

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 478 827**

(51) Int. Cl.:

**A61P 11/10** (2006.01)  
**A61K 31/16** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2009 E 09783251 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2344253**

---

(54) Título: **Uso de inhibidores de histona desacetilasa para el tratamiento de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos**

(30) Prioridad:

**29.09.2008 IT MI20081720  
13.11.2008 US 193283 P**

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

**23.07.2014**

(73) Titular/es:

**ITALFARMACO SPA (100.0%)  
Viale Fulvio Testi 330  
20126 Milano, IT**

(72) Inventor/es:

**OLDONI, TIZIANO;  
MASCAGNI, PAOLO;  
RAMBALDI, ALESSANDRO y  
BARBUI, TIZIANO**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 478 827 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de histona desacetilasa para el tratamiento de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos

5 Los síndromes mieloproliferativos son trastornos de tipo neoplásico que tienen en común el hecho de que se originan de células madre pluripotentes de médula ósea, es decir, células que, al dividirse, pueden formar varios tipos de células sanguíneas.

10 Los síndromes mieloproliferativos se separan en cuatro tipos: leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis idiopática (MI).

15 La base molecular para la leucemia mieloide crónica se ha conocido durante algún tiempo y consiste en la formación del cromosoma Filadelfia, o la translocación 9;22, y la generación del gen fusión *BCR-ABL*; en estos casos, llamados síndromes mieloproliferativos Filadelfia positivos, el uso de un inhibidor específico de la tirosina quinasa ABL (tal como imatinib o desatinib) hace posible intervenir selectivamente en las células responsables para la patología, lo que limita las posibles consecuencias a una citotoxicidad no específica en perjuicio de las células sanas.

20 Para las otras tres patologías, agrupadas bajo el nombre de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos, la base molecular se ha identificado más recientemente [véase, por ejemplo: Robert Kralovics *et al.* en *The New England Journal of Medicine* 352, 1779-1790 (2005); Chloé James *et al.* en *Nature* 434, 1144-1148 (2005)] y parece relacionarse con una mutación génica que afecta a la tirosina quinasa JAK2.

25 Para estos síndromes, la terapia actual también proporciona el uso de fármacos citostáticos que tienen una acción no específica, principalmente hidroxiurea, que presenta un riesgo de introducir, después de un cierto periodo de tratamiento, el desarrollo de patologías hacia estados mielodisplásicos y hacia formas de leucemia.

En Europa, la incidencia de los síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos es aproximadamente de 5 casos por cada 100.000 habitantes por año.

30 Por tanto, está claro que es necesario identificar nuevos fármacos que, incluso para síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos (PV, TE y MI), pueda actuar de una manera más selectiva y a dosis no tóxicas.

35 Las histonas desacetilasas (HDAC) son enzimas capaces de eliminar el grupo acetilo unido a los residuos de lisina en la parte N-terminal de las histonas o en otras proteínas.

40 Las HDAC se pueden subdividir en cuatro clases, en base a sus homologías estructurales. Las HDAC de clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8) son similares a la proteína de levadura RPD3 y se localizan en el núcleo celular. Las HDAC de clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10) son similares a la proteína de levadura HDA1 y se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma. Las HDAC de clase III son una forma estructuralmente distinta de enzimas dependientes de NAD correlacionadas con la proteína de levadura SIR2. La clase IV (HDAC 11) consiste por el momento de una única enzima que tiene características estructurales particulares. Las HDAC de clases I, II y IV son enzimas de zinc y pueden ser inhibidas por varias clases de moléculas: derivados de ácido hidroxámico, tetrapéptidos cílicos, ácidos grasos de cadena corta, aminobenzamidas, derivados de cetonas electrofílicas, y similares. Las HDAC de clase III no son inhibidas por ácidos hidroxámicos, y sus inhibidores tienen características estructurales diferentes de los de las otras clases.

45 La expresión "inhibidor de histona desacetilasa" en relación a la presente invención se debe entender como que significa cualquier molécula de origen natural, recombinante o sintético capaz de inhibir la actividad de al menos una de las enzimas clasificadas como histona desacetilasas de clase I, clase II, o clase IV.

50 Los inhibidores de histona desacetilasas son una clase de moléculas provistas con actividad antineoplásica y antiinflamatoria.

55 En células tumorales, los inhibidores de histona desacetilasas inhiben la proliferación celular e inducen muerte y diferenciación celular [Gaofeng Bi y Guosheng Jiang en *Cellular & Molecular Immunology* 3, 285-290 (2006)].

60 Los inhibidores de histona desacetilasas también son capaces de modular la producción de citoquinas y otros factores proinflamatorios en la parte de células inmunocompetentes y han demostrado, *in vivo*, propiedades antiinflamatorias [Frédéric Blanchard y Céline Chipoy en *Drug Discovery Today* 10, 197-204 (2005); IM Adcock en *British Journal of Pharmacology* 150, 829-831(2007)].

65 Numerosos estudios clínicos, tanto en patologías tumorales como en patologías inflamatorias, están actualmente en marcha, y están en varias fases de avance, usando varios inhibidores [Marielle Paris *et al.* en *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 1505-1529 (2008)].

Recientemente, se ha aprobado un inhibidor de histona desacetilasa (Zolinza, vorinostat) para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T.

Algunos de los inhibidores de histona desacetilasa actualmente en fase de estudio clínico se describen, con otros análogos de los mismos, en las siguientes patentes: WO 2004/092115, WO 2005/019174, WO 2003/076422, WO 1997/043251, WO 2006/010750, WO 2006/003068, WO 2002/030879, WO 2002/022577, WO 1993/007148, WO 2008/033747, WO 2004/069823, EP 0847992 y WO 2004/071400.

El cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio, que se describe en el documento WO 97/43251 (forma anhídrida) y en el documento WO 2004/065355 (forma cristalina monohidrato), es un inhibidor de HDAC con buenas actividades antiinflamatorias; tal principio activo también se conoce como ITF2357 y Givinostat.

En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas cultivadas estimuladas con lipopolisacárido (LPS), ITF2357 redujo en el 50% la liberación de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) de 10 a 22 nM, la liberación de interleuquina (IL)-1 $\alpha$  intracelular a 12 nM, la secreción de IL-1 $\beta$  de 12,5 a 25 nM, y la producción e interferón- $\gamma$  (IFNy) a 25 nM. La administración oral de 1,0 a 10 mg/kg de ITF2357 a ratones redujo TNF $\alpha$  e IFNy en suero inducidos por LPS en más del 50% [Flavio Leoni et al. en *Molecular Medicine* 11, 1-15 (2005)].

Recientemente se ha descrito que ITF2357, a concentraciones submicromolares, es capaz de inhibir la actividad clonogénica de células madre obtenidas de pacientes que padecen PV o TE [V. Guerini et al. *Leukemia* 22, 740-747 (2008)]. Sin embargo, las concentraciones a las que se obtiene la inhibición de la actividad clonogénica son mucho menores que las necesarias para obtener modificación de los marcadores moleculares (JAK2<sup>V617F</sup> y proteínas STAT) o un efecto citotóxico; la ambigüedad de estos resultados hace difícil proporcionar la transferibilidad de estos efectos, obtenidos *in vitro*, a situaciones de tratamiento *in vivo*, especialmente para cualquier tratamiento terapéutico en seres humanos.

#### Descripción de la invención

Hemos encontrado ahora, y esto constituye un aspecto de la presente invención, que la administración de cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio, preferiblemente en forma monohidrato, más preferiblemente en forma de cristal monohidrato, a pacientes que padecen policitemia verdadera, trombocitemia esencial o mielofibrosis produce una respuesta completa o parcial; además, en pacientes que inicialmente demostraron un estado de esplenomegalia, se observa una reducción significativa en el volumen del bazo.

También hemos encontrado, que la dosis terapéutica de tal principio activo, para el tratamiento de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos en seres humanos, es significativamente menor que la normalmente usada para el tratamiento de síndromes tumorales, es decir, desde 10 hasta 150 mg/día/paciente, preferiblemente desde 30 hasta 120 mg/día/paciente, e incluso más preferiblemente desde 50 hasta 100 mg/día/paciente.

Simplemente a modo de ejemplo, la dosis de Zolinza™ (vorinostat) indicada para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T es 400 mg/día.

La presente invención se refiere al uso de cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio, preferiblemente en forma monohidrato, más preferiblemente en forma de cristal monohidrato para el tratamiento terapéutico de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos (policitemia verdadera, trombocitemia verdadera o mielofibrosis idiopática) según las reivindicaciones. Tal principio activo se puede usar solo, es decir, no en combinación con otros principios activos, o en combinación con otros principios activos citostáticos tal como, simplemente a modo de ejemplo, hidroxiurea o pipobromano.

La presente invención también se refiere al uso terapéutico de tal principio activo, para el tratamiento de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos, a dosis diarias menores que las usadas para el tratamiento de patologías tumorales (por ejemplo: linfoma cutáneo de células T), estas dosis son desde 10 hasta 150 mg/día/paciente, preferiblemente desde 30 hasta 120 mg/día/paciente, e incluso más preferiblemente desde 50 hasta 100 mg/día/paciente.

El término "tratamiento", en relación a la presente invención, se debe entender como que significa la acción de cuidar, aliviar, mitigar, minimizar, eliminar o bloquear los efectos dañinos que resultan del estado patológico o de la progresión el estado de enfermedad.

La actividad inhibidora de un compuesto particular, con respecto a histonas desacetilasas, se puede medir *in vitro* usando, por ejemplo, un ensayo de enzima que demuestra la inhibición de al menos una de estas enzimas. Ensayos de este tipo se conocen en la bibliografía: véase, por ejemplo, P.A. Marks et al. en *J. Natl. Cancer Inst.* 92 1210-1215 (2000); L.M. Butler et al. en *Cancer Res.* 60 5165-5170 (2000); V.M. Richon et al. en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 3003-3007 (1998); M. Yoshida et al. en *J. Biol. Chem.* 265 17174-17179 (1990); también están disponibles

comercialmente kits para medir la inhibición de HDAC (por ejemplo, Biomol International LP (EE UU); HDAC1 Fluorimetric Drug Discovery Kit, número de producto BML-AK511- 0001).

Se pretende que los siguientes ejemplos sean ilustrativos de la invención.

- 5 Ejemplo 1
- Estudio clínico de ITF2357 en pacientes que padecen síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos. Diseño: estudio no aleatorizado, abierto, de fase II.
- 10 Población en el estudio: 27 pacientes con la mutación JAK2<sup>V617F</sup> que padecen síndromes mieloproliferativos no controlados adecuadamente por el tratamiento farmacológico estándar (hidroxiurea).
- 15 Fármaco en estudio: ITF2357 a una dosis de 50 mg dos veces al día.
- 20 Duración del tratamiento: hasta un máximo de 24 semanas de administración continua.
- Objetivo primario: Evaluar la eficacia y tolerabilidad de ITF2357 en el tratamiento de pacientes que tienen enfermedades mieloproliferativas positivas para JAK2<sup>V617F</sup> (PV, TE, MI).
- 25 Objetivo secundario: evaluar el efecto de tratamiento en la carga de alelo de JAK2 mutado por PCR cuantitativa.
- El examen de los datos preliminares (duración del tratamiento de 4 a 12 semanas) muestra que la administración de ITF2357 a pacientes que padecen policitemia verdadera, trombocitemia esencial o mielofibrosis induce una respuesta completa o parcial en aproximadamente el 60% de los casos; además, se observa una reducción significativa en el volumen del bazo en pacientes que inicialmente mostraban un estado de esplenomegalia.

Ejemplo 2

30 Efecto comparativo de la eficacia de clonación de la línea celular humana SET-2

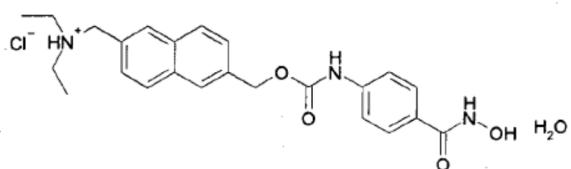
La línea celular humana SET-2, con JAK2<sup>V617F</sup> mutada (una línea celular megacarioblástica establecida de la sangre periférica de un paciente con transformación leucémica de trombocitemia esencial) se obtuvo por el banco de células alemán DSMZ (número de catálogo ACC 608) y se cultivó en placas de 24 pocillos en medio de cultivo (RPMI 1640 + tampón Hepes 1 M + penicilina 10,000 UI/ml + estreptomicina 10,000 UI/ml + suero fetal de ternera al 20%). Se llevaron a cabo experimentos previos para determinar el número óptimo de células que da un número suficiente de clones en cada placa de Petri para hacer un recuento reproducible. En el caso de la línea SET-2, el número correspondía a  $3 \times 10^3$  células/placa de Petri. Cuando se obtuvieron un número suficiente de células, las células se recogieron por centrifugación (10 minutos a  $10^3$  rpm) y después se resuspendieron en medio de cultivo a la concentración de  $90 \times 10^3$  células/ml. Se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión a 3,0 ml de metilcelulosa (Methocult™, número de catálogo H4230, Stemcell Technologies) preparada como describe el fabricante y, a continuación, se añadieron 50  $\mu$ l de una solución concentrada 63 veces del inhibidor de HDAC en DMSO al 0,1%. Para cada compuesto se probaron 5 diluciones en serie (intervalo 1000-12 nM). La solución de metilcelulosa que contenía el inhibidor de HDAC se mezcló después cuidadosamente usando un pipeta Pasteur de plástico estéril evitando la formación de burbujas. Al final se dispensó homogéneamente 1 ml de la solución en una placa de Petri (35 mm de diámetro con cuadrícula, número de catálogo 174926 Nunc) usando una jeringa con una aguja de 18G. Para cada punto experimental se hicieron 2 placas de Petri. Las 2 placas experimentales se pusieron en una placa de Petri mayor junto con un depósito de agua estéril para asegurar una humedad constante. Todas las placas se mantuvieron a 37°C en un incubador estéril con humedad y CO<sub>2</sub> controlado. Después de 14 días de crecimiento, se determinó el número de clones en cada placa usando un microscopio binocular. Se calculó el número medio de clones para cada lote de placas y se determinó el porcentaje de inhibición de la formación de clones con respecto al número de clones obtenidos en ausencia de cualquier compuesto (placas control). Se calculó el valor de CE<sub>50</sub> (concentración requerida para reducir el 50% el número de clones) usando el software GraphPad Prism 5.0 y se describe en la tabla a continuación. También se describen los valores para la inhibición de rhHDAC1: la enzima se obtuvo de BPS Biosciences (no. de catálogo 50001) y la prueba se llevó a cabo usando un kit BIOMOL, según las instrucciones del suministrador.

Tabla 1

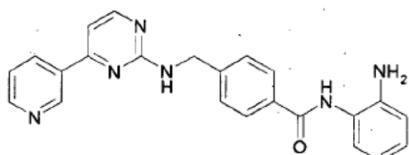
Código	Creador	INN	Clase química	CE <sub>50</sub> $\mu$ M	CI <sub>50</sub> nM (rhHDAC1)
ITF2357	Italfarmaco	Givinostat	Ácido hidroxámico	0,028-0,054*	121
MGCD-0103	MethylGene	Mocetinostat	Benzamida	1,196**	17
KD-5170	Kalypsys	---	S,acetil- $\alpha$ -mercaptopacetona	<20% de inh. a 1 $\mu$ M	24
SNDX-275	Bayer Schering	Entinostat	Benzamida	1,820**	293

\*) valores obtenidos en dos experimentos diferentes  
 \*\*) p<0,05 hacia ITF2357 en el mismo experimento

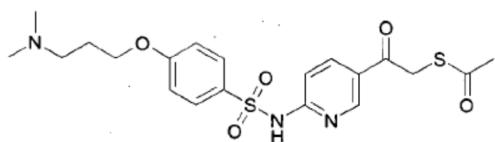
- 5 Aunque Mocetinostat y Entinostat se consideran como inhibidores de HDAC específicos de clase I [Zhou, N. et al. *J Med Chem* 51, 4072 (2008) y Jones, P. et al. *J Med Chem* 51, 2350 (2008)], se ha descrito que KD-5170 es un inhibidor de amplio espectro de HDAC de Clase I y II [documento WO 2007/067795; Payne, J.E. et al. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 6093 (2008)], lo mismo que ITF2357.
- 10 Aunque no se ha demostrado que la inhibición de la eficacia de clonación de células SET-2 sea predictiva para la cura de los síndromes mieloproliferativos, JAK2<sup>V617F</sup> positivos, Filadelfia negativos, el potente efecto inhibidor de ITF2357, si se compara con los otros inhibidores de HDAC, parece indicar que la presencia de inhibición de histona desacetilasa no es esencial para obtener la eficacia clínica mostrada por ITF2357 con respecto a síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos.
- 15 Los compuestos ensayados se corresponden con las siguientes fórmulas:



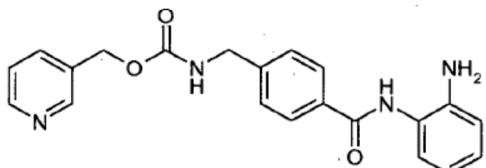
Givinostat (ITF2357)



Mocetinostat (MGCD-0103)



KD-5170



Entinostat (MS-275; SNDX-275)

## REIVINDICACIONES

1. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio, u otras sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de síndromes mieloproliferativos Filadelfia negativos, **caracterizado en que** la dosis diaria es desde 10 a 150 mg por paciente.
- 5 2. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** está en forma monohidrato.
- 10 3. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** está en forma de cristal monohidrato.
- 15 4. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** la dosis diaria es desde 30 a 120 mg por paciente.
- 5 5. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** la dosis diaria es desde 50 a 100 mg por paciente.
- 20 6. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el síndrome mieloproliferativo Filadelfia negativo es policitemia verdadera.
- 25 7. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el síndrome mieloproliferativo Filadelfia negativo es trombocitemia esencial.
8. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el síndrome mieloproliferativo Filadelfia negativo es mielofibrosis primaria.
- 30 9. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el síndrome mieloproliferativo Filadelfia negativo es mielofibrosis secundaria.
- 35 10. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** no se administra en combinación con otros principios activos.
- 40 11. Cloruro de dietil-[6-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoiloximetil)-naftalen-2-il metil]-amonio para uso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** se administra en combinación con al menos otro principio activo citostático.