDAC.

55 Las histonas no son los únicos sustratos de las HDAC de clase I. Por ejemplo, las HDAC 1-3 desacetilan el supresor de tumores p53, que como consecuencia se ubiquitina y se degrada. Puesto que p53 es un potente supresor de tumores, incluyendo detención del ciclo celular y apoptosis, el mantenimiento de bajos niveles de esta proteína es clave para permitir la supervivencia y proliferación no controlada de células tumorales.

60 Las HDAC de clase II pueden dividirse en 2 subclases: clase IIa que contiene HDAC 4, 5, 7, 9 y la variante de corte y empalme de HDAC 9 MITR. La clase IIb comprende HDAC6 y HDAC10, teniendo ambas dominios de HDAC duplicados. Las HDAC de clase IIa no presentan actividad histona desacetilasa intrínseca sino que regulan la expresión génica funcionando como factores puente puesto que ambas se asocian con complejos de HDAC de clase I y con complejos de factor de transcripción/ADN.

65 HDAC6, un miembro de la clase IIb, ha recibido atención debido a su identificación como Hsp90 desacetilasa. Se ha demostrado que los inhibidores de HDAC LAQ824 y LBH589 inducen la desacetilación de Hsp90 mientras que trapoxina y butirato de sodio no. Hsp90 desacetilasa da como resultado degradación de proteínas cliente pro-

supervivencia y pro-proliferativas asociadas con Hsp90. Los ejemplos clave incluyen Her-2, Bcr-Abl, receptor de glucocorticoides, FLT-3 mutante, c-Raf y Akt. Además de Hsp90, HDAC6 también media la desacetilación de tubulina que da como resultado la desestabilización de microtúbulos en condiciones de estrés.

5 El papel biológico de HDAC6 se confirmó adicionalmente por el hecho de que un inhibidor de molécula pequeña específico de HDAC6, tubacina, provocaba hiperacetilación de α -tubulina y disminuía la motilidad celular sin afectar a la progresión del ciclo celular. Tubacina, que inhibe solamente el dominio α -tubulina desacetilasa de HDAC6, provoca solamente un aumento mínimo en la acetilación de HSP90.

10 En concordancia, se encontró que HDAC6 es clave para la migración celular estimulada por estradiol de células de carcinoma de mama MCF-7.

Finalmente, HDAC6 desempeña un papel crucial en el manejo celular de proteínas mal plegadas y el aclaramiento de éstas del citoplasma.

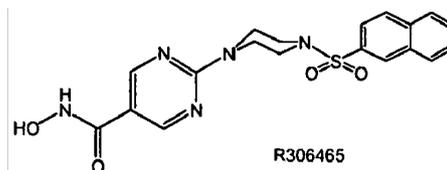
15 Debido al gran número de proteínas reguladoras del ciclo celular reguladas por HDAC al nivel de o bien su expresión o bien su actividad, el efecto antiproliferativo de inhibidores de HDAC no puede vincularse a un único mecanismo de acción. La inhibición de HDAC sigue siendo prometedora en la terapia anticancerígena, en la que los efectos concertados sobre múltiples rutas implicadas en la inhibición del crecimiento, diferenciación y apoptosis pueden ser ventajosos en el tratamiento de una patología heterogénea tal como formación y crecimiento de tumores.

20 A lo largo de los años, se ha hecho evidente que las HDAC no sólo desempeñan un papel clave en la carcinogénesis, sino también en varios procesos de diferenciación no malignos. Esto es lo más evidente para 4, 5, 7 y 9 de clase IIa. Por ejemplo, se ha sugerido que HDAC7 desempeña un papel crítico en la maduración tímica de células T, mientras que HDAC4 se ha implicado en la regulación de la hipertrofia de condrocitos y la formación de hueso endocondral. El mayor interés, sin embargo, se ha centrado alrededor del papel de las HDAC de clase IIa en la diferenciación muscular. Las HDAC 4, 5, 7 y 9 suprimen todas la diferenciación de miocitos (células musculares) como consecuencia de ser correpresores transcripcionales del factor potenciador de miocitos 2 (MEF2).

30 La toxicidad más común observada con inhibidores de HDAC es mielosupresión de grado leve a moderado. Además, aparecen náuseas/vómitos, fatiga y diarrea como efectos adversos en muchos ensayos clínicos.

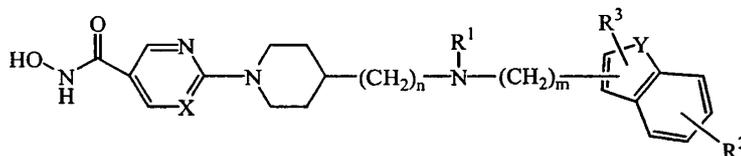
El documento EP 1485365 publicado el 18 de septiembre de 2003 da a conocer entre otros el inhibidor de HDAC R306465.

35



El documento WO 2006/010750 publicado el 2 de febrero de 2006 describe la preparación, la formulación y las propiedades farmacéuticas de compuestos con la siguiente fórmula de Markush.

40



las formas de N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos,

45

en los que n, m, R¹, R², R³, X e Y tienen los significados definidos en dicha memoria descriptiva.

Sin embargo, el potencial de la terapia con inhibidores de HDAC va más allá de su uso como agentes individuales. Las rutas moleculares afectadas por inhibidores de HDAC los convierten en candidatos prometedores para estudios combinatorios.

50

Existe una necesidad de inhibidores con efectos combinados sobre HDAC de clase I y clase IIb que puedan ofrecer ventajas clínicas considerando la eficacia y/o toxicidad, o bien solos o bien en combinaciones con otros agentes terapéuticos.

55

Además, la inhibición del proteasoma representa una importante estrategia recientemente desarrollada en la terapia

contra el cáncer. El proteasoma es un complejo multienzimático presente en todas las células que desempeñan un papel en la degradación de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Varias proteínas reguladoras clave, incluyendo p53, ciclinas y la cinasa dependiente de ciclina p21^{waf1/cip1} se degradan temporalmente durante el ciclo celular mediante la ruta de ubiquitina-proteasoma. Se requiere la degradación ordenada de estas proteínas para que la célula avance a través del ciclo celular y experimente mitosis. Además, se requiere la ruta de ubiquitina-proteasoma para la regulación transcripcional.

Los documentos EP788360, EP 1312609, EP 1627880, US 6066730 y US 6083903 dan a conocer compuestos de ácido y éster péptido borónicos útiles como inhibidores del proteasoma. Uno de los compuestos, ácido N-pirazincarbonil-L-fenilalanina-L-leucinaborónico (PS-341, ahora conocido como bortezomib o Velcade (Millenium)) tiene actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de tumor humano y ha recibido su aprobación para el tratamiento de pacientes que tienen mieloma múltiple que no responde al tratamiento con recidiva, y actualmente está sometándose a ensayos clínicos en indicaciones adicionales, incluyendo cánceres hematológicos adicionales así como tumores sólidos. Bortezomib induce muerte celular provocando una acumulación de proteínas mal plegadas y dañadas de otra forma activando de ese modo la ruta mitocondrial de apoptosis, por ejemplo mediante mecanismos dependientes de Bax o especies reactivas de oxígeno.

Bortezomib provoca el secuestro de proteínas conjugadas con ubiquitina en estructuras denominadas agresomas. Los agresomas parecen participar en una respuesta citoprotectora que se activa en respuesta a la inhibición del proteasoma trasladando quizás proteínas ubiquitiladas a lisosomas para su degradación.

La formación de agresomas inducida por bortezomib podría alterarse usando el inhibidor de HDAC SAHA (ácido suberoilánilida hidroxámico). SAHA también demuestra efectos sinérgicos sobre la apoptosis *in vitro* y en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático ortotópico *in vivo* (Cancer Research 2006; 66: (7) 3773-3781).

Otro inhibidor de HDAC, LAQ824, también demuestra niveles sinérgicos de muerte celular con bortezomib (Journal of Biological Chemistry 2005; 280: (29) 26729-26734).

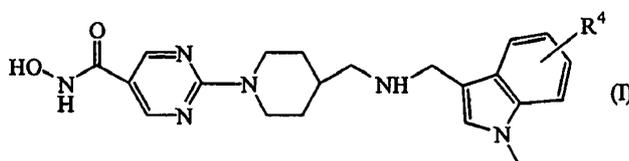
El efecto sinérgico de SAHA y LAQ824 con bortezomib se ha relacionado con su actividad inhibidora de HDAC6.

Existe una necesidad adicional de aumentar la eficacia inhibidora de inhibidores del proteasoma frente al crecimiento tumoral y además de disminuir las dosificaciones de tales agentes para reducir la posibilidad de efectos secundarios tóxicos adversos en el paciente.

Por el momento, no están disponibles datos robustos de la correlación del grado de acetilación con la respuesta tumoral. Serán cruciales para su futuro métodos rápidos, sencillos y fácilmente reproducibles de cuantificación del grado de acetilación de sustratos de histona y distintos de histona provocada por los inhibidores de HDAC descritos a continuación o combinaciones que comprenden dichos inhibidores de HDAC.

Es un objeto de la invención proporcionar inhibidores de HDAC y combinaciones terapéuticas de un inhibidor del proteasoma e inhibidores de HDAC del tipo descrito a continuación que pueden tener efectos de acetilación característicos y robustos, inhibición de HDAC tanto de clase I como de clase IIb, efecto inhibidor ventajoso frente al crecimiento de células tumorales y menos efectos secundarios no deseados.

Se describen en el presente documento una combinación de un inhibidor del proteasoma y un inhibidor de HDAC de fórmula (I)



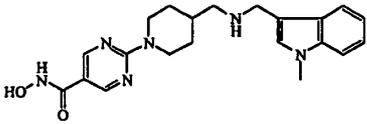
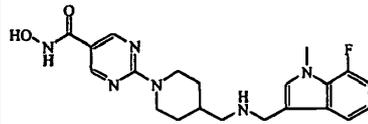
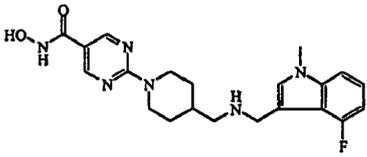
las sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en el que

R⁴ se selecciona de hidrógeno o halógeno.

Compuestos interesantes son aquellos compuestos de fórmula (I) en la que R⁴ es flúor.

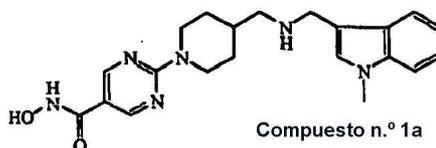
Compuestos más interesantes son aquellos compuestos de fórmula (I) en la que R⁴ está en la posición 4 ó 7 del indol.

Compuestos preferidos de fórmula (I) son el compuesto n.º 1a, compuesto n.º 30 y compuesto n.º 39 que corresponden a la numeración tal como se indica en el documento WO 2006/010750.

	
$C_2HF_3O_2$; compuesto 1a	$C_2HF_3O_2$ (1:1); compuesto 30
	
$C_2HF_3O_2$ (1:1); compuesto 39	

Otro compuesto preferido de fórmula (I) son los compuestos en los que R^4 es hidrógeno. Según la invención, el inhibidor de HDAC de fórmula I es el compuesto n.º 1a (JNJ26481585)

5



o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor del proteasoma es bortezomib.

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

Tal como se usa en las definiciones anteriores y a continuación en el presente documento, halógeno es genérico para flúor, cloro, bromo y yodo.

15

Tal como se usa en el presente documento, los términos “histona desacetilasa” y “HDAC” pretenden referirse a una 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” pretenden referirse a cualquier proteína histona, incluyendo H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquier especie. Las proteínas HDAC humanas o los productos génicos 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 de una fuente protozoaria o fúngica.

20

El término “inhibidor de histona desacetilasa” se usa para identificar un compuesto que puede interaccionar 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 u otro sustrato proteico. 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 u otro sustrato de proteína a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir algún otro efecto biológico no relacionado.

25

30

El término “inhibidores de HDAC con actividad combinada sobre HDAC de clase I y clase IIb” o “inhibición de HDAC de clase I y clase IIb” se usa para identificar compuestos que reducen la actividad enzimática de tanto un miembro de la familia de HDAC de clase I (HDAC 1-3 u 8) como de un miembro de la familia de HDAC de clase IIb (HDAC 6 ó 10) a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir la inhibición de otras clases de enzimas HDAC tales como por ejemplo la clase IIa o a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir la inhibición de algún otro efecto biológico relacionado.

35

Tal como se usa en el presente documento, los términos “proteasoma” y “sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS)” pretenden referirse a una cualquiera de las estructuras y funciones de todos los componentes en el UPS que incluyen, pero no se limitan a:

40

a) la ubiquitina (Ub) y las proteínas similares a ubiquitina (Ulp); por ejemplo SUMO, NEDD8, ISG15 y similares,

45

b) monómeros de ubiquitina, cadenas de poliubiquitina unidas a K48, cadenas de poliubiquitina unidas a K63 y

similares,

c) las enzimas de activación de ubiquitina E1; por ejemplo E1^{Ub}, E1^{SUMO}, E1^{NEDD8}, E1^{ISG15} y similares,

5 d) subunidades de las enzimas de activación de ubiquitina E1; por ejemplo APPBP1, UBA3, SAE1, SAE2 y similares,

e) las enzimas de conjugación de ubiquitina E2; por ejemplo UBC9, UBC12, UBC8 y similares,

10 f) las ligasas de ubiquitina E3; por ejemplo E3 RING-finger, E3 RING-finger sencillas, E3 RING-finger basadas en culina, E3 dependientes de RBX1-/RBX2, E3 de dominio HECT, E3 de U-box y similares,

g) el complejo ubiquitina E3-ligasa de SCF (SKP1-culina1-F-box), por ejemplo SCF^{SKP2}, SCF^{B-TRCP}, SCF^{FBW7} y similares,

15 h) las culinas, por ejemplo CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5 y similares,

i) las proteínas F-box, por ejemplo proteínas SKP2, B-TRCP, proteínas FBW y similares,

20 j) otros adaptadores específicos de sustrato, por ejemplo proteínas BTB, proteínas SOCS-box, DDB1/2, VHL y similares,

k) el proteasoma, sus componentes y similares,

25 l) la metaloisopeptidasa RPN11, una subunidad de la tapa del proteasoma, que desubiquitila dianas del UPS antes de su destrucción, y similares,

m) la metaloisopeptidasa CSN5, una subunidad del complejo COP9-signalosoma, que es responsable de eliminar NEDD8 de culinas, y similares,

30 n) la etapa de activación, mediante una enzima de activación de ubiquitina E1, en la que el Ub/Ulp se adenila en primer lugar en su residuo de glicina C-terminal y luego se carga como un éster de tiol, de nuevo en su extremo C-terminal,

35 o) la transferencia del Ub/Ulp desde enzimas de activación de ubiquitina E1 hasta una enzima de conjugación de ubiquitina E2,

p) reconocimiento del conjugado de ubiquitina,

40 q) transferencia y unión del complejo sustrato-ubiquitina al proteasoma,

r) eliminación de la ubiquitina, o

s) degradación del sustrato.

45 El término "inhibidor del proteasoma" e "inhibidor del sistema ubiquitina-proteasoma" se usa para identificar un compuesto, que puede interactuar con uno de los componentes normales, alterados, hiperactivos o sobreexpresados en el UPS e inhibir su actividad, más particularmente su actividad enzimática. Inhibir la actividad enzimática de UPS significa reducir la capacidad de un componente del UPS para realizar su actividad. Preferiblemente, tal inhibición es específica, es decir, el inhibidor del proteasoma reduce la actividad de un componente del UPS a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir algún otro efecto biológico no relacionado. Los inhibidores de la actividad de un componente del UPS incluyen, pero no se limitan a:

55 a) inhibidores de adenilación de Ub o Ulp bloqueando el acceso de Ub/Ulp al sitio de adenilato o bloqueando el acceso del ATP; por ejemplo imatinib (Gleevec; Novartis) y similares,

b) alteradores de la interacción de E3 o complejo de E3 con E2,

60 c) interruptores de la interacción entre el sustrato y el dominio de interacción con el sustrato en el E3 o complejo de E3, tal como bloqueando la interacción entre p53 (el sustrato) y MDM2 (la E3 RING-finger), por ejemplo nutlinas (mediante unión a MDM2), RITA (mediante unión al extremo N-terminal de p53) y similares,

d) interruptores del complejo E3-ligasa,

65 e) agentes de reclutamiento artificial de sustratos a las ligasas de ubiquitina, por ejemplo protacs y similares,

f) inhibidores del proteasoma y sus componentes, por ejemplo bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, Bsc2118 y similares,

5 g) inhibidores de la eliminación de ubiquitina/Ulp tales como inhibidores de las metaloisopeptidasas RPN11 y CSN5,
o

h) modificadores de la cadena de poliubiquitina, por ejemplo ubistatinas y similares.

10 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 tóxica 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 hidrácidos halogenados, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico; ácidos sulfúrico; nítrico; fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-amino-salicílico, pamoico y similares.

20 Los compuestos de fórmulas (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 metales alcalinos y alcalinotérreos, por ejemplo las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo las sales de benzatina, N-metil-D-glucamina, hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

25 Los términos sal de adición de ácido o base también comprenden los hidratos y las formas de adición de disolvente que pueden formar los compuestos de fórmulas (I). Ejemplos de tales formas son por ejemplo hidratos, alcoholatos y similares.

30 El término formas estereoquímicamente isoméricas de compuestos de fórmulas (I) tal como se usó anteriormente en el presente documento, define todos los compuestos posibles 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 fórmulas (I). A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de un compuesto abarca la mezcla de todas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas que pueden 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 fórmulas (I) tanto en forma pura como en mezcla entre sí pretenden abarcarse dentro del alcance de la presente invención.

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

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

50 El inhibidor del proteasoma para su uso según la invención es bortezomib. Bortezomib está disponible comercialmente de Millennium con el nombre comercial Velcade y puede prepararse por ejemplo tal como se describió en los documentos EP788360, EP1312609, EP1627880, US 6066730 y US 6083903 o mediante procedimientos análogos a los mismos.

55 La presente invención también se refiere a combinaciones según la invención para su uso en terapia médica por ejemplo para inhibir el crecimiento de células tumorales.

La presente invención también se refiere al uso de combinaciones según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células tumorales.

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

65 Esta invención proporciona además una combinación para su uso en la inhibición del crecimiento anómalo de células, incluyendo células transformadas, administrando una cantidad eficaz de una combinación según la invención. Crecimiento anómalo de células se refiere a crecimiento celular independiente de mecanismos reguladores normales (por ejemplo pérdida de inhibición por 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 migración, invasión y supervivencia de células tumorales o neovascularización de tumores.

5 Esta invención también proporciona una combinación para su uso en la inhibición del crecimiento tumoral administrando una cantidad eficaz de una combinación según la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesita de tal tratamiento. En particular, esta invención proporciona una combinación para su uso en la inhibición del crecimiento de tumores mediante la administración de una cantidad eficaz de la combinación según la presente invención. La presente invención es particularmente aplicable al tratamiento de cáncer pancreático, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia monocítica aguda, linfoma, leucemia de células B crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma no Hodgkin, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon. Los ejemplos de otros tumores que pueden inhibirse incluyen, pero no se limitan a, cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimatoso (por ejemplo fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo queratoacantomas), carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico.

20 Esta invención también proporciona una combinación para su uso en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia monocítica aguda, linfoma, leucemia de células B crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica, linfoma de Burkitt y mieloma múltiple administrando una cantidad eficaz de un inhibidor de histona desacetilasa de fórmula (I), a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesita tal tratamiento.

Esta invención también proporciona una combinación para su uso en el tratamiento de tumores resistentes a fármacos, tales como pero sin limitarse a tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo leucemia linfoblástica aguda resistente a fármacos, leucemia mielógena aguda resistente a fármacos, leucemia promielocítica aguda resistente a fármacos, leucemia mieloide aguda resistente a fármacos, leucemia monocítica aguda resistente a fármacos, linfoma resistente a fármacos, leucemia de células B crónica resistente a fármacos, leucemia mieloide crónica resistente a fármacos, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica resistente a fármacos, linfoma de Burkitt resistente a fármacos y mieloma múltiple resistente a fármacos administrando una cantidad eficaz de un inhibidor de histona desacetilasa de fórmula (Ia) o en combinación con bortezomib, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesita tal tratamiento. La presente invención es particularmente aplicable al tratamiento de mieloma múltiple resistente a fármacos, más particularmente a mieloma múltiple resistente a inhibidores del proteasoma, incluso más particularmente al tratamiento de mieloma múltiple resistente a bortezomib.

40 El término "mieloma múltiple resistente a fármacos" incluye pero no se limita a mieloma múltiple resistente a uno o más fármacos seleccionados del grupo de talidomida, dexametasona, revlimid, doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, pamidronato, melfalán, defibrotida, prednisona, darinaparsina, belinostat, vorinostat, PD 0332991, LBH589, LAQ824, MGCD0103, HuLuc63, AZD 6244, Pazopanib, P276-00, plitidepsina, bendamustina, tanespimicina, enzastaurina, perifosina, ABT-737 o RAD001. El término "mieloma múltiple resistente a fármacos" también incluye mieloma múltiple con recidiva o que no responde al tratamiento.

Con el término "resistente a fármaco" quiere decirse un estado que demuestra resistencia intrínseca o resistencia adquirida. Con "resistencia intrínseca" quiere decirse el perfil de expresión característico en células cancerosas de genes clave en rutas relevantes, incluyendo pero sin limitarse a apoptosis, progresión celular y reparación del ADN, que contribuye a la capacidad de crecimiento más rápida de células cancerosas en comparación con sus homólogos normales. Con "resistencia adquirida" quiere decirse un fenómeno multifactorial que se produce en la formación y la progresión de tumores que puede influir en la sensibilidad de células cancerosas a un fármaco. La resistencia adquirida puede deberse a varios mecanismos tales como pero sin limitarse a; alteraciones en fármaco-dianas, disminución de la acumulación de fármaco, alteración de la distribución de fármaco intracelular, interacción fármaco-diana reducida, aumento de la respuesta de detoxificación, desregulación del ciclo celular, aumento de la reparación del ADN dañado y respuesta apoptótica reducida. Varios de dichos mecanismos pueden producirse simultáneamente y/o pueden interaccionar entre sí. Su activación y/o inactivación puede deberse a acontecimientos genéticos o epigenéticos o a la presencia de proteínas oncovirales. Puede producirse resistencia adquirida a fármacos individuales pero también puede producirse más ampliamente a muchos fármacos diferentes con estructuras químicas diferentes y mecanismos de acción diferentes. Esta forma de resistencia se denomina resistencia a múltiples fármacos.

La combinación según la invención puede usarse para otros fines terapéuticos, por ejemplo:

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

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

5 c) inhibir la proliferación de células musculares lisas incluyendo trastornos proliferativos vasculares, aterosclerosis y reestenosis;

10 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 trasplante, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, esclerodermia, exantema, eczema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis cística y bronquitis crónica;

15 e) tratar endometriosis, miomas uterinos, hemorragia uterina disfuncional e hiperplasia endometrial;

f) tratar vascularización ocular incluyendo vasculopatía que afecta vasos retinianos y de la coroides;

g) tratar una disfunción cardíaca;

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

i) tratar disfunción renal;

25 j) suprimir trastornos endocrinos;

k) inhibir la disfunción de la gluconeogénesis;

30 l) tratar una neuropatología, por ejemplo enfermedad de Parkinson o una neuropatología que da como resultado 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;

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

o) tratar atrofia muscular espinal;

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

40 q) potenciar la terapia génica;

r) inhibir la adipogénesis;

45 s) tratar parasitosis tal como malaria.

Por tanto, la presente invención da a conocer las combinaciones descritas anteriormente para su uso como medicamento así como el uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (1a) con actividad combinada sobre HDAC de clase I y clase IIb, en combinación con bortezomib, para la fabricación de un medicamento para tratar uno o más de los estados mencionados anteriormente.

50 Por tanto, la presente invención da a conocer el uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (1a) con actividad combinada sobre HDAC de clase I y clase IIb, en combinación con bortezomib para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia monocítica aguda, linfoma, leucemia de células B crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica, linfoma de Burkitt y mieloma múltiple.

60 La presente invención también da a conocer el uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (1a) con actividad combinada sobre HDAC de clase I y clase IIb, en combinación con bortezomib para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores resistentes a fármacos, tales como pero sin limitarse a, tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, por ejemplo leucemia linfoblástica aguda resistente a fármacos, leucemia mielógena aguda resistente a fármacos, leucemia promielocítica aguda resistente a fármacos, leucemia mieloide aguda resistente a fármacos, leucemia monocítica aguda resistente a fármacos, linfoma resistente a fármacos, leucemia de células B crónica resistente a fármacos, leucemia mieloide crónica resistente a fármacos, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica resistente a fármacos, linfoma de Burkitt resistente a fármacos y mieloma múltiple resistente a fármacos.

65

La presente invención da a conocer adicionalmente el uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (Ia) con actividad combinada sobre HDAC de clase I y clase IIb, en combinación con bortezomib para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de mieloma múltiple resistente a fármacos, más en particular de mieloma múltiple resistente a inhibidores del proteasoma, incluso más en particular de mieloma múltiple resistente a bortezomib.

5 Pueden administrarse bortezomib y el inhibidor de HDAC de fórmula (Ia) simultáneamente (por ejemplo en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En este último caso, los dos compuestos se administrarán en el plazo de un periodo y en una cantidad y manera que es suficiente para garantizar que se logra un efecto ventajoso o sinérgico.

10 La presente invención se refiere adicionalmente a un producto que contiene como primer principio activo un inhibidor de HDAC de fórmula (Ia) (I) y bortezomib, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

15 Los expertos en la técnica podrían 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 de un compuesto de fórmula (I) y de un inhibidor del proteasoma 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 a intervalos apropiados durante todo el día. 20 Dichas subdosis pueden formularse como formas farmacéuticas unitarias que contienen, por ejemplo, de 0,5 a 500 mg, y en particular de 10 mg a 500 mg de principio activo por forma farmacéutica unitaria.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones según la invención 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.

La presente invención también se refiere por tanto a una composición farmacéutica que comprende bortezomib y un inhibidor de HDAC de fórmula (Ia) junto con uno o más portadores farmacéuticos. Para preparar composiciones farmacéuticas para su uso según la invención, se combina una cantidad eficaz de un compuesto particular, en forma de sal de adición de ácido o base, como principio activo en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, portador que puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están de manera deseable en forma farmacéutica unitaria adecuada, preferiblemente, para administración por vía oral, por vía rectal, por vía percutánea o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma farmacéutica 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 portadores 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 cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el portador comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros componentes, para ayudar a la solubilidad por ejemplo. Pueden prepararse, por ejemplo, disoluciones inyectables en las que el portador 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 agentes de suspensión, portadores líquidos apropiados y similares. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente de potenciación de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en menores proporciones, aditivos que no provocan un efecto perjudicial significativo en 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 diversos modos, por ejemplo, como un parche transdérmico, como una pipeta para la aplicación en la piel, como una pomada.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación 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 portador farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, suspensiones o disoluciones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de los mismos.

Puede ser apropiado administrar la dosis requerida de cada componente de la combinación como dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados durante todo el ciclo de tratamiento. Las subdosis pueden formularse como formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, conteniendo en cada caso independientemente de 0,01 a 500 mg, por ejemplo de 0,1 a 200 mg y en particular de 1 a 100 mg de cada principio activo por forma farmacéutica unitaria.

El término “la inducción de acetilación de histonas u otras proteínas” significa la inducción del estado de acetilación de sustratos de HDAC tales como pero sin limitarse a histonas, por ejemplo histona 3, histona 4 y similares; tubulina, por ejemplo alfa-tubulina y similares; proteínas de choque térmico, por ejemplo Hsp 90 y similares.

5 El término “la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación” significa efectos secundarios tales como pero sin limitarse a inducción de Hsp70, inducción de p21 y similares.

10 Se describe también un método para la caracterización de un inhibidor de HDAC de fórmula (I) o bien solo o bien en combinación con un inhibidor del proteasoma que comprende la determinación en una muestra de la cantidad de inducción de acetilación de histonas u otras proteínas, o de la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación. Más en particular, la invención se refiere a un método para la caracterización de un inhibidor de HDAC de fórmula (I) o bien solo o bien en combinación con un inhibidor del proteasoma, que comprende la determinación en una muestra de la cantidad de

15 a) inducción de acetilación de histona 3, inducción de acetilación de histona 4 o inducción de p21 y

b) inducción de acetilación de alfa-tubulina, inducción de acetilación de Hsp 90 o inducción de Hsp 70.

20 Lo más particularmente, la invención se refiere al método anterior, en el que la concentración necesaria para obtener inducción en a) está en el mismo intervalo que la concentración para obtener inducción en b).

25 La determinación en una muestra de la cantidad de inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o de la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación puede abarcar la identificación de pacientes que responden a un tratamiento y por tanto puede tener un efecto beneficioso para el tratamiento de cáncer en seres humanos.

30 La determinación en una muestra de la cantidad de inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o de la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación puede abarcar la monitorización de la eficacia de un tratamiento en pacientes y por tanto puede tener un efecto beneficioso para el tratamiento de cáncer en seres humanos.

35 La determinación en una muestra de la cantidad de inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o de la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación puede abarcar la predicción de las respuestas terapéuticas a un tratamiento y por tanto puede tener un efecto beneficioso para el tratamiento de cáncer en seres humanos.

40 Por tanto, se describe también el uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (Ia) con actividad combinada sobre HDAC de clase I y clase IIb, en combinación con bortezomib, en el que la inducción de hiperacetilación de histonas u otras proteínas o la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación tiene un efecto beneficioso para el tratamiento de cáncer en seres humanos.

45 La muestra puede derivarse de células que se han tratado con dicha combinación. La muestra también puede derivarse de tejido afectado por un trastorno y/o de individuos tratados con una combinación de bortezomib y un inhibidor de HDAC de fórmula (Ia).

Las células pueden ser células de cultivo que se han puesto en contacto con dicha combinación. Puede añadirse dicha combinación al medio de crecimiento de las células.

50 Las células también pueden derivarse de un tejido y/o de un individuo que se trató con dicha combinación.

55 Preferiblemente, el método de caracterización comprende solamente etapas que se llevan a cabo *in vitro*. Por tanto, según esta realización, la etapa de obtener el material de tejido del cuerpo humano o animal no está abarcada por la presente invención.

60 Las células se procesan habitualmente para que estén en un estado que es adecuado para el método empleado, para determinar la inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación. El procesamiento puede incluir homogeneización, extracción, fijación, lavado y/o permeabilización. El modo de procesamiento depende en gran parte del método usado para la determinación de la inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación. La muestra puede derivarse de una biopsia del paciente. La biopsia puede tratarse adicionalmente para producir una muestra que está en un estado adecuado para el método usado para determinar la inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación.

65 La cantidad de acetilación de proteínas o la cantidad de proteína inducida puede determinarse mediante el uso de

un anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" designa una inmunoglobulina o un derivado de la misma que tiene la misma especificidad de unión. El anticuerpo usado según la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo derivado de o comprendido en un antisuero policlonal. El término "anticuerpo" significa adicionalmente derivados tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o scFv. El anticuerpo o el derivado del mismo puede ser de origen natural o puede producirse de manera (semi)sintética.

Puede usarse inmunotransferencia de tipo Western que se conoce generalmente en la técnica. El tejido o material celular puede homogeneizarse y tratarse con agentes de desnaturalización y/o reducción para obtener las muestras. La muestra puede cargarse sobre un gel de poliacrilamida para separar las proteínas, seguido por transferencia a una membrana o colocarse directamente sobre una fase sólida. Se pone en contacto entonces el anticuerpo con la muestra. Tras una o más etapas de lavado, se detecta el anticuerpo unido usando técnicas que se conocen en la técnica.

Puede usarse inmunohistoquímica tras la fijación y permeabilización del material de tejido, por ejemplo cortes de tumores sólidos, se incuban entonces el anticuerpo con la muestra, y tras una o más etapas de lavado se detecta el anticuerpo unido.

La cantidad de la inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación puede determinarse mediante ELISA. Pueden preverse una variedad de formatos del ELISA. En un formato, el anticuerpo se inmoviliza sobre una fase sólida tal como una placa de microtitulación, seguido por bloqueo de sitios de unión no específica e incubación con la muestra. En otro formato, la muestra se pone en contacto en primer lugar con la fase sólida para inmovilizar las proteínas acetiladas y/o inducidas contenidas en la muestra. Tras bloquear y opcionalmente lavar, el anticuerpo se pone en contacto con la muestra inmovilizada.

La cantidad de la inducción de acetilación de histonas u otras proteínas o la inducción de proteínas reguladas funcionalmente mediante dicha acetilación puede determinarse mediante citometría de flujo. Se fijan células, por ejemplo células de cultivo celular o células sanguíneas o células de médula ósea, y se permeabilizan para permitir que el anticuerpo alcance las proteínas acetiladas y/o inducidas. Tras etapas de bloqueo y lavado opcionales, el anticuerpo se pone en contacto con las células. Se realiza entonces citometría de flujo según procedimientos conocidos en la técnica con el fin de determinar células que tienen anticuerpo unido a las proteínas acetiladas y/o inducidas.

Para determinar si un inhibidor de HDAC o una combinación de un inhibidor de proteasoma y un inhibidor de HDAC de fórmula (I) tiene su actividad, puede determinarse la cantidad de acetilación de una proteína o inducción de una proteína en una muestra de referencia, derivándose la muestra de referencia de células que no se han tratado con dicho inhibidor de HDAC o dicha combinación. La determinación de la cantidad de acetilación de proteínas y/o la cantidad de proteína inducida en la muestra y la muestra de referencia puede realizarse en paralelo. En el caso de células de cultivo celular, se proporcionan dos composiciones celulares, una de las cuales se trata con dicho inhibidor de HDAC o dicha combinación mientras que la otra se deja sin tratar. Posteriormente, ambas composiciones se procesan adicionalmente y se determinan las cantidades respectivas de acetilación de proteínas y/o la cantidad de proteína inducida. Alternativamente, para determinar si un inhibidor de HDAC o una combinación de un inhibidor del proteasoma y un inhibidor de HDAC de fórmula (I) tiene su actividad, puede determinarse la inhibición de la proliferación celular.

En el caso de pacientes, la muestra se deriva de un paciente que se ha tratado con el inhibidor de HDAC de fórmula (I) o la combinación de un inhibidor del proteasoma y un inhibidor de HDAC de fórmula (I). La muestra de referencia se deriva de otro paciente que padece el mismo trastorno que no se ha tratado con dicho inhibidor de HDAC o dicha combinación o de un individuo sano. El tejido del que se deriva la muestra de referencia corresponde al tejido del que se deriva la muestra. Por ejemplo, si la muestra se deriva de tejido tumoral de un paciente con cáncer de mama, la muestra de referencia también se deriva de tejido tumoral de un paciente con cáncer de mama o de tejido de mama de un individuo sano. También puede preverse que la muestra y la muestra de referencia se deriven del mismo individuo. En este caso, el tejido, del que se deriva la muestra de referencia, se obtuvo del individuo antes de o después del tratamiento del individuo con dicho inhibidor de HDAC o dicha combinación. Preferiblemente, el tejido se obtiene antes del tratamiento para excluir posibles efectos posteriores del tratamiento con inhibidor tras la interrupción del tratamiento.

60 **Parte experimental**

A. Ejemplo farmacológico

Para la actividad celular de los compuestos de fórmula (I) que se determinó en células tumorales A2780 usando un ensayo colorimétrico para determinar la toxicidad o supervivencia celular (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983), se hace referencia a la parte experimental del documento WO 2006/010750.

5 Se han vinculado los efectos antiproliferativos de inhibidores de HDAC a la inhibición de HDAC de clase 1, que consiste en los miembros de familia de HDAC 1-3 y 8. La actividad de JNJ 26481585 sobre HDAC 1 inmunoprecipitada a partir de células A2780 y su potencia en comparación con R306465, SAHA, LBH-589 y LAQ-824 puede encontrarse en el ejemplo A.1. La actividad de JNJ 26481585 sobre la enzima recombinante humana HDAC 8 y su potencia en comparación con R306465, SAHA, LBH-589 y LAQ-824 puede encontrarse en el ejemplo A.2.

10 Se investigó adicionalmente si R306465 modula el estado de acetilación de los sustratos de HDAC 1 histona 3 (H3) e histona 4 (H4). Se investigó también la inducción del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p21^{waf1, cipl} en células de carcinoma de ovario A2780. P21^{waf1, cipl} se reprime como consecuencia de la acetilación de histonas y desempeña un papel clave en la inducción de detención del ciclo celular en respuesta a inhibidores de HDAC (véase el ejemplo A.3.).

15 Con el fin de evaluar la inhibición de HDAC 6 y la potencia relativa de los compuestos para HDAC 1 frente a HDAC 6, se monitorizó la acetilación de su sustrato tubulina y la inducción de Hsp 70, que es la consecuencia de la acetilación de Hsp 90 (véase el ejemplo A.4.).

20 Ejemplo A: Especificidad de clase I y efectos de acetilación de los compuestos de fórmula (I)

Ejemplo A.1: inhibición de la enzima HDAC 1 inmunoprecipitada a partir de células A2780

25 Para ensayos de actividad de HDAC1, se inmunoprecipitó HDAC1 a partir de lisados de células A2780 y se incubó con una curva de concentración del inhibidor de HDAC indicado y con un fragmento marcado con [³H]acetilo de péptido H4 (50.000 cpm) [biotina-(6-aminohexanoico)Gly-Ala-(acetil[³H]Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂)] (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Se evaluó la actividad de HDAC midiendo la liberación de grupos acetilo libres. Se expresan los resultados como valores de CI₅₀ promedio ± DE para tres experimentos independientes.

	Inhibición de HDAC 1, CI ₅₀ en nM
JNJ 26481585	0,16 ± 0,02
R306465	3,31 ± 0,78
SAHA	73 ± 26
LAQ-824	0,29 ± 0,05
LBH-589	0,23 ± 0,06

30 Ejemplo A.2: Inhibición de la enzima recombinante humana HDAC 8

35 Para la inhibición de HDAC 8 recombinante humana, se usó el kit Discovery de fármaco/ensayo de actividad colorimétrica/fluorimétrica de HDAC 8 (Biomol; número de cat. AK-508). Se expresan los resultados como valores de CI₅₀ promedio (nM) ± DE para tres experimentos independientes. Se realizaron ensayos por duplicado y se calculó el error estándar de la CI₅₀ usando Graphpad Prism (software Graphpad).

	Inhibición de HDAC 8, CI ₅₀ en nM
JNJ 26481585	34 ± 41
R306465	23 ± 17
SAHA	370 ± 314
LAQ-824	37 ± 23
LBH-589	283 ± 29

Ejemplo A.3: Acetilación de sustratos de HDAC 1 celulares e inducción de p21^{waf1, cipl}

40 Se incubaron células de carcinoma de ovario A2780 humanas con 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM de los compuestos durante 24 h.

45 Se prepararon lisados celulares totales y se analizaron mediante SDS-PAGE. Se detectaron los niveles de histonas H3 y H4 acetiladas, el nivel total de proteínas H3 y los niveles de proteína p21^{waf1, cipl} usando anticuerpos policlonales de conejo y monoclonales de ratón, seguido por detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL).

Se detectaron los niveles de H3 y H4 acetiladas con anticuerpos de Upstate Biotechnology (número de cat. 06-299 y 06-866), se detectó el nivel total de proteínas H3 con anticuerpos de Abcam (número de cat. ab1791) y se detectó el nivel de proteína p21^{waf1, cipl} con anticuerpos de Transduction Laboratories (número de cat. C24420). Se incubaron diluciones apropiadas de anticuerpos durante o bien 1-2 h a temperatura ambiente o bien durante la noche a 4°C.

- 5 Con el fin de controlar que la carga fuese igual, se separaron las inmunotransferencias y volvieron a estudiarse con sonda con IgM monoclonal de ratón anti-actina (Ab-1, Oncogene Research Products). Con el fin de controlar la eficacia de extracción de proteínas nucleares, se separaron las inmunotransferencias y volvieron a estudiarse con sonda con anticuerpo anti-lamina B1 (Zymed; número de cat. 33.2000). Se visualizaron entonces los complejos proteína-anticuerpo mediante quimioluminiscencia (Pierce Chemical Co) o fluorescencia (Odyssey) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron los experimentos tres veces.

	Concentración (nM) cuando se observa inducción de acetilación de histona H3 y H4 e inducción de p21 ^{waf1, cipl}
JNJ 26481585	10
R306465	100
SAHA	3000
LAQ-824	10
LBH-589	10

Ejemplo A.4. Acetilación de tubulina y la inducción de Hsp 70

- 15 Se incubaron células de carcinoma de ovario A2780 humanas con 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM de los compuestos durante 24 h.

Se prepararon lisados celulares totales y se analizaron mediante SDS-PAGE. Se detectaron los niveles de tubulina total y acetilada usando anticuerpos de Sigma: clones DM1A (número de cat. T9026) y 6-111B (número de cat. T6793). Se detectó la proteína Hsp 70 con un anticuerpo de Stressgen (número de cat. SPA-810), seguido por detección de ECL. Se incubaron diluciones apropiadas de anticuerpos durante o bien 1-2 h a temperatura ambiente o bien durante la noche a 4°C. Con el fin de controlar que la carga fuese igual, se separaron las inmunotransferencias y volvieron a estudiarse con sonda con IgM monoclonal de ratón anti-actina (Ab-1, Oncogene Research Products). Con el fin de controlar la eficacia de extracción de proteínas nucleares, se separaron las inmunotransferencias y volvieron a estudiarse con sonda con anticuerpo anti-lamina B1 (Zymed; número de cat. 33.2000). Se visualizaron entonces los complejos proteína-anticuerpo mediante quimioluminiscencia (Pierce Chemical Co) o fluorescencia (Odyssey) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron los experimentos tres veces.

	Concentración (nM) cuando se observa el inicio de la inducción de acetilación de tubulina e inducción de Hsp 70
JNJ 26481585	30
R306465	1000
SAHA	100
LAQ-824	30
LBH-589	30

- 30 Ejemplo B: Inhibición de la proliferación de células tumorales hematológicas humanas

Se externalizó la evaluación de la actividad antiproliferativa de JNJ 26481585 en un panel de líneas de células tumorales hematológicas humanas en Oncodesign (Dijon, Francia). Se hicieron crecer células tumorales como suspensión celular en el medio de cultivo apropiado correspondiente a 37°C en un incubador con CO₂ al 5% humidificado. Se sembraron células tumorales libres de micoplasmas en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 24 h en medio de cultivo que contenía FCS al 10%. Se expusieron entonces las células tumorales a un vehículo (control) o concentraciones crecientes de JNJ 26481585 (5 concentraciones diferentes*), bortezomib (5 concentraciones diferentes*) o una combinación de ambos fármacos a diversas razones. Se incubaron entonces las células durante 72 h adicionales. Se reveló la actividad citotóxica del/de los compuesto(s) mediante ensayo de MTS convencional mediante medición de la absorbencia a 490 nm. Se calcularon las interacciones del compuesto (sinergia, aditividad o antagonismo) mediante análisis de efectos farmacológicos múltiples y se realizó mediante el principio de ecuación de la mediana según la metodología descrita por Chou & Talalay [CHOU *et al.* (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55; CHOU *et al.* (1991) en *Encyclopaedia of human Biology*. Academic Press. 2: 371-379; CHOU *et al.* (1991) en *Synergism and antagonism in chemotherapy*.

Academic Press: 61-102; CHOU *et al.* (1994) J. Natl. Cancer Inst. 86: 1517-1524].

5 *: basándose en la determinación previa de la actividad antiproliferativa de cada fármaco usado como agente único, se eligieron concentraciones que no excedían el 50% de inhibición en cada una de las líneas celulares seleccionadas.

Ejemplo B.1.: Inhibición de la proliferación de células tumorales hematológicas humanas mediante JNJ 26481585.

10 Tabla F.1: Se expresan los resultados como el valor de CI_{40} medio (es decir, la concentración, expresada en nM, requerida para alcanzar el 40% de inhibición de la proliferación celular) \pm DE, determinado a partir de 3 experimentos fiables independientes.

Línea celular	Tipo	Media	DE
CCRF-CEM	Leucemia linfoblástica aguda	11,93	7,18
Clon de Jurkat E6-1	Leucemia linfoblástica aguda	9,22	1,78
KG-1	Leucemia mielógena aguda	13,39	10,48
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	42,96	56,25
SUP-B15	Leucemia linfoblástica aguda	1,13	
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	24,28	10,72
OCI-AML2	Leucemia mieloide aguda	19,56	13,93
THP-1	Leucemia monocítica aguda	50,65	22,84
EHEB	Leucemia de células B crónica	165,81	128,15
BV-173	Leucemia de células B crónica	4,54	4,28
K-562	Leucemia mieloide crónica	15,91	8,29
KCL-22	Leucemia mieloide crónica	7,71	5,14
LAMA-84	Leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica	30,40	19,93
U-937	Linfoma	23,67	10,14
Daudi	Linfoma de Burkitt	9,08	1,27
Namalwa	Linfoma de Burkitt	4,65	4,32
Raji	Linfoma de Burkitt	26,34	16,11
Ramos	Linfoma de Burkitt	4,66	2,82
ARH-77	Mieloma	40,42	24,32
RPMI 8226	Mieloma	6,41	5,44

15 Ejemplo B.2.: Inhibición de la proliferación de células tumorales hematológicas humanas mediante bortezomib.

Tabla F.2: Se expresan los resultados como el valor de CI_{40} medio (es decir, la concentración, expresada en nM, requerida para alcanzar el 40% de inhibición de la proliferación celular) \pm DE, determinado a partir de 3 experimentos fiables independientes.

Línea celular	Tipo	Media	DE
CCRF-CEM	Leucemia linfoblástica aguda	4,40	0,84
Clon de Jurkat E6-1	Leucemia linfoblástica aguda	5,63	2,68
KG-1	Leucemia mielógena aguda	3,36	0,83
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	12,14	12,91
SUP-B15	Leucemia linfoblástica aguda	2,40	
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	13,38	1,99
OCI-AML2	Leucemia mieloide aguda	11,64	11,61
THP-1	Leucemia monocítica aguda	5,83	0,94
EHEB	Leucemia de células B crónica	6,02	0,34
BV-173	Leucemia de células B crónica	2,77	0,20

K-562	Leucemia mieloide crónica	12,83	4,11
KCL-22	Leucemia mieloide crónica	1,74	1,56
LAMA-84	Leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica	2,61	0,46
U-937	Linfoma	5,68	1,07
Daudi	Linfoma de Burkitt	2,68	0,54
Namalwa	Linfoma de Burkitt	4,48	1,00
Raji	Linfoma de Burkitt	5,20	0,69
Ramos	Linfoma de Burkitt	1,83	0,10
ARH-77	Mieloma	7,21	2,22
RPMI 8226	Mieloma	4,23	0,99

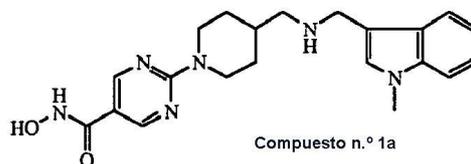
Ejemplo B.3: Inhibición de la proliferación de células tumorales hematológicas humanas mediante JNJ 26481585 en combinación con bortezomib.

- 5 Tabla 3: Se expresan los resultados como el índice de combinación medio ($IC \pm DE$) de la mediana de valores de IC en cada estudio individual (3 experimentos fiables independientes) y se calculan a partir de cada razón de combinación individual. IC inferior a 0,9 indica "Sinergia" (gris) e IC entre 0,91 y 1,09 indica "aditividad" (blanco).

	Media	DE
CCRF-CEM	0,75	0,10
Jurkat	0,80	0,15
KG-1	0,96	0,26
MOLT-4	0,85	0,17
SUP-B15	0,81	0,03
HL-60	0,81	0,24
OCI-AML2	0,71	0,12
THP-1	0,94	0,25
EHEB	0,62	0,11
BV-173	0,76	0,05
K-562	0,75	0,25
KCL-22	0,96	0,26
LAMA-84	1,05	0,27
U-937	0,67	0,06
Daudi	0,87	0,18
Namalwa	0,58	0,08
Raji	0,80	0,08
Ramos	0,89	0,36
ARH-77	0,90	0,34
RPMI 8226	0,76	0,06

REIVINDICACIONES

5 1. Combinación de un inhibidor del proteasoma, en la que dicho inhibidor del proteasoma es bortezomib, y un inhibidor de histona desacetilasa, en la que dicho inhibidor de histona desacetilasa es el compuesto n.º 1a (JNJ26481585)



10 las sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo.

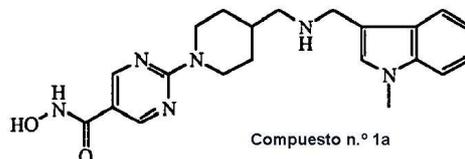
2. Combinación según la reivindicación 1, en forma de una composición farmacéutica que comprende bortezomib y compuesto n.º 1a junto con uno o más portadores farmacéuticos.

15 3. Combinación según la reivindicación 2, para su uso simultáneo, separado o secuencial.

4. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en terapia médica.

20 5. Uso de una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células tumorales.

25 6. Uso de un inhibidor de histona desacetilasa en combinación con un inhibidor del proteasoma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia monocítica aguda, linfoma, leucemia de células B crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica, linfoma de Burkitt y mieloma múltiple en el que dicho inhibidor de histona desacetilasa es el compuesto n.º 1a



30 las sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo,

y en el que dicho inhibidor del proteasoma es bortezomib.

35 7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda resistente a fármacos, leucemia mielógena aguda resistente a fármacos, leucemia promielocítica aguda resistente a fármacos, leucemia mieloide aguda resistente a fármacos, leucemia monocítica aguda resistente a fármacos, linfoma resistente a fármacos, leucemia de células B crónica resistente a fármacos, leucemia mieloide crónica resistente a fármacos, leucemia mieloide crónica en crisis hemoblástica resistente a fármacos, linfoma de Burkitt resistente a fármacos y mieloma múltiple resistente a fármacos.

40

8. Uso según las reivindicaciones 6 y 7, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de mieloma múltiple resistente a bortezomib.