

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 076**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4045** (2006.01)

**A61K 31/4965** (2006.01)

**A61K 31/165** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2006 E 06789025 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1912640**

54 Título: **Uso del inhibidor de HDAC panobinostat para el tratamiento de mieloma**

30 Prioridad:

**03.08.2005 US 705226 P**

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

**08.09.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ATADJA, PETER W.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 545 076 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 del inhibidor de HDAC panobinostat para el tratamiento de mieloma

5 La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de HDAC como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para el tratamiento de mieloma, en el que el mieloma es resistente a una terapia convencional. Un método para el tratamiento de un animal de sangre caliente, en especial un ser humano, que tenga mieloma, el cual comprende administrar a este animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de HDAC, en especial un compuesto de la Fórmula (III), como se define en el presente documento; una combinación  
10 que comprende un inhibidor de HDAC y un compuesto que efectúa la apoptosis de las células de mieloma, de preferencia bortezomib, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso simultáneo, separado, o en secuencia; y también se describen una composición farmacéutica y un paquete comercial que comprende esta combinación.

15 El término "mieloma", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tumor compuesto de células del tipo que se encuentra normalmente en la médula ósea. El término "mieloma múltiple", como se utiliza en el presente documento, significa un neoplasma maligno diseminado de células de plasma, que se caracteriza por múltiples *foci* tumorales de médula ósea, y secreción de un componente M (un fragmento de inmunoglobulina monoclonal), asociado con lesiones osteolíticas ampliamente extendidas que dan como resultado dolor de huesos, fracturas patológicas, hipercalcemia, y anemia normocítica normocrónica. El mieloma múltiple es incurable mediante el uso de  
20 las quimioterapias convencionales y de dosis alta.

Los compuestos de la Fórmula (I), como se definen en el presente documento, son inhibidores de la desacetilasa de histona ("inhibidores de HDAC"). La acetilación reversible de las histonas es un regulador importante de la expresión  
25 genética que actúa alterando la accesibilidad de los factores de transcripción al ADN. En las células normales, la desacetilasa de histona (HDA) y la acetil-transferasa de histona, controlan juntas el nivel de acetilación de las histonas para mantener un equilibrio. La inhibición de la desacetilasa de histona da como resultado la acumulación de histonas hiperacetiladas, lo cual da como resultado varias respuestas celulares.

30 De una manera sorprendente, ahora se ha encontrado que los inhibidores de HDAC, en especial los compuestos de la Fórmula (I), como se definen en el presente documento, inhiben directamente la proliferación de las líneas celulares de mieloma y las células de mieloma de los pacientes que expresan Flt-1. En adición, estos compuestos inhiben la migración de células de mieloma, ensayado mediante el ensayo de migración celular trans-pozos. Adicionalmente, estos compuestos pueden inhibir tanto la proliferación de las células de mieloma que son adherentes a las células estromales de médula ósea (BMSCs), como la secreción de IL-6 inducida por el enlace de  
35 las células de mieloma BMSCs. Por tanto, la invención proporciona

- El uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (III), *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento  
40 para el tratamiento de mieloma, en el que el mieloma es resistente a quimioterapia convencional

- el uso de un inhibidor de HDAC de fórmula (III), *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento  
45 para el tratamiento de mieloma múltiple, en el que el mieloma múltiple es resistente a quimioterapia convencional;

- un inhibidor de HDAC, que es *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del mieloma, en el que el  
50 mieloma es resistente a quimioterapia convencional;

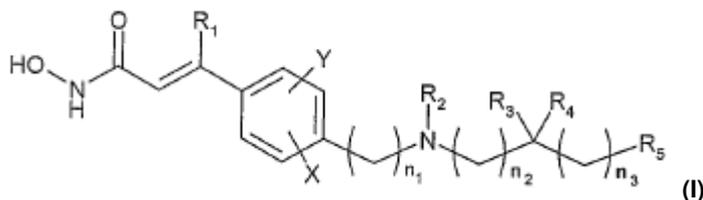
- un inhibidor de HDAC, que es *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de mieloma, en el que el mieloma  
55 múltiple es resistente a quimioterapia convencional;

- una combinación para su uso en el tratamiento de mieloma que comprende un inhibidor de HDAC y un compuesto que efectúa la apoptosis de células de mieloma, en el que los ingredientes activos están presentes,  
60 en cada caso, en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de HDAC es el compuesto de fórmula (III) y en el que el compuesto que efectúa la apoptosis de las células de mieloma es bortezomib;

- una combinación para su uso como se ha definido anteriormente, en el que el uso es un uso simultáneo, separado o secuencial.

**Compuestos Inhibidores de HDAC**

Los compuestos inhibidores de HDAC descritos en el presente documento son los compuestos de hidroxamato descritos por la Fórmula (I):



5

en la que

- 10 R<sub>1</sub> es H; halógeno; o un alquilo de 1 a 6 átomos de carbono de cadena recta, en especial metilo, etilo, o propilo normal, cuyos sustituyentes de metilo, etilo, y propilo normal están insustituídos o sustituidos por uno o más sustituyentes descritos más adelante para los sustituyentes de alquilo;
- 15 R<sub>2</sub> se selecciona entre H; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquil-alquilo de 4 a 9 átomos de carbono; cicloalquil-alquilo, por ejemplo ciclopropil-metilo; arilo; heteroarilo; aril-alquilo, por ejemplo bencilo; heteroaril-alquilo, por ejemplo piridil-metilo; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)R<sub>6</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OC(O)R<sub>6</sub>; amino-acilo; HON-C(O)-CH=C(R<sub>1</sub>)-aril-alquilo-; y -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sub>7</sub>;
- 20 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes, y son independientemente H; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; acilo; o acil-amino; o
- 25 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>, junto con el átomo de carbono con el que están enlazados, representan C=O, C=S, o C=NR<sub>6</sub>; o
- 30 R<sub>2</sub>, junto con el átomo de nitrógeno con el que está enlazado, y R<sub>3</sub>, junto con el átomo de carbono con el que está enlazado, pueden formar un hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; un heteroarilo; un poli-heteroarilo; un poli-heterociclo no aromático; o un anillo mixto de poli-heterociclo de arilo y no de arilo;
- 35 R<sub>5</sub> se selecciona entre H; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; acilo; arilo; heteroarilo; aril-alquilo, por ejemplo bencilo; heteroaril-alquilo, por ejemplo piridil-metilo; policiclos aromáticos; policiclos no aromáticos; policiclos mixtos de arilo y no de arilo; poli-heteroarilo; poli-heterociclos no aromáticos; y poli-heterociclos mixtos de arilo y no de arilo;
- 40 n, n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, y n<sub>3</sub> son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de 0 a 6; cuando n<sub>1</sub> es de 1 a 6, cada átomo de carbono puede estar opcionalmente sustituido independientemente con R<sub>3</sub> y/o R<sub>4</sub>;
- 45 X e Y son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente a partir de H; halógeno; alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, tal como CH<sub>3</sub> y CF<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>; C(O)R<sub>1</sub>; OR<sub>9</sub>; SR<sub>9</sub>; CN; y NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>;
- 50 R<sub>6</sub> se selecciona entre H; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; cicloalquil-alquilo, por ejemplo ciclopropil-metilo; arilo; heteroarilo; aril-alquilo, por ejemplo bencilo y 2-fenil-etenilo; heteroaril-alquilo, por ejemplo piridil-metilo; OR<sub>12</sub>; y NR<sub>13</sub>R<sub>14</sub>;
- 55 R<sub>7</sub> se selecciona entre OR<sub>15</sub>; SR<sub>15</sub>; S(O)R<sub>16</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>17</sub>; NR<sub>13</sub>R<sub>14</sub>; y NR<sub>12</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;
- R<sub>8</sub> se selecciona entre H; OR<sub>15</sub>; NR<sub>13</sub>R<sub>14</sub>; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; arilo; heteroarilo; aril-alquilo, por ejemplo bencilo; y heteroaril-alquilo, por ejemplo piridil-metilo;
- R<sub>9</sub> se selecciona entre alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo CH<sub>3</sub> y CF<sub>3</sub>; C(O)-alquilo, por ejemplo C(O)CH<sub>3</sub>; y C(O)CF<sub>3</sub>;
- R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente a partir de H; alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y -C(O)-alquilo;
- R<sub>12</sub> se selecciona entre H; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquil-alquilo de 4 a 9 átomos de carbono; arilo; policiclo mixto de arilo y no de arilo; heteroarilo; aril-alquilo, por ejemplo bencilo; y heteroaril-alquilo, por ejemplo piridil-metilo;
- R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente a partir de H; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; arilo; heteroarilo; aril-alquilo, por ejemplo bencilo; heteroaril-alquilo, por ejemplo piridil-metilo; amino-acilo; o
- R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub>, junto con el átomo de nitrógeno con el que están enlazados, son hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; heteroarilo; poli-heteroarilo; poli-heterociclo no aromático; o poli-heterociclo mixto de arilo y no de arilo;
- R<sub>15</sub> se selecciona entre H; alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; arilo; heteroarilo; aril-alquilo; heteroaril-alquilo; y (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>ZR<sub>12</sub>;
- R<sub>16</sub> se selecciona entre alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; arilo; heteroarilo; poli-heteroarilo; aril-alquilo; heteroaril-alquilo; y (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>ZR<sub>12</sub>;
- R<sub>17</sub> se selecciona entre alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; hetero-cicloalquilo de 4 a 9 átomos de carbono; arilo; policiclos aromáticos; heteroarilo; aril-alquilo; heteroaril-alquilo; poli-heteroarilo; y NR<sub>13</sub>R<sub>14</sub>;
- m es un entero seleccionado de 0 a 6; y

Z se selecciona entre O; NR<sub>13</sub>; S; y S(O);

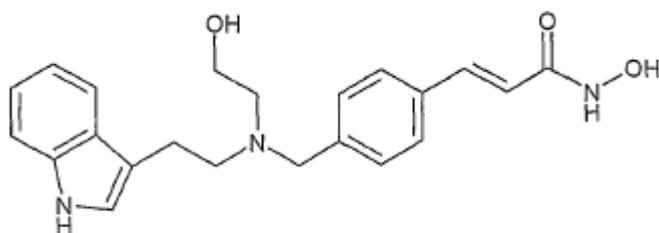
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 5 Como sea apropiado, "insustituido" significa que no hay sustituyente alguno, o que los únicos sustituyentes son hidrógeno.

Los compuestos descritos anteriormente se utilizan con frecuencia en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, las sales de adición de base y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, por ejemplo las sales de metales, tales como las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, las sales de amonio, las sales de adición de amina orgánica, y las sales de adición de aminoácido, y las sales de sulfonato. Las sales de adición de ácido incluyen las sales de adición de ácido inorgánico, tales como clorhidrato, sulfato, y fosfato; y las sales de adición de ácido orgánico, tales como alquil-sulfonato, aril-sulfonato, acetato, maleato, fumarato, tartrato, citrato, y lactato. Los ejemplos de las sales de metales son las sales de metales alcalinos, tales como la sal de litio, la sal de sodio, y la sal de potasio; las sales de metales alcalinotérreos, tales como la sal de magnesio y la sal de calcio, la sal de aluminio, y la sal de zinc. Los ejemplos de las sales de amonio son la sal de amonio y la sal de tetrametil-amonio. Los ejemplos de las sales de adición de amina orgánica son las sales con morfolina y piperidina. Los ejemplos de las sales de adición de aminoácido son las sales con glicina, fenilalanina, ácido glutámico, y lisina. Las sales de sulfonato incluyen mesilato, tosilato, y las sales de ácido benzenosulfónico.

En la Publicación Internacional Número WO 02/22577, publicada el 21 de marzo de 2002, se dan a conocer compuestos de HDAI dentro del alcance de la Fórmula (I), y su síntesis. Dos compuestos dentro del alcance de la Publicación Internacional Número WO 02/22577 son:

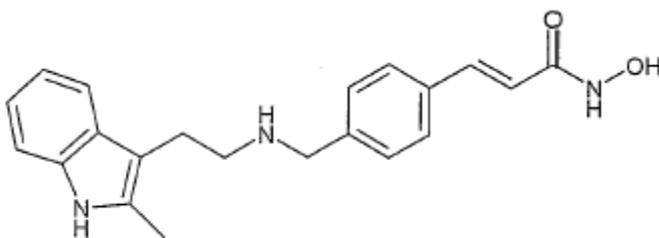
25



(II)

N-hidroxi-3-[4-[(2-hidroxi-etil)-(2-(1H-indol-3-il)-etil)-amino]-metil]-fenil]-2E-2-propenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

30



(III)

N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]-metil]-fenil]-2E-2-propenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

35

Catley et al. (Blood 2003, 102, 7, 2615-2622) desvelan el compuesto NVP-LAQ824 como un inhibidor de histona desacetilasa potente con una actividad significativa frente a mieloma múltiple, incluyendo mieloma múltiple resistente a terapias convencionales.

40 Xin-Yan Pei et al. (Clinical Cancer Research 2004, 10, 3839-3852) desvela una aparición de sinergia tras una combinación del inhibidor de proteasoma bortezomib con los inhibidores de histona desacetilasa, butirato sódico o ácido suberoilaniuro hidroxámico en células de mieloma múltiple humano que son sensibles y resistentes a agentes convencionales.

45 El documento WO-A-03/048774 se refiere al uso de niveles de alfa-tubulin-acetilación como un biomarcador para la inhibición de proteína desacetilasa y a la identificación de compuestos que tienen actividad antiproliferativa. El método de exploración de la actividad antiproliferativa de un compuesto comprende poner en contacto células de mamíferos que pueden establecerse a partir de cánceres humanos, tales como un mieloma, especialmente mieloma múltiple, con el compuesto. El documento WO-A-03/048774 desvela métodos de tratamiento de una enfermedad proliferativa que comprende medir el nivel de alfa-tubulina acetilada en células del sujeto que padece la enfermedad

50

proliferativa y administrar un compuesto inhibidor de proteína desacetilasa, tal como, por ejemplo, panobinostat.

La presente invención pertenece en particular al uso del inhibidor de HDAC de fórmula (III) para la preparación de un medicamento, para el tratamiento de mieloma, que sea resistente a la quimioterapia convencional.

5 Un inhibidor de HDAC, denominado anteriormente, exhibe, en el ensayo descrito anteriormente, de preferencia un valor  $CI_{50}$  de entre 50 y 2,500 nM, más preferiblemente de entre 250 y 2,000 nM, y de una manera muy preferible de entre 500 y 1,250 nM.

10 Adicionalmente, se describe un método para el tratamiento de mieloma, en especial mieloma que sea resistente a la quimioterapia convencional, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de HDAC a un animal de sangre caliente, en particular a un ser humano, que lo necesite, de preferencia una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I), como se define anteriormente, o la sal de este compuesto que tenga cuando menos un grupo formador de sal, a un animal de sangre caliente, de preferencia un ser humano, que lo necesite.

15 A través de toda la presente solicitud y de las reivindicaciones, mieloma significa de preferencia mieloma múltiple (MM).

20 El término "tratamiento", como se utiliza en el presente documento, comprende el tratamiento de los pacientes que tengan mieloma, o que estén en una etapa previa de esta enfermedad, que efectúe la demora del progreso de la enfermedad en estos pacientes.

25 El bortezomib es un agente principal para el tratamiento de mieloma múltiple, que efectúa la apoptosis de las células de mieloma. De una manera sorprendente, se ha encontrado que los inhibidores de HDAC de la presente invención, se agregan al efecto de Bortezomib sobre las células de mieloma múltiple.

30 Por consiguiente, la presente invención pertenece también a una combinación que comprende un inhibidor de HDAC, que es un compuesto de la Fórmula (III), como se define anteriormente, y un compuesto que efectúa la apoptosis de las células de mieloma, en donde los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso simultáneo, separado, o en secuencia, en especial para utilizarse en un método para el tratamiento de mieloma. En esta combinación, el compuesto que efectúa la apoptosis de las células de mieloma es bortezomib.

35 Una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un compuesto que efectúa la apoptosis de las células de mieloma, en donde los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de HDAC es el compuesto de fórmula (III) y el compuesto que efectúa la apoptosis de células de mieloma es bortezomib, será referida posteriormente en el presente documento como una COMBINACIÓN DE LA INVENCION.

La COMBINACIÓN DE LA INVENCION puede ser una preparación combinada o una composición farmacéutica.

45 El término "una preparación combinada", como se utiliza en el presente documento, define en especial un "kit de partes", en el sentido de que los ingredientes activos, como se definen anteriormente, se pueden dosificar de una manera independiente, o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los ingredientes, es decir, de una manera simultánea o en diferentes puntos del tiempo. Las partes del kit, por ejemplo, se pueden administrar entonces de una manera simultánea o cronológicamente escalonada, es decir, en diferentes puntos del tiempo y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. De una manera muy preferible, los intervalos de tiempo se seleccionan de tal manera que el efecto sobre la enfermedad tratada en el uso combinado de las partes, sea mayor que el efecto que se obtendría mediante el uso de solamente cualquiera de los ingredientes activos. La proporción de las cantidades totales del ingrediente activo 1 al ingrediente activo 2, para administrarse en la preparación combinada, se pueden variar, por ejemplo, con el objeto de tratar con las necesidades de una sub-población de pacientes que se vaya a tratar, o con las necesidades del paciente individual, cuyas diferentes necesidades pueden deberse a la edad, el sexo, el peso corporal, etc., de los pacientes. De preferencia, hay cuando menos un efecto benéfico, por ejemplo una mejora mutua del efecto de los primero y segundo ingredientes activos, en particular un sinergismo, por ejemplo un efecto más que aditivo, efectos convenientes adicionales, menos efectos secundarios, un efecto terapéutico combinado en una dosificación no efectiva de uno o ambos de los primero ingredientes activos, y en especial un fuerte sinergismo de los primero y segundo ingredientes activos.

60 Adicionalmente, se describe un método para el tratamiento de mieloma, el cual comprende administrar una COMBINACIÓN DE LA INVENCION, en una cantidad que sea conjuntamente efectiva terapéuticamente contra el mieloma, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

65

La persona experta en la técnica pertinente está absolutamente capacitada para seleccionar los modelos de prueba relevantes, para probar los efectos benéficos mencionados anteriormente en el presente documento y posteriormente en el presente documento sobre el mieloma, de un compuesto que inhiba la actividad de HDAC, o de una COMBINACIÓN DE LA INVENCION. La actividad farmacológica de un compuesto que inhiba la actividad de HDAC, o una COMBINACIÓN DE LA INVENCION, por ejemplo, se puede demostrar en un estudio clínico adecuado, o por medio de los Ejemplos descritos más adelante. Los estudios clínicos adecuados son, por ejemplo, estudios de escala de dosis de etiqueta abierta, sin selección aleatoria, en pacientes con mieloma avanzado. Estos estudios prueban en particular el sinergismo observado con las COMBINACIONES DE LA INVENCION. Los efectos benéficos sobre mieloma se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios, o mediante cambios en el diseño del estudio, los cuales son conocidos como tales por una persona experta en este campo. Por ejemplo, se puede administrar un componente de combinación con una dosis fija, y se escala la dosis de un segundo componente de combinación, hasta que se alcance la Máxima Dosificación Tolerada (MTD). De una manera alternativa, se puede conducir un estudio doble-cego controlado por placebo, con el objeto de probar los beneficios de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION mencionados en el presente documento.

### Ejemplos

#### Inhibidor de HDAC

La N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]-metil]-fenil]-2E-2-propenamida, el Compuesto (III) (Novartis Pharma, Basilea, Suiza) se disolvió en agua desyodizada, y se almacenó a -20 °C, luego se descongeló y se diluyó en un medio para experimentos de cultivo celular. Para los experimentos con animales, el fármaco se disolvió en agua estéril antes de la inyección intraperitoneal.

#### Líneas Celulares Derivadas de Mieloma Múltiple, y Células de los Pacientes

Se cultivaron las líneas celulares de mieloma múltiple humano sensibles al bortezomib (MM.1S) y resistentes al Bortezomib (MM.1R), así como células RPMI-8226 resistentes a Doxorubicina (Dox 40), Mitoxantrona (MR20), y Melfalano (LR5), en un medio RPMI-1640 (Cellgro, Mediatech, VA) con suero bovino fetal al 10 %, 2 mmol/l de L-glutamina (GIBCO, Grand Island, NY), 100 unidades/mililitro de penicilina, y 101 mg/litro de estreptomycin (GIBCO). Las líneas celulares resistentes al fármaco se cultivaron con cualquiera de doxorubicina, mitoxantrona, melfalano, o bortezomib, para confirmar su falta de sensibilidad al fármaco. Las células de los pacientes con mieloma múltiple se purificaron (>95 % CD138+) mediante selección positiva con Microperlas MACS anti-CD138 (Miltenyl, San Diego, CA). Se obtuvieron muestras de células mononucleares de médula ósea (BMMC) y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante sedimentación de densidad Ficoll-Hipaque, y se incubaron en placas de 96 pozos con o sin el Compuesto (III).

#### Cultivos de BMSC

Se obtuvieron muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Se utilizaron células mononucleares, separadas mediante sedimentación de densidad Ficoll-Hipaque, para establecer los cultivos de médula ósea a largo plazo. Cuando se hubo desarrollado una monocapa de células adherentes, las células se cosecharon en HBSS conteniendo tripsina al 0,25 % y EDTA al 0,02 %, y se lavaron y se recolectaron mediante centrifugación. Entonces se aplicaron la BMSCs sobre placas de 96 pozos de fondo plano durante la noche, y luego se agregaron  $3 \times 10^4$  células MM.1S durante 48 horas. Se removieron 150  $\mu$ l de sobrenadante, y las células se impulsaron con [3H]-timidina (0,5  $\mu$ Ci/pozo) durante las últimas 8 horas de los cultivos de 48 horas. Se utilizó el Duoset ELISA (R&D System) para medir la IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos de 48 horas de las BMSCs con o sin células MM.1S, en la presencia o en ausencia del Compuesto (III).

#### Síntesis del ADN

Las células de mieloma múltiple ( $3 \times 10^4$  células/pozo) se incubaron en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA) en la presencia del medio, el Compuesto (III), y/o bortezomib o IL-6 recombinante (Genetics Institute, Cambridge, MA) durante 48 horas a 37 °C. La síntesis del ADN se midió por la absorción de 3H-timidina (NEN Products, Boston, MA). Las células se impulsaron con 3H-timidina (0,5  $\mu$ Ci/pozo) durante las últimas 8 horas de los cultivos de 48 horas. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

#### Ensayo de Inhibición del Crecimiento

Se evaluó el efecto inhibitor del Compuesto (III) sobre el crecimiento de MM y de BMSC, midiendo la absorbencia de tinte MTS (Promega, Madison, WI) de las células. Las células de cultivos de 24, 48, o 72 horas en 200  $\mu$ l del medio más el fármaco, se impulsaron con 40  $\mu$ l de 5 mg/ml de MTS a cada pozo durante las últimas 4 horas de los cultivos. La absorbencia se midió a 490 nanómetros, utilizando un espectrofotómetro (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA).

Análisis del Ciclo Celular

Las líneas celulares de mieloma múltiple, y las células de mieloma múltiple de los pacientes cultivadas durante 0, 8, 12, 18, 36, y 42 horas en el Compuesto (III) (1  $\mu$ M), en el Compuesto (III) más el inhibidor de pan-caspasa ZVAD-FMK (20  $\mu$ M) (Calbiochem, San Diego, CA), o en un medio de control, se cosecharon, se lavaron con suero regulado con fosfato, se fijaron con etanol al 70 %, y se trataron con 10 mg/ml de RNasa (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN). Luego las células se tiñeron con 5 mg/ml de yoduro de propidio (Sigma), y se determina el perfil del ciclo celular utilizando el software del programa M en un citómetro de flujo Epics (Coulter Immunology, Hialeah, FL). Los datos se analizaron utilizando el sistema de flujo Phoenix.

Detección de Apoptosis

En adición a identificar las células sub-G1 utilizando el análisis del ciclo celular, como se describe anteriormente, también se confirmó la apoptosis utilizando el tinte con anexina V. Se cultivaron células de mieloma múltiple en el medio solo, o con el medio más el Compuesto (III) 1  $\mu$ M a 37 °C durante 24 horas. Luego las células se lavaron dos veces con suero regulado con fosfato helado, y se volvieron a suspender ( $1 \times 10^6$  células/ml) en regulador de enlace (100 mmol/l de HEPES, pH de 7,4, 140 mmol/l de NaCl, 2,5 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$ ). Las células de mieloma múltiple ( $1 \times 10^6$ ) se incubaron con anexina V-FITC (5  $\mu$ l; Pharmingen, San Diego, CA), y con PI (5 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células apoptóticas con anexina B+PI se enumeraron utilizando el seleccionador de células Epics (Coulter).

Inmunotransferencia

Las células de mieloma múltiple de los pacientes, y las células MM.1S, se cultivaron con el Compuesto (III) a 0,01, 0,1, o 1  $\mu$ M; se cosecharon; se lavaron; y se lisaron utilizando el regulador de lisis; el regulador RIPA, 2 mmol/l de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mmol/l de NaF, 1 mmol/l de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), 5 mg/ml de leupeptina, y 5 mg/ml de aprotinina. Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), y se inmunotransfirieron con anti-histona acetilada (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anticuerpo anti-P21 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-PARP; anti-caspasa-8, anti-caspasa 9, y anti-caspasa 3 (Cell Signaling, MA); así como con conjugados anti-poliubiquitina, anti-LMP7, anti- $\beta$ 5 (Affiniti, Mamhead, Exeter, Devon, Reino Unido). Las membranas se pusieron en tiras y se volvieron a sondear con anti-tubulina o anti- $\beta$ -actina (Sigma, St. Louis, MO), para asegurar la carga de proteína equivalente).

Ensayo de Actividad de Proteasoma

Se cuantificó la actividad de proteasoma en extractos citosólicos utilizando el sustrato de proteasoma fluorogénico Suc-LLVYAMC (Calbiochem, San Diego, CA). Dicho de una manera breve, el extracto citosólico (100 microgramos de proteína en 1 ml) se incubó en una reacción de 200  $\mu$ l conteniendo Tris-HCl 21 mM (pH de 7,8), EDA 0,1 mM, y Suc-LLVY-AMC 100  $\mu$ M, a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se midió la fluorescencia en un fluorímetro de placas de microtitulación (excitación de 360 nanómetros; emisión de 460 nanómetros).

EMSA

Se llevaron a cabo extractos nucleares para EMSAs. La sonda de oligonucleótido en consenso NF- $\kappa$ B de doble cadena (5'-GGGGACTTCCC-3', Santa Cruz Biotechnology) se marcó en los extremos con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP0 (50  $\mu$ Ci a 222 TBq/mM; NEN, Boston, MA). Se condujeron reacciones de enlace que contenían 1 ng del oligonucleótido, y 5 microgramos de la proteína nuclear, a temperatura ambiente durante 20 minutos, en un volumen total de 11 ml de regulador de enlace [Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5), NaCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, glicerol al 4 % (v/v), y 0,1 mg de poli-dl.dC] (Farmacia, Peapack, NJ).

Modelo de Xenoinjerto de Murino

Los ratones Beige-Nude-Xid de 5 a 6 semanas de edad se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho con  $3 \times 10^7$  células mM en 100  $\mu$ l de RPMI 1640, junto con 100  $\mu$ l de matriz de membrana de basamento Matrigel (Becton, Bedford, MA), como se describió anteriormente. Cuando los tumores fueron mensurables, los ratones se asignaron a un grupo que recibió el Compuesto (III) en 21 mg/kg intraperitonealmente cada día, o a un grupo de control que recibió el vehículo solo (cloruro de sodio al 0,9 %) en el mismo programa. El tratamiento con el Compuesto (III) se dio en 21 mg/kg. Se llevaron a cabo mediciones de calibre de los diámetros de tumores perpendiculares más largos cada día alterno, para estimular el volumen del tumor, utilizando la siguiente fórmula:

$$4\pi/3x (\text{anchura}/2)^2x (\text{longitud}/2),$$

que representa el volumen tridimensional de una elipse. Los animales se sacrificaron cuando sus tumores alcanzaron 2 centímetros. La supervivencia se evaluó desde el primer día de tratamiento hasta la muerte. El crecimiento tumoral se evaluó desde el primer día del tratamiento hasta el día del primer sacrificio (día 9).

**Análisis Estadístico**

Se determinó el significado estadístico de las diferencias observadas en los cultivos tratados con fármaco contra los cultivos de control utilizando la prueba *t* de Student. El nivel mínimo de significado fue de  $p < 0,05$ . El análisis del sinergismo y el antagonismo con el Compuesto (III) y dexametasona se llevó a cabo utilizando el análisis de Efecto de Dosis Media, en conjunto con el programa de software comercialmente disponible Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO, EUA). Se calcularon las curvas de supervivencia para los ratones utilizando el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en el tiempo de supervivencia entre el grupo de control y el grupo tratado, se compararon utilizando una prueba de rango-log. Los tiempos de supervivencia media se compararon utilizando la prueba exacta de Fisher. Con el fin de comparar el índice de crecimiento tumoral en los dos grupos, se ajustó un modelo de efecto mixto lineal (modelo de coeficiente aleatorio).

Adicionalmente, los Ejemplos demuestran que el Compuesto (III) inhibe el crecimiento de células de mieloma a una concentración inhibitoria media de menos de 10 nM a las 48 horas en las líneas celulares de mieloma múltiple resistentes a las terapias convencionales, así como en las células de los pacientes con mieloma múltiple, como se determinó mediante el ensayo MTS, y la absorción de timidina tritiada. También se inhibió la proliferación de células de mieloma MM.1S cuando se co-cultivaron con células estromales de médula ósea, demostrando la capacidad para superar los efectos estimulantes del micro-medio-ambiente de la médula ósea. Los efectos pro-apoptóticos se confirmaron mediante Western-blot. Se observó una disociación significativa de la caspasa 8, la caspasa 9, la caspasa 3, y PARP, con 20 nM del Compuesto (III) en las células MM.1S, indicando un involucramiento de las sendas apoptóticas tanto intrínseca como extrínseca en la apoptosis mediada por el Compuesto (III). Hubo un aumento asociado de p21, y una disminución de c-myc. Se observó actividad sinérgica en combinación con el inhibidor de proteasoma bortezomib. La inhibición de HDAC inducida por el Compuesto (III) dio como resultado la hiperacetilación de histona en bajas concentraciones nanomolares. La acetilación de la  $\alpha$ -tubulina es una modificación posterior a la traducción que consiste en la adición de un grupo acetilo a la lisina 40, que se revierte mediante HDAC6, o la desacetilasa de tubulina (TDAC). La acetilación de tubulina tiene un papel importante en la diferenciación de la estructura y función de los microtúbulos. Adicionalmente, la desacetilasa de tubulina se enlaza de una manera constitutiva tanto con las proteínas mal plegadas poliubiquitinadas, como con la dineína, la proteína mal plegada de reclutamiento para los motores de dineína para el transporte a los agrosomas a lo largo de los microtúbulos, que sirve como un mecanismo de defensa importante contra la apoptosis en las células de mieloma múltiple. Es importante que se observó una inhibición dependiente de la dosis de TDAC en las células MM.1S con bajas concentraciones nanomolares del Compuesto (III).

También se describe una composición farmacéutica que comprenda una cantidad, que sea conjuntamente efectiva terapéuticamente contra mieloma, la cual comprenda la COMBINACIÓN DE LA INVENCION. En esta composición, los componentes de combinación se pueden administrar juntos, uno después del otro, o por separado en una forma de dosificación unitaria combinada, o en dos formas de dosificación unitaria separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas para la administración separada de los componentes de combinación, y para la administración de una combinación fija, es decir, una sola composición galénica comprendiendo cuando menos dos componentes de combinación, de acuerdo con la invención, se pueden preparar de una manera conocida por sí misma, y son aquéllas adecuadas para administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo el hombre, las cuales comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cuando menos un componente de combinación farmacológicamente activo solo o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en especial adecuados para aplicación enteral o parenteral.

La composición farmacéutica novedosa contiene, por ejemplo, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 %, de preferencia de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 % de los ingredientes activos. Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquéllas en formas de dosificación unitaria, tales como tabletas recubiertas con azúcar, tabletas, cápsulas, o supositorios, y además ampolletas. Si no se indica de otra manera, éstas se preparan de una manera conocida por sí misma, por ejemplo por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución, o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario de un componente de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita por sí mismo constituir una cantidad efectiva, debido a que se puede alcanzar la cantidad efectiva necesaria mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

En particular, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los componentes de combinación de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION de una manera simultánea o en secuencia y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como una combinación fija. Por ejemplo, el método de tratamiento de mieloma de acuerdo con la presente invención puede comprender:

- (i) la administración de un componente de combinación (a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- y

(ii) la administración de un componente de combinación (b), en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, de una manera simultánea o en secuencia en cualquier orden, en cantidades conjuntamente efectivas terapéuticamente, de preferencia en cantidades sinérgicamente efectivas, por ejemplo, en dosificaciones diarias correspondientes a las cantidades descritas en el presente documento.

5 Los componentes de combinación individuales de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION se pueden administrar por separado, en diferentes tiempos durante el transcurso de la terapia, o de una manera concurrente, en formas de combinación divididas o individuales. Adicionalmente, el término "administrar" también abarca el uso de un pro-  
10 fármaco de un componente de combinación que se convierta *in vivo* hasta el componente de combinación como tal. Por consiguiente, se debe entender que la presente invención abarca todos los regímenes de tratamiento simultáneo o alternado, y el término "administrar" se debe interpretar de conformidad con lo mismo.

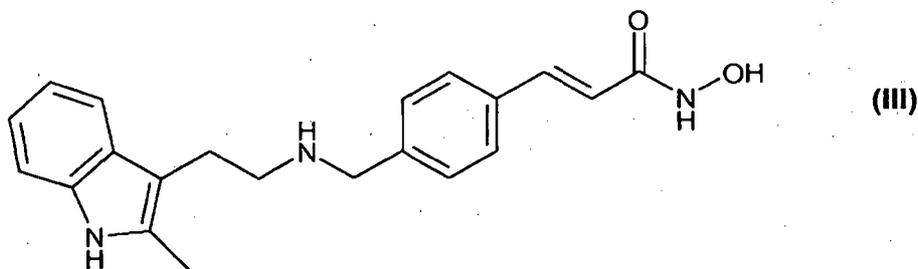
15 La dosificación efectiva de los compuestos utilizada para inhibir la actividad de HDAC y de los componentes de combinación empleados en la COMBINACIÓN DE LA INVENCION, puede variar dependiendo del compuesto particular o de la composición farmacéutica empleada, del modo de administración, del tipo de mieloma que se esté tratando, de la severidad del mieloma que se esté tratando. Por consiguiente, el régimen de dosificación de la  
20 COMBINACIÓN DE LA INVENCION se selecciona de acuerdo con varios factores, incluyendo la vía de administración, y la función renal y hepática del paciente. Un médico, clínico, o veterinario de una experiencia ordinaria, puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de los compuestos que inhiban la actividad de HDAC, o de los ingredientes activos individuales de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION requeridos para prevenir, contrarrestar, o detener el progreso de la condición. La precisión óptima para alcanzar la concentración de los  
ingredientes activos dentro del intervalo que produzca eficacia sin toxicidad, requiere de un régimen basado en la cinética de la disponibilidad y sitios objetivo de los ingredientes activos.

25 Más aún, la presente invención proporciona un paquete comercial que comprende, como ingredientes activos, la COMBINACIÓN DE LA INVENCION, junto con instrucciones para su uso simultáneo, separado, o en secuencia, en el tratamiento de mieloma.

30 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula (III), como se define en el presente documento, para el tratamiento de mieloma, en el que el mieloma es resistente a quimioterapia convencional y el uso de una COMBINACIÓN DE LA INVENCION, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de mieloma.

## REIVINDICACIONES

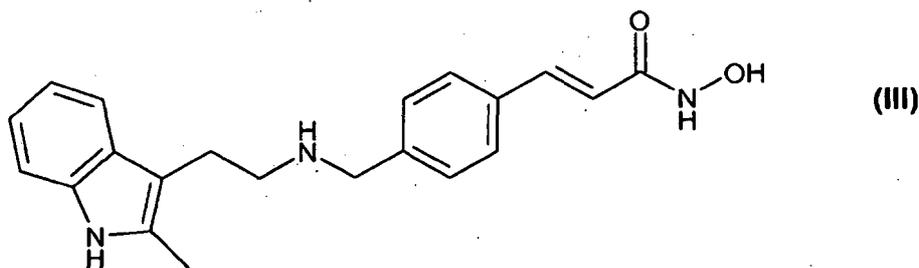
1. El uso de un inhibidor de HDAC para la preparación de un medicamento para el tratamiento de mieloma, en el que el inhibidor de HDAC es *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-ilo)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida que tiene la fórmula (III)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en el que el mieloma es resistente a quimioterapia convencional.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad es mieloma múltiple.

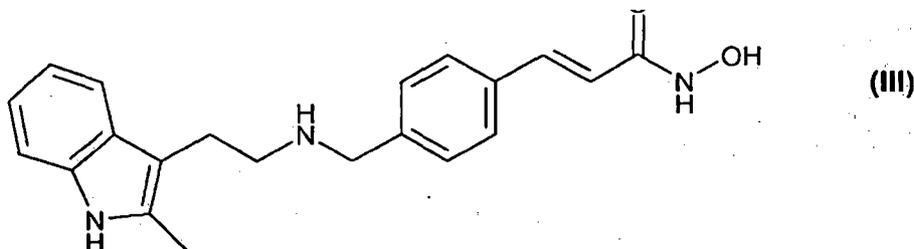
3. Un inhibidor de HDAC que es *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-ilo)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida que tiene la fórmula (III)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de mieloma, en el que el mieloma es resistente a quimioterapia convencional.

4. Un inhibidor de HDAC de acuerdo con la reivindicación 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad es mieloma múltiple.

5. Una combinación para uso en el tratamiento de mieloma que comprende un inhibidor de HDAC y un compuesto que efectúa la apoptosis de células de mieloma, en donde los ingrediente activos están presentes en cada caso en forma libre o en una sal farmacéuticamente aceptable y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el inhibidor de HDAC es *N*-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-ilo)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida que tiene la fórmula (III)



y en donde el compuesto que efectúa la apoptosis de células de mieloma es bortezomib.

6. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el uso es un uso simultaneo, por separado o secuencial.

7. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en donde el mieloma es mieloma múltiple.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que es conjuntamente una cantidad terapéuticamente eficaz frente a mieloma, de una combinación de acuerdo con la reivindicación 5 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de mieloma.