

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 500**

51 Int. Cl.:

C07K 5/08 (2006.01)

A01N 43/78 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2011 PCT/US2011/038246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11150283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11787462 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2575467**

54 Título: **Compuestos macrocíclicos útiles como inhibidores de histonas desacetilasas**

30 Prioridad:

27.05.2010 US 348978 P

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

20.12.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**LIU, XUEDONG;
PHILLIPS, ANDREW, J.;
UNGERMANNOVA, DANA;
NASVESCHUK, CHRISTOPHER, G. y
ZHANG, GAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 594 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos macrocíclicos útiles como inhibidores de histonas desacetilasas

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere en general a una serie de nuevos compuestos macrocíclicos depsipéptidos, que tienen propiedades de inhibición de histona desacetilasa (HDAC). En particular, la presente descripción describe compuestos que son adecuados para usar en detener selectivamente el crecimiento celular, induciendo la diferenciación terminal y/o iniciando la apoptosis de células neoplásicas inhibiendo así su proliferación. La descripción describe métodos para hacer estos nuevos compuestos macrocíclicos, composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden la inhibición selectiva de isoformas de HDAC, que dan como resultado 10 terapias dirigidas para el cáncer. Los compuestos de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades dirigidas por la desregulación de HDAC tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas y diferentes enfermedades del sistema nervioso central.

Antecedentes de la invención

15 Se ha mostrado que el largazol, un depsipéptido cíclico aislado originalmente de una cianobacteria marina *Symploca* sp., es un agente antitumoral (Taori et al. 2008). El largazol se dirige específicamente a histona desacetilasas cuya disfunción a menudo está asociada con una variedad de tumores humanos. Se ha mostrado que el largazol: (i) presenta valores de GI_{50} del orden nM contra una variedad de líneas celulares (p. ej., células de carcinoma mamario PMDA-MB-231, $GI_{50}=7,7$ nM; células de osteosarcoma fibroblástico U2OS, $GI_{50}=55$ nM; células de colon HT29, $GI_{50}=12$ nM; células de neuroblastoma IMR-32 (Taori et al. 2008), $GI_{50}=16$ nM) (Taori et al. 2008), (ii) presenta actividad diferencial entre células transformadas y no transformadas (Nasveschuk et al. 2008; Taori et al. 2008; Ungermannova 2010), y (iii) es estructuralmente más sencillo y posiblemente más tratable sintéticamente que otros 20 depsipéptidos.

Aunque la molécula de largazol es un agente antitumoral probado, siempre son necesarios análogos estructurales mejorados que lleven a mejores propiedades de inhibición de las HDAC, toxicidad y perfiles fisicoquímicos que den como resultado mejores terapias para el cáncer. 25

Se sabe desde hace años que el DMSO y butirato, dos inhibidores de HDAC conocidos relativamente no específicos, pueden inducir a algunas células de leucemia a diferenciarse y suprimir el crecimiento neoplásico (Sato et al. 1971; Leder et al. 1975).

30 En años recientes, las HDAC y las histona acetilasas (HAT) se han aceptado ampliamente como jugadores clave en la regulación de la transcripción (Minucci y Pelicci 2006). La acetilación de lisinas en las colas de la histona H3 e histona H4 está muy correlacionada con los estados de la cromatina que están listos para la transcripción, o que son parte de regiones genómicas activamente transcritas (Allfrey et al. 1964). La acetilación de las histonas también se ha correlacionado con otras funciones celulares importantes incluyendo ensamblaje de cromatina, reparación de ADN y recombinación.

35 Hay 18 enzimas HDAC en el genoma humano que se pueden clasificar en cuatro clases (Lane y Chabner 2009). Las clases I, II y IV contienen todas una molécula de cinc (Zn^{2+}) en su sitio activo (tabla 1 adaptada de (Lane y Chabner 2009)).

40 Debido a su importante función en la regulación de la transcripción y alteraciones de su regulación en células tumorales, se ha postulado que la inhibición de las HDAC podría ser un camino eficaz para los productos terapéuticos para el cáncer. Por consiguiente, ha habido un desarrollo sustancial de inhibidores de enzimas HDAC (HDACi) como potenciales fármacos antineoplásicos (Marks). La importancia clínica de esta atención a los HDACi está justificada y recientemente se ha subrayado por la introducción de vorinostat (Zolinza™, Merck, conocido también ampliamente como SAHA = ácido hidroxámico-suberoilanolida) para el tratamiento del linfoma cutáneo de linfocitos T a finales del 2006 y más recientemente de la romidepsina (FK228) (Marks).

45 La actividad catalítica de las HDAC contiene características tanto de enzimas serina proteasas como de metaloproteasas. Basándose en las estructuras cristalinas de HDAC8 y una proteína similar a histona desacetilasa (HDLP) bacteriana, se ha propuesto el mecanismo para la reacción de desacetilación (Finnin et al. 1999; Somoza et al. 2004; Vannini et al. 2004). Hay un bolsillo estrecho como un tubo, profundo, que se expande en el fondo y una cavidad interna que bordea el bolsillo (figura 1.1). El interior del tubo está compuesto de restos hidrófobos y 50 aromáticos. El ion de cinc está situado en el fondo del bolsillo, y el Zn^{2+} e His 142, actuando como base general, activan la molécula de agua para el ataque nucleófilo al grupo carbonilo del sustrato. Esto daría un carbono tetraédrico que es estabilizado por la formación de un enlace de hidrógeno con la Tyr 306 y un ácido general His 143 que protona el grupo saliente de lisina, dando los productos acetato y lisina. Tanto la His 142 como la His 143 encajan en el sistema basado en carga de Asp 166-His 131, que se propone que modula la basicidad de los restos de His (figura 1.4) (Finnin et al. 1999).

El modo de acción de una mayoría de los inhibidores de HDAC es imitar las interacciones del sustrato con la

desacetilasa, previniendo así la entrada del resto de lisina acetilada situada en la cola de la proteína histona. Todas las moléculas pequeñas inhibitoras de histona desacetilasa comparten tres elementos estructurales que contribuyen a la inhibición de las HDAC: (1) un dominio de reconocimiento de superficie que está anclado en el borde del bolsillo de tipo tubo de las HDAC, (2) un sitio de unión de cinc, (3) una región conectora que conecta el dominio de reconocimiento de superficie con el sitio de unión de cinc (Finnin et al., 1999). La figura 1.5 (adaptada de Newkirk et al., 2009)) muestra un modelo de farmacóforo general de varios inhibidores de HDAC conocidos.

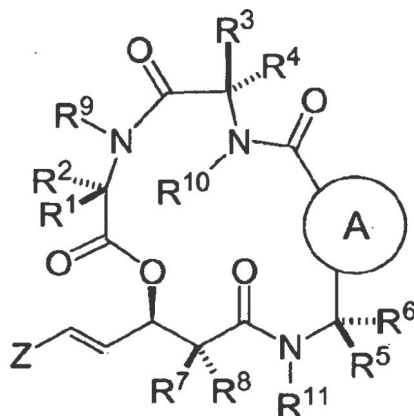
Aunque SAHA ejerce su actividad antineoplásica al menos en parte por la modulación de las HDAC de una forma directa por coordinación del ion Zn^{2+} en el sitio activo de la enzima por el ácido hidroxámico terminal, presenta poca selectividad entre las 3 clases de HDAC en parte debido a la simplicidad de su estructura (Minucci y Pelicci 2006; Lane y Chabner 2009). En general se ha aceptado que las HDAC de clase I son más relevantes para la terapia para el cáncer y la poca selectividad de los inhibidores de HDAC es responsable de las toxicidades crónicas (Minucci y Pelicci 2006; Lane y Chabner 2009). La búsqueda de inhibidores de HDAC de clase I más específicos ha llevado al descubrimiento de una serie de depsipéptidos productos naturales, incluyendo FR901375 (Koho 1991), FK228 (Ueda et al. 1994a), espirucostatina A (Masuoka et al. 2001), y el largazol aislado muy recientemente (Taori et al. 2008) (Figura 2). Estos productos naturales conocidos como depsipéptidos comparten una característica común en cuanto que todos contienen una cadena lateral de ácido (3S,4E)-3-hidroxi-7-mercapto-4-heptenoico (Newkirk et al. 2009). En esta clase de compuestos, tiene que ser expuesto un sulfhidrilo (tiol) libre para desencadenar la actividad inhibitora de HDAC cuando el tiol se coordina con el sitio activo del ion Zn^{2+} para prevenir la catálisis.

El resto de unión al Zn^{2+} del largazol es inactivo salvo que se elimine el tioéster por hidrólisis. Se ha demostrado que el largazol-tiol es a especie activa que inhibe potencialmente las HDAC (Bowers et al. 2008; Ying et al. 2008b). Por lo tanto, lo más probable es que el largazol sea un profármaco que se convierte en activado por esterasas/lipasas tras la absorción en células o conjugado con un vehículo/proteína de transporte y reducido a tiol intracelularmente. Ha habido desarrollos significativos en el diseño de profármacos para mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de compuestos candidatos biológicamente potentes (Rautio et al. 2008). Sin embargo, estas estrategias no se han aplicado sistemáticamente al largazol.

Resumen de las realizaciones

Esta invención se refiere al campo de la terapia para el cáncer. En particular, la invención describe nuevos compuestos macrocíclicos y composiciones farmacéuticas que los comprenden. Además, la invención describe un nuevo procedimiento para hacer y usar estos compuestos. Estos compuestos macrocíclicos son inhibidores de HDAC y son útiles como agentes antiproliferativos para la terapia para el cáncer. Los métodos descritos en la presente memoria han identificado compuestos que tienen selectividad al dirigirse a las HDAC en la terapia antineoplásica. Estos compuestos se dirigen a las HDAC cuya disfunción está asociada a menudo con una variedad de tumores humanos (Marks y Breslow 2007).

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I)



I

en donde

"A" es arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo C_1 - C_{10} , cicloalquilo C_3 - C_{10} , heterocicloalquilo C_3 - C_{10} , arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

Z es $-(CH_2)_nSR_{12}$;

R₁ y R₂ son independientemente H, halógeno, alquilo C_1 - C_{10} , cicloalquilo C_3 - C_{10} , heterocicloalquilo C_3 - C_{10} ,

o R₁ y R₂ juntos,

o uno de R₁, R₂ con R₉ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

5

R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

o R₃ y R₄ juntos,

o uno de R₃, R₄ con R₁₀ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

10

en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂, -S(O)_mR₂₀;

R₅ y R₆ son independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

o R₅ y R₆ juntos,

o uno de R₅, R₆ con R₁₁ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

15

en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

R₇ y R₈ son independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

o R₇ y R₈ juntos forman un cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

20

en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

R₉ es independientemente H, C₁-C₁₀ alquilo, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

o junto con uno de R₁, R₂ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀ heterocicloalquilo, C₃-C₁₀,

25

en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

R₁₀ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

o junto con uno de R₃, R₄ forma un cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

30

en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

R₁₁ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀,

o junto con uno de R₅, R₆ forma un cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈,

35

en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;

R₁₂ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, -COR₂₀, -CONR₂₀R₂₂, -OR₂₀, -COOR₂₀, -COCR₂₀R₂₂NR₂₀R₂₂, -SR₂₀, -P(O)(OR₂₄)₂;

40

R₂₀ y R₂₂ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo o heteroarilo;

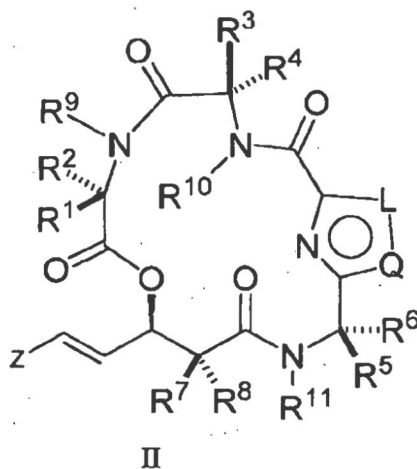
R₂₄ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, Na, K o Ca;

n = 1-6;

m = 1 o 2;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (II)

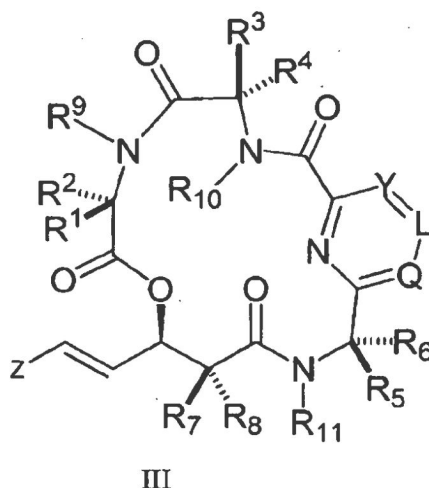


en donde

L y Q son independientemente S, O, N o CR₂₆

- 5 R₂₆ es independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;
- 10 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y Z son como se han descrito antes; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (III)

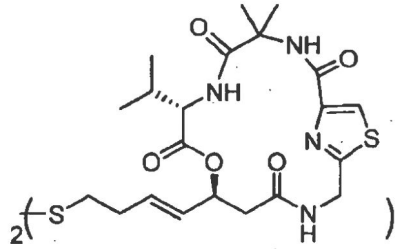


en donde

- 15 L, Q e Y son independientemente S, O, N o CR₂₆;
- R₂₆ es independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂;
- 20 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y Z son como se han descrito antes;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

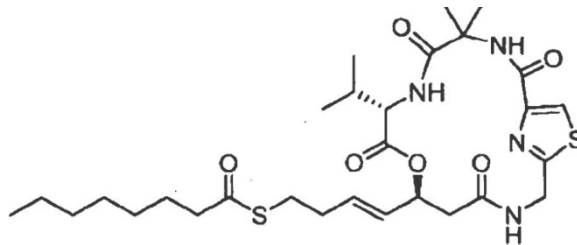
En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (IV)



IV

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

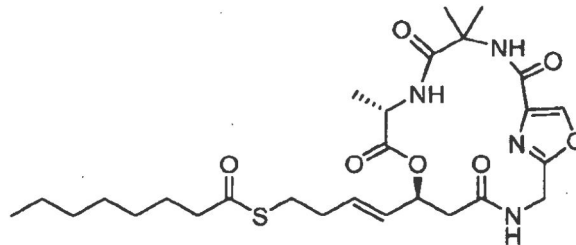
5 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (V)



V

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

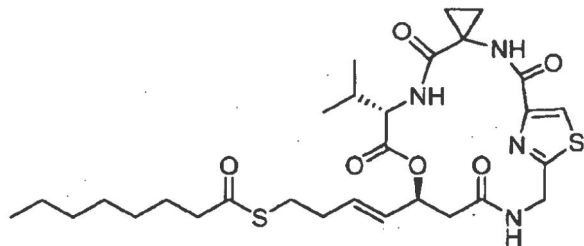
En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (VI)



VI

10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

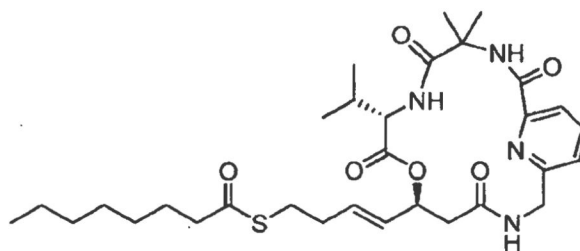
En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (VII)



VII

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

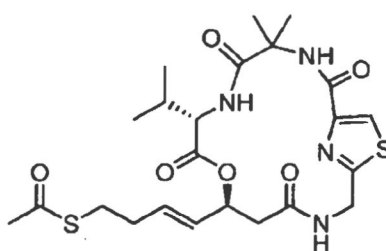
En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (VIII)



VIII

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

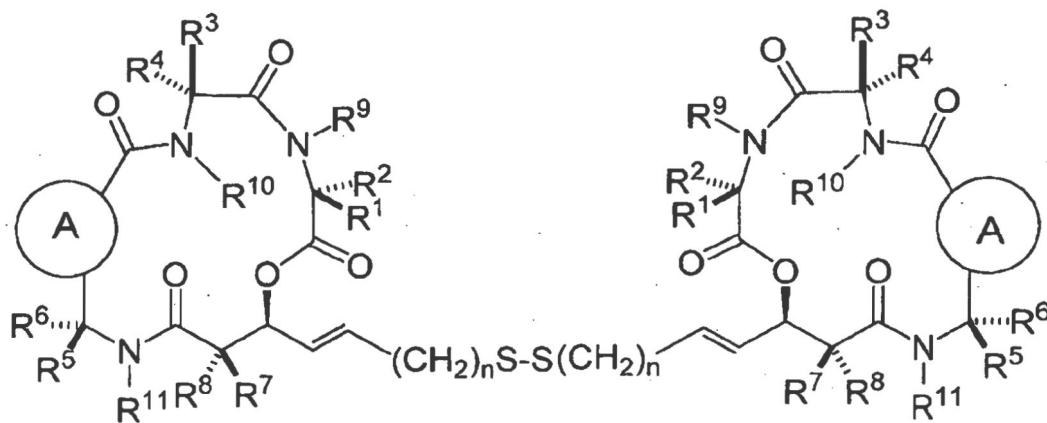
En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (IX)



IX

5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (X)



X

en donde A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y n son como se han descrito antes;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 En otro aspecto más, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de uno o más compuestos descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos par tratar enfermedades mediadas por enzimas HDAC, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos descritos en la presente memoria. Otros métodos implican coterapias administrando uno o más compuestos de la presente invención con otros agentes antineoplásicos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra una función potencial de la HAT y HDAC en la regulación transcripcional.

A) Modificación de histona por la HAT y HDAC.

B) La regulación de la expresión génica cambia por el complejo coactivador o corepresor. Figura y descripción adaptados de (Kim et al. 2003).

La figura 2 presenta varias realizaciones de los complejos de HDLP-TSA.

5 A) Representación de espacio lleno de TSA en el bolsillo del sitio activo. El grupo ácido hidroxámico, la mayor parte de la cadena alifática y parte del grupo dimetilaminofenilo de TSA están enterrados (60% del área superficial del TSA).

B) Representación esquemática de las interacciones de HDLP-TSA. Ambos paneles y la descripción parcial se adaptaron de (Finnin et al. 1999).

10 La figura 3 presenta un mecanismo propuesto de acción de HDAC dependientes de cinc.

La figura 4 ilustra una realización de un farmacóforo HDACi. Región terminal en la parte superior; conector en la parte inferior con el resto de unión al cinc. Figura y descripción adaptadas de (Newkirk et al. 2009).

Figura 5. Productos naturales depsipéptidos inhibidores de HDAC. Se muestra el dominio que contiene el tiol clave.

15 La figura 6 representa una posible activación del largazol y FK228 para llevar a cabo la inhibición de la HDAC. El largazol es un profármaco que tras la hidrólisis se convierte en el correspondiente tiol, que desactiva las HDAC por quelación del cinc fuera del sitio activo de la enzima. De una forma similar, la reducción del enlace disulfuro en FK228 libera el tiol que inhibe potencialmente las HDAC.

La figura 7 proporciona las estructuras del largazol, y varios análogos estructurales del largazol. El ejemplo 1 también se presenta como CGN 552.

20 La figura 8 presenta datos de ejemplo que muestran que el largazol, sus análogos seleccionados, y SAHA promueven la hiperacetilación de H3 en la línea de células de cáncer HCT 116.

25 a) Largazol (L) y SAHA inhiben la desacetilación de H3 de una forma dependiente del tiempo. Las células HCT116 se trataron con largazol 10 nM o SAHA 200 nM durante los tiempos indicados en el panel. Los extractos celulares se separaron por electroforesis SDS-PAGE y las bandas resultantes se detectaron usando anticuerpos anti-acetil-H3. Células tratadas con DMSO sirven como control negativo, mientras que se usó la expresión de GAPDH para mostrar igual carga.

30 b) Las células HCT116 responden al largazol, sus análogos selectivos y SAHA de una forma dependiente de la dosis. Las células se trataron con el compuesto indicado durante 8 horas con concentraciones en el intervalo de 1 µM a 100 nM y se llevó a cabo la inmunotransferencia con anticuerpo anti-acetilhistona H3. CGN-722, CGN-552 y CGN-596 son inhibidores de desacetilasa ligeramente más potentes que el largazol (L) y SAHA. La conversión del tioéster en cetona, (CGN- 363), vuelve al compuesto inactivo respecto a la inhibición de HDAC.

35 La figura 9 presenta datos de micromatrices de ADN que muestran que SAHA, largazol y su análogo seleccionado el ejemplo 1, producen distintos cambios en los perfiles de expresión de genes en la línea de células de cáncer HCT 116. a) Agrupación jerárquica y mapas de calor de los cambios en los perfiles de expresión génica en las células HCT116 con el tratamiento indicado. b) Diagramas de Venn que muestran los conjuntos de genes únicos y compartidos cuyos niveles de expresión cambiaban en más del doble tras la exposición al tratamiento indicado a las 6 h y 24 h.

La tabla 1 presenta la clasificación de las isoformas de HDAC. La clase I consiste en HDAC 1, 2, 3 y 8. La clase II consiste en HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10.

40 La tabla 2 presenta datos de ejemplo que muestran un efecto de largazol, análogos de largazol junto con compuestos de ejemplo de la presente invención en la inhibición del crecimiento de células de cáncer.

45 El análisis comparativo del efecto citotóxico del largazol en las líneas de células de cáncer humanas HCT116, SW480 y MDA-MB231. Se usó HME como control. Se cultivaron 8.000 células en placas de 96 pocillos donde las filas 1 y 10 se trataron con DMSO, la fila 2 no tenía células para establecer los niveles de fondo, las filas 3-9 contenían concentraciones decrecientes de compuesto. Las células se incubaron con largazol durante 48 horas, seguido de tinción con colorante cristal violeta. Se midió la absorbancia a 588 nm usando un lector de placa Tecan Saire II. Se llevaron a cabo experimentos en repeticiones de seis, y se generaron las curvas de concentración-respuesta por análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados de los datos usando GraphPad Prism (San Diego, CA). La inhibición del crecimiento (GI_{50}) para cada compuesto se definió como una concentración de fármaco que conducía a una reducción de 50% de la A588 comparado con los controles.

50 La tabla 3 muestra un resumen del número de genes cuyos niveles de expresión cambiaban en 2 veces tras el tratamiento con los productos químicos indicados en comparación con el DMSO. Se generaron ficheros de valores

de expresión para cada muestra usando el algoritmo Robust Multichip Average (RMA). La expresión diferencial se determinó usando usando el paquete de software R *limma* para generar modelos lineales y estadísticos Bayesianos empíricos. Los genes se consideraron expresados de forma diferencial si el P valor, ajustado para ensayo múltiple usando el método de Benjamini y Hochberg, era $\leq 5\%$ y el log-cambio de 2 veces era ≤ 1 o ≥ -1 .

5 Descripción detallada

La expresión "se sustituye por" como se usa en la presente memoria, se refiere al cambio de la administración de un primer compuesto o fármaco a un sujeto por un segundo compuesto o fármaco al sujeto. Por ejemplo, se puede sustituir un compuesto adictivo por extracto de Kratom, de modo que se administrará al sujeto extracto de Kratom en lugar del compuesto adictivo.

10 La expresión "con riesgo de" como se usa en la presente memoria, se refiere a una afección médica o conjunto de afecciones médicas que presenta un paciente que pueden predisponer al paciente a una enfermedad o dolencia. Por ejemplo, estas afecciones pueden ser resultado de influencias que incluyen, pero no se limitan a influencias conductuales, emocionales, químicas, bioquímicas o ambientales.

15 La expresión "cantidad eficaz" como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad particular de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico que logra un resultado clínicamente beneficioso (es decir, por ejemplo, una reducción de los síntomas). La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichas composiciones se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., determinando la DL_{50} (dosis letal para 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación de DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios adicionales en animales se pueden usar en la formulación de una variedad de dosis para uso humano. La dosis de dichos compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en la circulación que incluyen la DE_{50} con poca o sin toxicidad. La dosis varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica usada, sensibilidad del paciente y la vía de administración.

25 El término "síntoma", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier prueba subjetiva u objetiva de enfermedad o alteración física observada por el paciente. Por ejemplo, la prueba subjetiva se basa normalmente en la información que da el paciente y puede incluir, pero no se limita a dolor, cefalea, alteraciones visuales, náuseas y/o vómitos. Alternativamente, la prueba objetiva normalmente es un resultado de prueba médica que incluye, pero no se limita a la temperatura corporal, hemograma completo, pruebas de lípidos, pruebas tiroideas, presión sanguínea, frecuencia cardíaca, electrocardiograma, estudios por imágenes de tejidos y cuerpo y otros resultados de pruebas médicas.

30 El término "enfermedad", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier deterioro del estado normal del animal vivo o una de sus partes que interrumpe o modifica el funcionamiento de las funciones vitales. Típicamente puesto de manifiesto por señales y síntomas distintivos, normalmente es una respuesta a: a) factores ambientales (como malnutrición, peligros industriales o clima); ii) agentes infecciosos específicos (como lombrices, bacterias o virus); iii) defectos inherentes del organismo (como anomalías genéticas); y/o iv) combinaciones de estos factores.

35 Los términos "reduce", "inhibe", "atenúa", "suprime", "disminuye", "previene" y equivalentes gramaticales (incluyendo "inferior", "menor", etc.) cuando se usan en referencia a la expresión de cualquier síntoma en un sujeto no tratado con respecto a un sujeto tratado, significa que la cantidad y/o magnitud de los síntomas en el sujeto tratado es inferior que en el sujeto no tratado en cualquier cantidad que sea reconocida como clínicamente relevante por cualquier personal médico entrenado. En una realización, la cantidad y/o magnitud de los síntomas en el sujeto tratado es al menos 10% inferior que, al menos 25% inferior que, al menos 50% inferior que, al menos 75% inferior que y/o al menos 90% inferior que la cantidad y/o magnitud de los síntomas en el sujeto no tratado.

40 La expresión "compuesto inhibidor" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto capaz de interactuar con (es decir, por ejemplo, ligar, unir, etc.) una pareja de unión en condiciones tales que la pareja de unión se vuelva insensible a sus ligandos naturales. Los compuestos inhibidores pueden incluir, pero no se limitan a moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos, y proteínas/péptidos.

45 El término "ligado" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier interacción entre un medio (o vehículo) y un fármaco. El ligado puede ser reversible o irreversible. Dicho ligado incluye, pero no se limita a enlace covalente, enlace iónico, fuerzas de Van der Waals o fricción, y similares. Un fármaco está ligado a un medio (o vehículo) si está impregnado, incorporado, revestido, en suspensión con, en solución con, mezclado con, etc.

50 El término "fármaco" o "compuesto" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia farmacológicamente activa que puede ser administrada, que logra un efecto deseado. Los fármacos o compuestos pueden ser sintéticos o naturales, no peptídicos, proteínas o péptidos, oligonucleótidos o nucleótidos, polisacáridos o azúcares.

55 El término "administrado" o "administra", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier método para

proporcionar una composición a un paciente de modo que la composición tenga su efecto previsto en el paciente. Un método de ejemplo de administración es por un mecanismo directo tal como la administración local en tejido (es decir, por ejemplo, colocación extravascular), ingestión oral, parche transdérmico, tópico, inhalación, supositorio, etc.

5 El término "paciente", como se usa en la presente memoria, es un ser humano o animal y que no necesita ser hospitalizado. Por ejemplo, pacientes ambulatorios, personas en residencias asistidas son "pacientes". Un paciente puede comprender cualquier edad de un ser humano o animal no humano y por lo tanto incluye tanto adultos como jóvenes (es decir, niños). No se pretende que el término "paciente" implique la necesidad de tratamiento médico, por lo tanto, un paciente puede ser parte voluntaria o involuntariamente de experimentación sea de estudios clínicos o de apoyo de estudios científicos básicos.

10 El término "sujeto" como se usa en la presente memoria se refiere a un animal vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, todavía más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, sin limitación, seres humanos, primates, animales salvajes, animales no domesticados, animales deportivos y mascotas.

15 El término "afinidad" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier fuerza de atracción entre sustancias o partículas que hace que se combinen y permanezcan en combinación química. Por ejemplo, un compuesto inhibidor que tiene una afinidad alta por un receptor proporcionará mayor eficacia para prevenir que el receptor interacte con sus ligandos naturales, que un inhibidor con una afinidad baja.

20 La expresión "derivado de" como se usa en la presente memoria, se refiere a la fuente de un compuesto o secuencia. En otro sentido, un compuesto o secuencia puede derivar de un organismo o especie particular. En otro sentido, un compuesto o secuencia puede derivar de un complejo o secuencia mayor.

La expresión "compuesto de ensayo" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto o molécula considerada un candidato como un compuesto inhibidor.

25 El término "proteína" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquiera de numerosas sustancias naturales extremadamente complejas (como una enzima o anticuerpo) que consisten en restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, contienen los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, normalmente azufre. En general, una proteína comprende aminoácidos en un orden de magnitud dentro de las centenas.

30 El término "péptido" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquiera de diferentes amidas que derivan de dos o más aminoácidos por combinación del grupo amino de un ácido con el grupo carboxilo de otro, y normalmente se obtienen por hidrólisis parcial de proteínas. En general, un péptido comprende aminoácidos en un orden de magnitud de decenas.

La expresión "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones inconvenientes cuando se administran a un animal o un ser humano.

35 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, incluye todos y cada uno de los disolventes, o un medio de dispersión incluyendo, pero no limitado a agua, etanol, poliol, (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales, revestimientos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, liposomas, limpiadores disponibles en el comercio, y similares. También se pueden incorporar ingredientes bioactivos complementarios en dichos vehículos.

40 El término "purificado" o "aislado", como se usa en la presente memoria, se puede referir a una composición peptídica que se ha sometido a tratamiento (es decir, por ejemplo, fraccionamiento) para separar otros componentes diferentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada.

45 El término "muestra" como se usa en la presente memoria, se usa en su sentido más amplio e incluye muestras ambientales y biológicas. Las muestras ambientales incluyen material del entorno tal como suelo y agua. Las muestras biológicas pueden ser animales, incluyendo ser humano, fluidos (p. ej., sangre, plasma y suero), sólido (p. ej., heces), tejido, alimentos líquidos (p. ej., leche), y alimentos sólidos (p. ej., verduras). Por ejemplo, se puede recoger una muestra pulmonar por lavado broncoalveolar (LBA) que comprende fluido y células derivadas de tejidos pulmonares. Una muestra biológica puede comprender una célula, extracto tisular, fluido corporal, cromosomas o elementos extracromosómicos aislados de una célula, ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido tal como para análisis de transferencia Southern), ARN (en solución o unido a un soporte sólido tal como para análisis de transferencia Northern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido) y similares.

55 La expresión "biológicamente activo" se refiere a cualquier molécula que tenga funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas. Por ejemplo, la actividad biológica se puede determinar, por ejemplo, por restablecimiento de crecimiento de tipo natural en células que carecen de actividad de proteínas. Las células que carecen de actividad de proteínas se pueden producir por muchos métodos (es decir, por ejemplo, mutación puntual y mutación por desplazamiento de marco). La complementación se logra transfectando células que carecen de actividad de proteína con un vector de expresión que expresa la proteína, un derivado de la misma o una parte de la misma.

El término "marcador, o "marcador detectable", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Dichos marcadores incluyen biotina para teñir con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (p. ej., Dynabeads®), colorantes fluorescentes (p. ej., fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente, y similares), radiomarcadores (p. ej., ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas habitualmente en un análisis ELISA), y marcadores calorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (p. ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. n° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Los marcadores contemplados en la presente invención se pueden detectar por muchos métodos. Por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar luz emitida. Los marcadores enzimáticos típicamente se detectan proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción por acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores calorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

El término "conjugado", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto que se ha formado por la unión de dos o más restos.

Un "resto" o "grupo" es cualquier tipo de disposición molecular designada por fórmula, nombre químico o estructura. Dentro del contexto de algunas realizaciones, se dice que un conjugado comprende uno o más restos o grupos químicos. Esto significa que la fórmula del resto se sustituye en algún lugar con el fin de unirla y ser parte de la disposición molecular del conjugado. Aunque los restos se pueden unir directamente de forma covalente, no se pretende que la unión de dos o más restos deba ser directamente uno con otro. Un grupo conector, grupo de entrecruzamiento o grupo de unión se refiere a cualquier disposición molecular que conectará los restos por enlaces covalentes tales como, pero no se limitan a uno o más grupos amida que pueden conectar los restos. Además, aunque el conjugado puede no estar sustituido, el conjugado puede tener una variedad de sustituyentes adicionales conectados a los grupos conectores y/o conectados a los restos.

Un "polímero" o "grupo polímero" significa una especie o grupo químico compuesto de restos unidos de forma repetida. Dentro de algunas realizaciones, se prefiere que el número de restos que se repiten sea tres o más o mayor que 10. Los restos unidos pueden ser de estructura idéntica o pueden tener variación de la estructura del resto. Un "polímero monomérico" u "homopolímero" es un polímero que contiene la misma subunidad asimétrica que se repite. Un "copolímero" es un polímero que deriva de dos o más tipos de especies monoméricas, es decir, dos o más subunidades asimétricas químicas diferentes. "Copolímeros de bloques" son polímeros compuestos de dos o más especies de subunidades de polímero conectadas por enlaces covalentes.

El término "sustituido", como se usa en la presente memoria, significa que al menos un átomo de hidrógeno de una disposición molecular se sustituye por un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo ("=O"), se sustituyen dos átomos de hidrógeno. Cuando hay sustitución, uno o más de los siguientes grupos son "sustituyentes". Los sustituyentes incluyen, pero no se limitan a halógeno, hidroxilo, oxo, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, alquilo, alcoxi, alquiltio, halogenoalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclo y heterocicloalquilo, así como, -NRaRb, -NRaC(=O)Rb, -NRaC(=O)NRaNRb, -NRaC(=O)ORb, -NRaSO₂Rb, -C(=O)Ra, -C(=O)ORa, -C(=O)NRaRb, -OC(=O)NRaRb, -OR, -SR, -SORo, -S(=O)aR, -OS(=O)2Ra y -S(=O)ORa. Además, los sustituyentes anteriores pueden estar además sustituidos con uno o más de los sustituyentes anteriores, de modo que el sustituyente comprende un alquilo sustituido, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heterociclo sustituido o heterocicloalquilo sustituido. Ra y Rb en este contexto pueden ser iguales o diferentes, e independientemente, hidrógeno, alquilo, halogenoalquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido.

La expresión "no sustituido", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto que no contiene sustituyentes extra unidos al compuesto. Un compuesto no sustituido se refiere a la composición química del compuesto sin sustituyentes extra, p. ej., el compuesto no contiene grupo o grupos protectores. Por ejemplo, la prolina no sustituida es un aminoácido prolina incluso aunque el grupo amino de la prolina se puede considerar disustituido con grupos alquilo.

El término "alquilo, como se usa en la presente memoria, significa cualquier hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, insaturado o saturado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, mientras que la expresión "alquilo inferior" tiene el mismo significado que alquilo pero contiene de 1 a 6 átomos de carbono. La expresión "alquilo superior" tiene el mismo significado que alquilo pero contiene de 2 a 10 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen, pero no se limitan a isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo, y similares. Los alquilos cíclicos se pueden obtener juntando dos grupos alquilo unidos al mismo átomo de carbono o juntando dos grupos alquilo, cada uno unido a átomos adyacentes. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen, pero no se limitan a ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares. Los alquilos cíclicos también se denominan en la presente memoria "homociclos" o "anillos homocíclicos". Los alquilos insaturados contienen al menos un doble

- enlace o triple enlace entre átomos de carbono adyacentes (denominados un "alqueno" o "alquino", respectivamente). Los alquenos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen, pero no se limitan a etileno, propileno, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutileno, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares; mientras que los alquinos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen, pero no se limitan a acetileno, propino, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares.
- 5 El término "arilo", como se usa en la presente memoria, significa cualquier resto carbocíclico aromático tal como, pero no limitado a fenilo o naftilo.
- 10 El término "arilalquilo" o "aralquilo" como se usa en la presente memoria, significa cualquier alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno del alquilo sustituido por un resto arilo, tal como bencilo, pero no limitado a $-(CH_2)_2$ fenilo, $-(CH_2)_3$ fenilo, $-CH$ (fenilo)₂, y similares.
- El término "halógeno", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier resto fluoro, cloro, bromo o yodo.
- El término "halogenoalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier alquilo que tenga al menos un átomo de hidrógeno sustituido por halógeno, tal como trifluorometilo, y similares.
- 15 El término "heteroarilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier anillo de heterociclo aromático de 5 a 10 miembros y que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene al menos 1 átomo de carbono, que incluye, pero no se limita tanto a sistemas de anillos mono como bicíclicos. Los heteroarilos representativos incluyen, pero no se limitan a furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, pirrolilo, indolilo, isoindolilo, azaindolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isooxazolilo, benzoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo, o quinazolinilo.
- 20 El término "heteroarilalquilo", como se usa en la presente memoria, significa cualquier alquilo que tenga al menos un átomo de hidrógeno del alquilo sustituido por un resto heteroarilo, tal como $-CH$ piridinilo, CH_2 pirimidinilo, y similares.
- 25 El término "heterociclo" o "anillo heterocíclico", como se usa en la presente memoria, significa cualquier anillo heterocíclico monocíclico de 4 a 7 miembros, o bicíclico de 7 a 10 miembros, que es saturado, insaturado o aromático, y que contiene de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos, en los que cualquiera de los heterociclos anteriores están condensados con un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido por cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos pueden incluir heteroarilos ilustrados por los definidos anteriormente. Por lo tanto, además de los heteroarilos citados antes, los heterociclos pueden incluir, pero no se limitan a morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.
- 30 El término "heterocicloalquilo", como se usa en la presente memoria, significa cualquier alquilo que tenga al menos un átomo de hidrógeno del alquilo sustituido por un heterociclo, tal como $-CH_2$ morfolinilo, y similares.
- 35 El término "homociclo" o "cicloalquilo", como se usa en la presente memoria, significa cualquier anillo carbocíclico saturado o insaturado (pero no aromático) que contiene 3-7 átomos de carbono, tal como, pero no limitado a ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, ciclohexeno, y similares.
- 40 El término "alquilamino", como se usa en la presente memoria, significa al menos un resto alquilo unido por un puente de nitrógeno (es decir, $-N$ -(alquil) N , tal como dialquilamino) incluyendo, pero no limitado a metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, y similares.
- El término "alquiloxi" o "alcoxi", como se usa en la presente memoria, significa cualquier resto alquilo unido por un puente de oxígeno (es decir, $-O$ -alquilo) tal como, pero no limitado a metoxi, etoxi y similares.
- 45 El término "alquiltio", como se usa en la presente memoria, significa cualquier resto alquilo unido por un puente de azufre (es decir, $-S$ -alquilo), tal como, pero no limitado a metiltio, etiltio y similares.
- 50 El término "alqueno" significa una cadena de hidrocarburo no ramificada o ramificada que tiene uno o más dobles enlaces en la misma. El doble enlace de un grupo alqueno puede no estar conjugado o estar conjugado con otro grupo insaturado. Los grupos alqueno adecuados incluyen, pero no se limitan a vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo, 2-etilhexenilo, 2-propil-2-butenilo, 4-(2-metil-3-buten)-pentenilo. Un grupo alqueno puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o dos sustituyentes adecuados.
- El término "alquino" significa cadena de hidrocarburo no ramificada o ramificada que tiene uno o más triples enlaces en la misma. El triple enlace de un grupo alquino puede no estar conjugado o estar conjugado con otro grupo insaturado. Los grupos alquino adecuados incluyen, pero no se limitan a etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo,

hexinilo, metilpropinilo, 4-metil-1-butinilo, 4-propil-2-pentinilo y 4-butil-2-hexinilo. Un grupo alquinilo puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o dos sustituyentes adecuados.

El término "sales", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sal que forme complejo con compuestos identificados contenidos en la presente memoria. Los ejemplos de dichas sales incluye, pero no se limitan a sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (p. ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares), y sales formadas con ácidos orgánicos tales como, pero no limitado a ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico y ácido poligalacturónico. Los compuestos de sales también se pueden administrar como sales cuaternarias farmacéuticamente aceptables conocidas por un experto en la técnica, que incluyen específicamente las sales de amonio cuaternarias de fórmula $-NR,R',R''+Z^-$, en donde R, R', R'' son independientemente hidrógeno, alquilo o bencilo, y Z es un contraión, incluyendo, pero no limitado a cloruro, bromuro, yoduro, alcóxido, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato o carboxilato (tal como benzoato, succinato, acetato, glicolato, maleato, malato, fumarato, citrato, tartrato, ascorbato, cinamato, mandelato, y difenilacetato). Los compuestos de sales también se pueden administrar como sales de cationes de piridina farmacéuticamente aceptables que tienen una fórmula parcial sustituida o no sustituida: en donde Z es un contraión, incluyendo pero no limitado a cloruro, bromuro, yoduro, alcóxido, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato o carboxilato (tal como benzoato, succinato, acetato, glicolato, maleato, malato, fumarato, citrato, tartrato, ascorbato, cinamato, mandelato y difenilacetato).

Como se usa en la presente memoria, el término "profármaco" se refiere a un derivado de un compuesto que se puede hidrolizar, oxidar o reaccionar de otra forma en condiciones biológicas (in vitro o in vivo) para proporcionar un compuesto de la invención. Los profármacos pueden convertirse en activos solo tras alguna reacción en condiciones biológicas, pero pueden tener actividad en sus formas sin reaccionar. Los ejemplos de profármacos contemplados en la presente memoria incluyen, sin limitación, análogos o derivados de compuestos de la invención, y/o sus sales cuando la formación de sal es posible, pero en particular, derivados de resto tiol que se une al cinc. Los ejemplos de restos de profármacos incluyen restos éster de alquilo inferior ramificado o no ramificado, sustituido y no sustituido (p. ej., ésteres de ácido propiónico), ésteres de alqueno inferior, ésteres de di-(alquilo inferior-amino)-alquilo inferior (p. ej., éster de dimetilaminoetilo), ésteres de acilamino-alquilo inferior (p. ej., éster de acetiloximetilo), ésteres de aciloxi-alquilo inferior (p. ej., éster de pivaloiloximetilo), ésteres de arilo (éster de fenilo), ésteres de aril-alquilo inferior (p. ej., éster de bencilo), ésteres de heteroarilo (éster de nicotinato), ésteres de arilo sustituido (p. ej., con sustituyentes metilo, halógeno o metoxi)- y aril-alquilo inferior, amidas, (alquil inferior)-amidas, di(alquil inferior)amidas e hidroxiamidas. Los ésteres de aminoácidos naturales o sus enantiómeros, ésteres dipéptidos, ésteres fosfato, ésteres metoxifosfato, disulfuros y dímeros de disulfuro. Los profármacos y sus usos son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Berge et al., 1977). Los profármacos se pueden preparar típicamente usando métodos bien conocidos, tales como los descritos en Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (Manfred E. Wolff ed. 1995) y (Rautio, 2008).

Como se usa en la presente memoria, "grupos reactivos" se refiere a nucleófilos, electrófilos o grupos activos frente a radicales, es decir, grupos que reaccionan en presencia de radicales. Un nucleófilo es un resto que forma un enlace químico con su pareja de reacción (el electrófilo) donando ambos electrones de enlace. Los electrófilos aceptan esos electrones. Los nucleófilos pueden participar en la sustitución nucleófila, de modo que un nucleófilo es atraído a una carga positiva completa o parcial en un elemento y desplaza el grupo que está unido al mismo. Alternativamente, los nucleófilos pueden participar en la sustitución de grupo carbonilo. Con frecuencia los ácidos carboxílicos se hacen electrófilos creando ésteres de succinilo y haciendo reaccionar estos ésteres con aminoalquilos para formar amidas. Otros grupos nucleófilos comunes son tialquilos, hidroxialquilos, aminas primarias y secundarias y carbonos nucleófilos tales como enoles y complejos de alquil-metales. Otros métodos preferidos de proteínas ligadoras, oligosacáridos y células que usan grupos reactivos se describen en (Lemieux y Bertozzi 1998), incorporado en la presente memoria por referencia. En otro método preferido más, se proporcionan grupos reactivos para la unión de Staudinger, es decir, la "química click" con un resto que comprende azida y grupos reactivos alquinilo para formar triazoles. También se pueden usar adiciones de Michael de un carbono nucleófilo de enolato con un carbonilo electrófilo, o la formación de base de Schiff de una amina primaria o secundaria nucleófila con un aldehído o cetona. Se proporcionan otros métodos de bioconjugación en (Hang y Bertozzi 2001) y (Kiick et al. 2002).

El término "biocompatible", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier material que no provoque una respuesta perjudicial sustancial en el hospedante. Siempre hay la preocupación, cuando se introduce un objeto extraño en un cuerpo vivo, de que el objeto induzca una reacción inmunitaria, tal como una respuesta inflamatoria que tendrá efectos negativos en el hospedante. En el contexto de esta invención, la biocompatibilidad se evalúa de acuerdo con la aplicación para la que se diseñó: por ejemplo, un vendaje se considera biocompatible con la piel, mientras que un dispositivo médico implantado se considera biocompatible con los tejidos internos del cuerpo. Preferiblemente, los materiales biocompatibles incluyen, pero no se limitan a materiales biodegradables y bioestables. No se ha producido una respuesta perjudicial sustancial si un implante que comprende el material está asociado cerca de su implante dentro del animal hospedante y la respuesta es mejor que una respuesta del tejido reconocida y establecida como adecuada a partir de materiales proporcionados en un ASTM. El subcomité de ASTM F04.16 sobre Métodos de ensayo de biocompatibilidad ha desarrollado estándares de biocompatibilidad para

materiales y dispositivos médicos y quirúrgicos. Por ejemplo, los materiales que se van a usar en contacto con la corriente sanguínea deben estar compuestos de materiales que cumplan los estándares de hemocompatibilidad. Uno de estos ensayos es para el daño a los glóbulos rojos, que puede dar como resultado hemólisis, es decir rotura de las células, como se describe en F 756 *Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*.

5 Como se usa en la presente memoria, una “sustancia bioactiva” se refiere a cualquiera de una variedad de restos químicos y que se une con una biomolécula tal como, pero no limitado a péptidos, proteínas, enzimas, receptores, sustratos, lípidos, anticuerpos, antígenos y ácidos nucleicos. En algunas realizaciones preferidas, la sustancia bioactiva es una biomolécula, pero no se pretende que la sustancia bioactiva está limitada a biomoléculas. En otras realizaciones preferidas, las sustancias bioactivas proporcionan interacciones hidrófobas, hidrófilas o electrostáticas, tales como poli(ácidos carboxílicos) que son aniónicos a pH fisiológico. En otra realización preferida, los factores de crecimiento alcalinos (con punto isoeléctrico superior a 7) son retenidos por interacciones electrostáticas favorables por los policarboxilatos y posteriormente liberados en una forma controlada y sostenida.

15 “Cáncer” es un término usado para enfermedades en la que células anómalas se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos. Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer. La mayoría de los cánceres se denominan por el órgano o tipo de célula en el que empiezan, por ejemplo, el cáncer que empieza en el colon se llama cáncer de colon; el cáncer que empieza en células basales de la piel se llama carcinoma de células basales. Las principales categorías de cáncer incluyen carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas y mielomas, y cánceres del sistema nervioso central. Algunos tipos comunes de cáncer incluyen, pero no se limitan a cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon y rectal, cáncer de riñón (célula renal), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de piel (no melanoma) y cáncer de tiroides. En una realización, los cánceres contemplados para el tratamiento en la presente memoria incluyen cánceres de colon y mama.

Los términos “comprende”, “que comprende”, se pretende que tengan el significado amplio y pueden significar “incluye”, “que incluye” y similares.

25 Realizaciones de la invención

En enero o alrededor de enero de 2008, se aisló el largazol de una cianobacteria del género *Symploca*, y se nombró por su localización en Cayo Largo (Luesch et al, University of Florida). El compuesto demuestra actividad antiproliferativa en la línea de células epiteliales mamarias transformadas MDA-MB23 con una GI₅₀ de 7,7 nM (Taori et al. 2008). Además, el largazol se dirige con preferencia a las células diana frente a las células normales, lo que hace de esta sustancia marina un objetivo sintético importante así como un producto quimioterapéutico potencialmente valioso para el cáncer (Taori et al. 2008). La primer síntesis descrita del largazol la completaron Luesch y colaboradores (Ying et al. 2008b), seguido del grupo de Phillips (Nasveschuk et al. 2008), el grupo de Cramer (Seiser et al. 2008), el grupo de Williams (Bowers et al. 2008), y el grupo de Ghosh (Ghosh y Kulkarni 2008). La base molecular para esta actividad antineoplásica se ha sugerido que es la inhibición de las histona deacetilasas (HDAC) (Ying et al. 2008b).

Se ha sugerido que los inhibidores de la HDAC son una nueva clase de potentes agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores malignos sólidos y hematológicos. Los inhibidores actuales de las HDAC, tales como el butirato sódico, tricostatina A (TSA), ácido hidroxámico-suberoilánilida (SAHA), FK228 y otros, pueden presentar su efecto antitumoral por la regulación de genes y sus productos proteínas que son necesarios para detener el ciclo celular, reparar el ADN dañado, depuración de radicales libres y apoptosis (Marks 2010). Por ejemplo, SAHA se ha aprobado para el tratamiento de linfoma de linfocitos T cutáneo avanzado (Marks 2007). Varios otros inhibidores de HDAC están actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (Marks 2010).

La estructura del largazol comprende un macrociclo de 16 miembros que contiene una 4-metiltiazolina condensada con un anillo de tiazol y una cadena lateral de tioéster octanoico, una unidad que raramente se encuentra en productos naturales (Taori et al. 2008; Newkirk et al. 2009). Se ha postulado que es la parte macrocíclica del compuesto la que interacciona con la superficie de la proteína HDAC, mientras que la cadena lateral queda insertada en el sitio activo de la HDAC y forma quelato con el cinc, produciendo la terminación de la desacetilación del sustrato (Newkirk et al. 2009). (Figura 4).

Para definir mejor el farmacóforo largazol, es lógico pensar que tras su entrada en el citoplasma de la célula, el resto tioéster se hidroliza rápidamente para producir el grupo tiol libre, que ahora puede interaccionar con el ion de cinc en el fondo del bolsillo de la HDAC e inhibir potencialmente la actividad enzimática. (Figura 6).

Para validar que el tiol del largazol es la especie reactiva, varios grupos sintetizaron un derivado de tiol y evaluaron la potencia bioquímica en la inhibición del crecimiento de células tumorales y en ensayos de inhibición de HDAC celulares o in vitro. Estos descubrimientos indican que al análogo de tiol tiene inhibición de HDAC similar usando extractos celulares tratados con compuesto (Bowers et al. 2008; Ying et al. 2008a; Ying et al. 2008b). En los experimentos in vivo, donde las células son tratadas con largazol o tiol de largazol, la molécula original tiene una potencial mayor con respecto a la inhibición de HDAC (CI₅₀ 51 nM frente a 209 nM para el metabolito tiol) (Ying et al. 2008a).

Con respecto a la actividad antiproliferativa, dos grupos presentaron conjuntos de datos contradictorios: Ying et al. muestran que el largazol y el análogo de tiol presentan actividad de anticrecimiento similar en células HCT116 con valores de GI_{50} de 44 y 38 nM, respectivamente (Ying et al. 2008b). El grupo de William usó una serie de líneas de células de melanoma para demostrar que el largazol tiene una potencia constante superior (CI_{50} 45-315 nM) comparado con su metabolito tiol (CI_{50} 380-2600 nM). Atribuyeron la diferencia de citotoxicidad a la permeabilidad superior del largazol tioéster (Bowers et al. 2008). Para medir la actividad de desacetilasa in vitro, se incubaron proteínas HDAC de longitud entera purificadas de clase I y clase II, con sustrato conjugado con fluoróforo y largazol o tiol de largazol. Los resultados no solo muestran que el propio largazol es un inhibidor de HDAC mucho más débil comparado con la versión reducida, sino que también indican una preferencia pronunciada del largazol por las HDAC 1, 2 y 3 frente a la HDAC6 (Bowers et al. 2008). Para explicar la falta de diferencia en los ensayos basados en células, es posible que el tioéster sea escindido en condiciones experimentales.

Además, puesto que los hidroxilos no forman quelato con el cinc, una sustitución de -SH por -OH impedía el efecto tóxico así como la actividad inhibidora en el ensayo de las HDAC (Bowers et al. 2008); (Ying et al. 2008a). Considerado todo junto, el tiol es indispensable para ambas actividades; por lo tanto, se puede especular que la inhibición de la HDAC promueve su efecto antitumoral. Desde un punto de vista de la biosíntesis, la naturaleza producía largazol como un profármaco más que como una especie reactiva diana para aumentar su estabilidad y protegerla de la oxidación no deseada (Ying et al. 2008b). Es interesante que se haya observado un mecanismo análogo de protección y liberación en una sustancia natural, FK228 (Shigematsu et al. 1994), (Ueda et al. 1994a; Ueda et al. 1994b). El compuesto cíclico característico contiene un enlace disulfuro, que tras la hidrólisis por la glutatión reductasa al butenil-tiol se extiende hacia el resto de cinc para terminar la actividad de la HDAC (Figura 6; y (Furumai et al. 2002)).

Se preparó una serie de análogos para ensayar la longitud óptima de la cadena de octanoilo puesto que es el conector que es insertado en el bolsillo de la HDAC para formar quelato con el cinc, lo que produce la atenuación de la actividad biológica de la HDAC. Se cree que el largazol así como el FK228 incorporan un conector de cuatro átomos entre el macrociclo y el grupo que se une al cinc. Un macrociclo que carece de la cadena de octanoilo entera o no puede inhibir las HDAC o no tiene ninguna actividad tóxica en las células, lo que además prueba la importancia del grupo tiol en la función del largazol como un inhibidor de HDAC. Ni el acortamiento ni el alargamiento de la cadena alifática es una modificación estructural ventajosa cuando se mide por ensayos de la HDAC in vivo e in vitro, así como por ensayo de viabilidad celular contra la línea de células de cáncer de colon HCT116 (tabla 2). Estos resultados sugieren que la longitud natural de la cola del largazol es óptima (Ying et al. 2008a; Ying et al. 2008b; Newkirk et al. 2009). Además, se investigaron dos cambios dentro de la región terminal y los describieron Leusch y colaboradores: una sustitución de valina por alanina y un epímero del largazol (17R) (Ying et al. 2008a). El compuesto Val-,Ala mostró una disminución del doble de las actividades inhibitoras cuando se comparó con el largazol, indicando que el resto de valina se puede intercambiar fácilmente. Un análogo epímero se comportó mal como un inhibidor de HDAC, aludiendo a la importancia de la configuración S en la posición C17 (Ying et al. 2008a). Recientemente, han llevado a cabo más estudios de relación de estructura y actividad del largazol Zeng et al (Zeng et al. 2010), donde sustituyeron la valina por leucina y fenilalanina y observaron que la actividad inhibidora contra varias líneas de células de cáncer era ligeramente menor (p. ej., GI_{50} para el largazol era 80 nM mientras que se midió 560 nM y 260 nM para la Leu 1 y Phe 1 respectivamente en células HCT 116). Es interesante que cuando la valina se cambió por tirosina, lo que dio como resultado la disminución de la potencia contra células de cáncer, aumentó mucho la GI_{50} para células normales, mejorando mucho la ventana terapéutica (HCT-116: GI_{50} 0,39 μ M; A549: GI_{50} 1,46 μ M) frente a las líneas de células normales (HEK293: GI_{50} 100 μ M; HLF: GI_{50} 100 μ M, mientras que la GI_{50} del largazol en HEK293 es 1,36 μ M y 0,98 μ M en células HLF). Por lo tanto, se sugirió que poniendo Tyr en el largazol se podría forzar al compuesto a optar por las HDAC en células de cáncer en lugar de células normales (Zeng et al. 2010).

Por consiguiente, los inhibidores macrocíclicos de HDAC tales como el largazol muestran potencial como una herramienta para estudiar la biología de las HDAC mientras que al mismo tiempo, debido a la preferencia del largazol por matar células de cáncer frente a células normales, es muy prometedor como un producto terapéutico para el cáncer (es decir, comprende una gran ventana terapéutica). El atractivo del largazol también reside en el hecho de que es muy selectivo hacia la clase I de desacetilasas, una característica que raramente se encuentra en inhibidores de HDAC.

En una realización, la presente invención contempla un método para mejorar la relación estructura-actividad del largazol creando análogos del largazol y evaluando sus efectos antiproliferativos en líneas de células de cáncer de colon y mana.

En una realización, la presente invención proporciona métodos para cribar compuestos de la presente invención para determinar sus efectos de inhibición en el crecimiento de células de cáncer.

En otra realización, la presente invención proporciona métodos para aumentar la potencia y selectividad del largazol creando una cadena principal de macrociclo de 16 miembros.

En otra realización más, la presente invención proporciona análogos nuevos de largazol, rompiendo el anillo de la 4-metiltiazolina que da como resultado la mejora de la especificidad de los efectos antitumorales, por ejemplo, se

demonstró un efecto antitumoral in vivo de los análogos nuevos de una eficacia comparable a los compuestos donde el anillo de 4-metiliazolona no está roto, aunque el número de genes en los que influye el nuevo análogo es solo 1/3 de lo que ha cambiado con el tratamiento de largazol a las 24 h. Esta observación sugiere que los nuevos análogos son distintos del largazol y probablemente tienen menos efectos secundarios.

- 5 En otra realización más, se sustituyó la valina de la molécula de largazol dentro del macrociclo por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, leucina e isoleucina.

En otra realización más, la sustitución de una valina por una glicina mejoró la eficacia del compuesto derivado en 3 veces.

- 10 En otra realización más de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, además de uno o más compuestos descritos en la presente memoria, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede tener cualquier forma adecuada para la ruta de administración deseada. Cuando la composición se va a administrar por vía oral, se puede usar cualquier forma farmacéutica adecuada que se pueda suministrar por vía oral, incluyendo sin limitación comprimidos, cápsulas (cargadas con sólido o líquido), polvos, gránulos, jarabes y otros líquidos, elixires, inhalantes, pastillas para chupar, pastillas y soluciones. También se proporcionan composiciones inyectables o infusiones i.v. en forma de soluciones, suspensiones y emulsiones.

- 15 En otra realización más, una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, para aumentar la eficacia o disminuir los efectos secundarios. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica contiene además uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de ingredientes activos útiles para tratar o inhibir una enfermedad mediada directa o indirectamente por HDAC. Los ejemplos de dichos principios activos son, sin limitación, agentes para tratar o inhibir el cáncer, enfermedad de Huntington, fibrosis quística, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis dérmica, artritis reumatoide, diabetes o insuficiencia cardíaca.

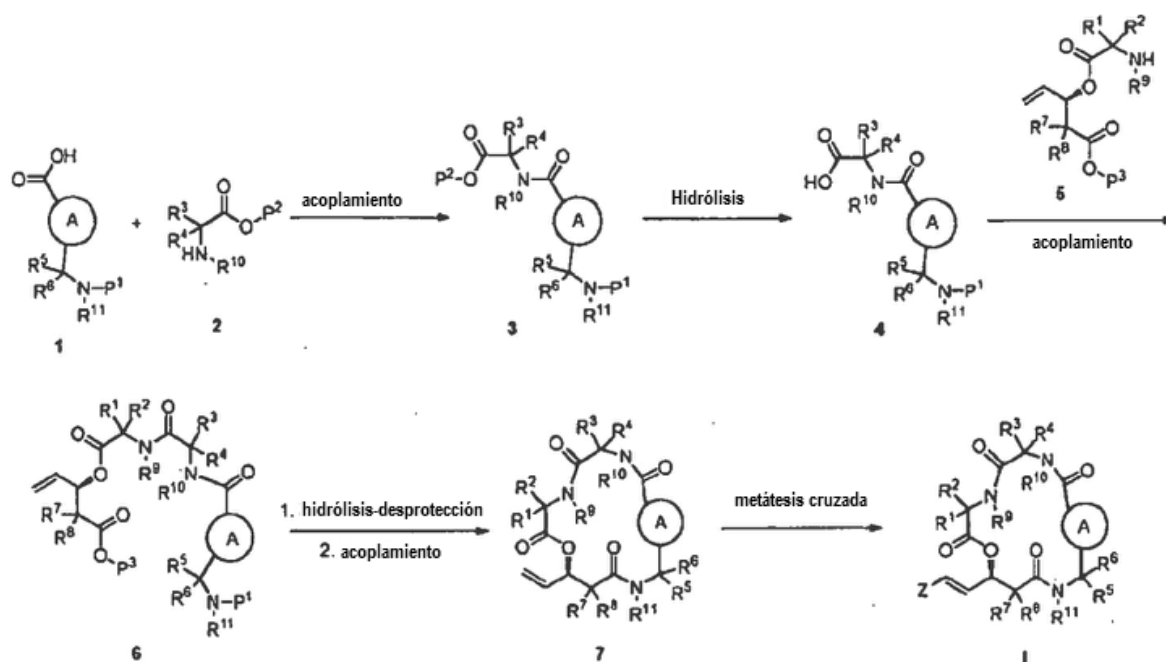
- 20 En otra realización más, un agente terapéutico adicional para incluir es un agente antineoplásico. Los ejemplos de un agente antineoplásico incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, dacarbazina y cisplatino; antimetabolitos tales como metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, fluoracilo y citarabina; alcaloides de plantas tales como vinblastina y paclitaxel; antibióticos antitumorales tales como doxorubicina, bleomicina y mitomicina; hormonas/antihormonas tales como prednisona, tamoxifeno y flutamida; otros tipos de agentes antineoplásicos tales como asparaginasa, rituximab, trastuzumab, imatinib, ácido retinoico y derivados, factores estimuladores de colonia, amifostina, camptotecina, topotecán, análogos de talidomida tales como lenalidomida, inhibidores de CDK, inhibidores de proteasoma tales como Velcade y otros inhibidores de HDAC.

- 25 En otra realización más, la presente invención proporciona un método de inhibición o tratamiento de enfermedades que surgen de la proliferación celular y/o diferenciación anómala en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención. En una realización, el método de inhibición o tratamiento de la enfermedad comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición que se va a administrar puede contener además un agente terapéutico como un agente antineoplásico.

Compuesto de la invención

- 40 Los compuestos de la invención se definen en la presente memoria por sus estructuras químicas y/o nombres químicos. Los compuestos de la invención en general se nombran de acuerdo con el sistema de nomenclatura IUPAC o CAS. Se pueden usar abreviaturas que son bien conocidas por el experto en la técnica. Cuando se hace referencia a un compuesto tanto por la estructura química como por un nombre químico y están en conflicto la estructura química y el nombre químico, la estructura química es la que determina la identidad del compuesto.

- 45 Los compuestos de fórmula I de la presente invención se sintetizan de acuerdo con el esquema genérico, esquema I:



Esquema I

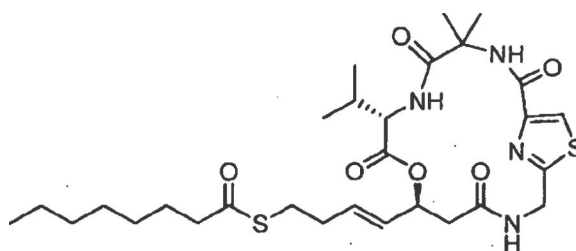
Los compuestos intermedios ácidos arílicos o heteroarílicos de fórmula general 1 y los compuestos intermedios aminas de fórmula general 2 se pueden sintetizar por métodos bien conocidos disponibles en la técnica o disponibles en el comercio (Sigma-Aldrich; Advanced Chem Tech; Pep tech; Synthatech). El acoplamiento de ácidos de fórmula 1 y aminas de fórmula 2 proporciona amidas de fórmula 3, por métodos de acoplamiento conocidos que usan reactivos adecuados tales como EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) o HATU (hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio). La hidrólisis de los ésteres de fórmula 3 proporciona los ácidos de fórmula 4, que a su vez se pueden acoplar con aminas de fórmula 5 para dar compuestos de fórmula 6. Los ejemplos de agentes de acoplamiento son EDCI (1-metil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) o HATU (hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio). La hidrólisis y eliminación del grupo protector de amina de los compuestos de fórmula 6, seguido de la macrociclación, proporcionan macrocyclicas de fórmula general 7. La macrociclación se puede lograr haciendo reaccionar los aminoácidos protegidos de compuestos de fórmula 6 con diisopropiletilamina, HATU (hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en un disolvente tal como tetrahidrofurano. La reacción de metátesis cruzada de olefinas de los compuestos de fórmula 7 los convierte en los compuestos de fórmula I de la presente invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo para fines ilustrativos.

Ejemplo 1

20 Octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo



25 Etapa 1: Preparación de 2-(2-((terc-butoxicarbonilamino)metil)tiazol-4-carboxamido)-2-metilpropanoato de metilo: En un matraz de fondo redondo con 50 ml de cloruro de metileno se añadió ácido 2-((terc-butoxicarbonilamino)metil)tiazol-4-carboxílico (2,0 g, 7,74 mmol) y sal de hidrocloreuro del 2-amino-2-metilpropanoato de metilo (1,25 g, 8,13 mmol). A la mezcla se añadió después trietilamina (5,4 ml, 38,7 mmol) seguido de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,97 g, 15,5 mmol) e hidroxibenzotriazol (2,09 g, 15,5 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después la mezcla se diluyó con cloruro de metileno. La mezcla

después se lavó con agua y la capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno. Las capas orgánicas combinadas después se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con EtOAc/hexano 1:1 para proporcionar el producto deseado (2,40 g, 87% de rendimiento).

5 Etapa 2: Preparación de ácido 2-(2-((terc-butoxicarbonilamino)metil)tiazol-4-carboxamido)-2-metilpropanoico: Se disolvió 2-(2-((terc-butoxicarbonilamino)metil)tiazol-4-carboxamido)-2-metilpropanoato de metilo (2,4 g, 6,7 mmol) en 10 ml de metanol y 3 ml de agua. Después se añadió a la mezcla hidróxido de litio monohidrato (0,56 g, 13,4 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que la TLC indicaba el consumo completo del material de partida. A la mezcla se añadieron agua y EtOAc, y la capa acuosa se acidificó con HCl 2 N a aproximadamente pH 7. Las
10 capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido blanco (2,3 g, rendimiento cuantitativo).

Etapa 3: Preparación de (3S)-3-(((2S)-2-(2-[[2-((terc-butoxi)carbonil]amino)metil]-1,3-tiazol-4-il]formamido)-2-metilpropanamido)-3-metilbutanoil]oxi)pent-4-enoato de terc-butilo: A una disolución de ácido 2-(2-((terc-butoxicarbonilamino)metil)tiazol-4-carboxamido)-2-metilpropanoico (1,26 g, 3,67 mmol) en 10 ml de dimetilformamida se añadió HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio) (1,67 g, 4,40 mmol) y diisopropiletilamina (2,0 ml, 11,0 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió (S)-3-((S)-2-amino-3-metilbutanoiloxi)pent-4-enoato de terc-butilo (1,0 g, 3,67 mmol) y la
15 mezcla resultante se agitó durante la noche. Se añadieron agua y EtOAc y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo con EtOAc, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. Se purificó por cromatografía en columna, eluida con Hex/EtOAc 1:1 para dar el producto deseado (2,1 g, 96% de rendimiento).
20

Etapa 4: Preparación de (7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-10-vinil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona: Una solución de (7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-10-vinil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona (200 mg, 0,33 mmol) en 10 ml de cloruro de metileno se enfrió a 0°C. A la mezcla se añadieron 10 ml de ácido trifluoroacético. La mezcla se agitó a 0°C durante 1,5 horas. La mezcla se concentró y se destiló azeotrópicamente tres veces con tolueno y una vez con tetrahidrofurano para dar la amina-ácido. En un segundo matraz de fondo redondo se puso HATU (381 mg, 1,0 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,51 ml, 2,85 mmol) en 70 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se enfrió a 0°C. Después se añadió la solución de la amina-ácida bruta anterior en 14 ml de tetrahidrofurano a lo
25 largo de 8 horas mediante una bomba de jeringa. Después la mezcla de reacción se agitó durante la noche en una cámara frigorífica a 4°C. Después se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción después se inactivó con agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, se eluyó con EtOAc para dar el producto deseado. Se purificó además por cromatografía en fase inversa,
30 eluida con agua/ CH_3CN al 0-100% para dar el producto deseado (45 mg, 32% de rendimiento).
35

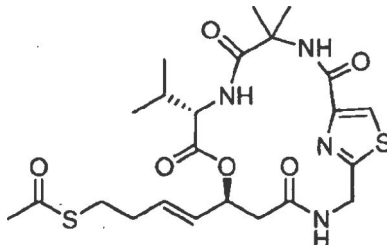
Etapa 5: Preparación de (7S,10S)-10-((E)-4-bromobut-1-enil)-7-isopropil-4,4-dimetil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona: A una mezcla de (7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-10-vinil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona (20 mg, 0,047 mmol) en 2 ml de 1,2-dicloroetano se añadió 4-bromo-1-buteno (25,6 mg, 0,19 mmol) y catalizador Zhan-1 (3,2 mg, 0,0047 mmol). La mezcla se desgasificó brevemente y después se calentó en un tubo sellado a 85°C durante la noche. El producto bruto se concentró y se pasó por un tapón de gel de sílice para dar una mezcla del producto deseado y material de partida recuperado (relación 2:1). Se purificó además por cromatografía de fase inversa, eluida con agua/ CH_3CN al 0-80% para dar el producto deseado (8 mg, 32% de rendimiento).
40

Etapa 6: Preparación de octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo: A una mezcla de (7S,10S)-10-((E)-4-bromobut-1-enil)-7-isopropil-4,4-dimetil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona (15 mg, 0,028 mmol) en 1 ml de acetona a temperatura ambiente, se añadió K_2CO_3 (16 mg, 0,12 mmol) y ácido S-octanotioico (14 mg, 0,085 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se evaporó. La mezcla bruta se pasó por un tapón de gel de sílice. Se purificó más por cromatografía en fase inversa, eluida con agua/ CH_3CN al 0-90% para dar el producto deseado (4 mg, 23% de rendimiento). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 8,02 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 6,47 (d, J = 10,85 Hz, 1H), 6,33 (dd, J = 8,65, 4,50 Hz, 1H), 5,83~5,67 (m, 2H), 5,64~5,56 (m, 1H), 5,18 (dd, J = 17,31, 8,22 Hz, 1H), 4,64 (dd, J = 9,87, 3,97 Hz, 1H), 4,37 (dd, J = 17,21, 4,01 Hz, 1H), 2,87 (t, J=7,2 Hz, 2H), 2,81~2,61 (m, 2H), 2,51 (t, J=7,5 Hz, 2H), 2,30 (m, 3H), 1,90 (s, 3H), 1,59 (m, 2H), 1,57 (s, 3H), 1,27 (m, 8H), 0,88 (m, 5 H), 0,69 (d, J=6,82 Hz, 3H).
45
50

55 Ruta alternativa para la preparación de octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo: A una mezcla de (7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-10-vinil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona (32,5 mg, 0,077 mmol, preparada en la etapa 4) y octanotioato de S-but-3-enilo (33 mg, 0,15 mmol) en 1 ml de dicloroetano se añadió catalizador Grela (5 mg, 0,077 mmol). La mezcla se purgó con Argón durante unos pocos minutos y se calentó a 85°C durante 2 horas. Se añadieron octanotioato (16,5 mg, 0,077 mmol) y catalizador Grela
60

(5 mg, 0,077 mmol) adicionales. Se agitó durante dos horas más. El disolvente se evaporó y la mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice para dar el producto deseado (21,3 mg, 46%). MS (ESI) $[M+Na]^+$ = 631,3.

Ejemplo 2: Etanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo.

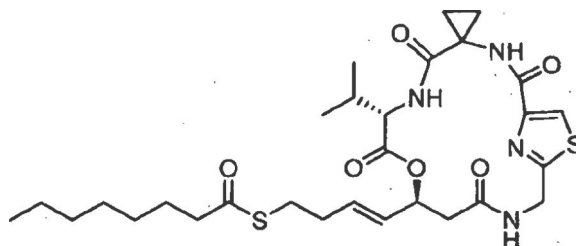


5

A una mezcla de (7S,10S)-10-((E)-4-bromobut-1-enil)-7-isopropil-4,4-dimetil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona (20 mg, 0,038 mmol) (preparada en la etapa 5 del ejemplo 1) en 0,5 ml de acetona a temperatura ambiente, se añadió K_2CO_3 (10,5 mg, 0,08 mmol) y ácido tioacético (6 mg, 0,08 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se evaporó. La mezcla bruta se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluida con EtOAc, después MeOH en EtOAc al 10% para dar el producto deseado (19 mg, 96% de rendimiento). MS (ESI) $[M+Na]^+$ = 547,2

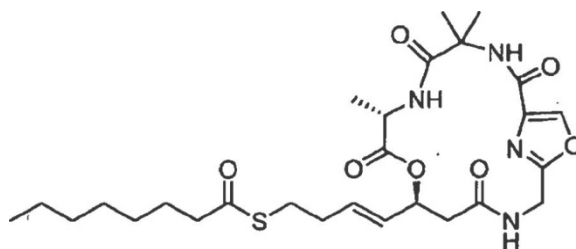
10

Ejemplo 3: Octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetrazaespiro[bicyclo[13.2.1]octadeca[1(17),15(18)]dieno-4,1'-ciclopropano]-10-il)but-3-enilo.



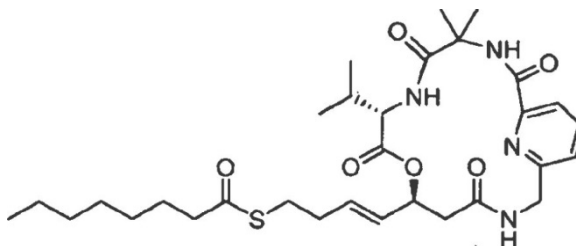
15 Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1 usando los materiales de partida adecuados. MS (ESI) $[M+Na]^+$ = 629,2

Ejemplo 4: Octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-4,4,7-trimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9,16-dioxa-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo.



20 Este se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1 usando los materiales de partida adecuados. MS (ESI) $[M+Na]^+$ = 587,3

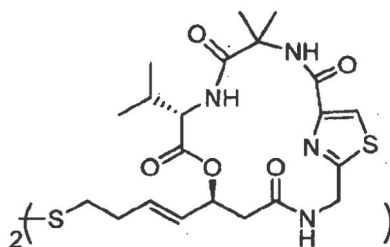
Ejemplo 5: (7S,10S)-4,4-dimetil-10-[(1E)-4-(octanoilsulfanil)but-1-en-1-il]-7-(propan-2-il)-9-oxa-3,6,13,19-tetraazabicyclo[13.3.1]nonadeca-1(18),15(19),16-trieno-2,5,8,12-tetraona.



25 Este se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1 usando los materiales de partida adecuados. MS

(ESI) $[M+Na]^{+} = 625,3$

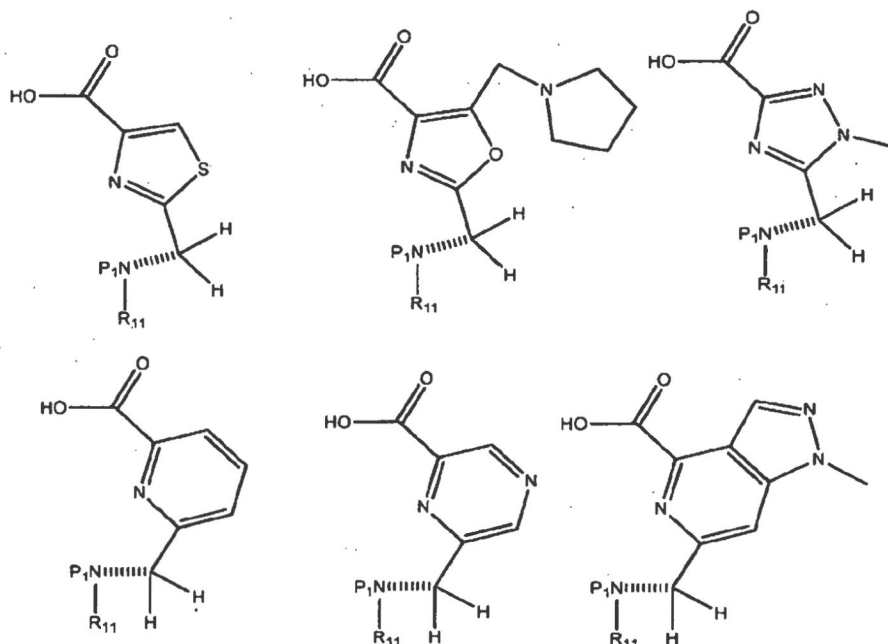
Ejemplo 6: Dímero (7S,10S)-7-isopropil-10-((E)-4-(((E)-4-((7R,10R)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enil)disulfanil)but-1-enil)-4,4-dimetil-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dieno-2,5,8,12-tetraona.



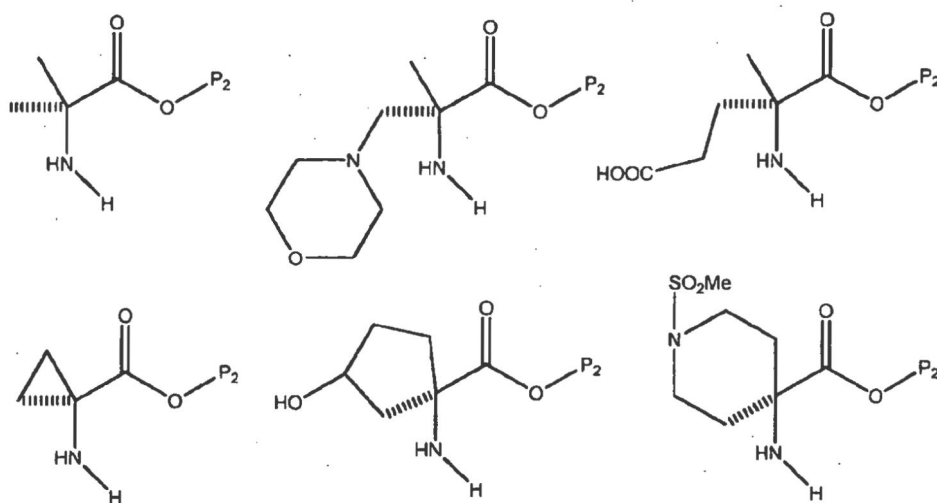
5

A una solución de octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo (10 mg, 0,016 mmol) en 2 ml de CH_3CN se añadió NH_3 acuoso (28,9%, 0,2 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después se añadieron 0,2 ml de amoníaco acuoso adicional, y la reacción se agitó durante un día. Se añadieron 0,2 ml adicionales de amoníaco acuoso y la mezcla resultante se agitó durante la noche. Se añadieron otros 0,1 ml de NH_3 acuoso y se agitó durante 6 horas. Se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluida con EtOAc/MeOH (10/1). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron. Se volvió a purificar por cromatografía de fase inversa, elución con gradiente con CH_3CN /agua al 0-80% para dar el producto deseado (6,5 mg, 82%). MS (ESI) $[M+Na]^{+} = 985,3$.

15 A continuación hay unos ejemplos no limitantes de compuestos de fórmula 1 del esquema I:



A continuación hay unos ejemplos no limitantes de los compuestos de fórmula 2 del esquema I:



Ejemplo 7: Cultivo celular

Las líneas celulares SW480, HCT116 y MDA-MB231 se adquirieron en la American Tissue Culture Collection. Las células SW480 y MDA-MB231 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero de ternero fetal al 10% a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. La línea celular HCT116 se cultivó en un medio McCoy 5a [ATCC; n° de cat. 30-2007] con L-glutamina 1,5 mM y suero bovino fetal al 10% [ATCC; n° de cat. 30-2020]. Las células HME (Clonetics, San Diego, CA; donante 4144) se cultivaron exentas de suero en medio recomendado por Clonetics y complementos (extracto de pituitaria bovina 52 µg/ml, hidrocortisona 0,5 µg/ml, factor de crecimiento epidérmico humano 0,01 µg/ml, insulina 5 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml y anfotericina-B 50 ng/ml).

10 Ejemplo 8: Ensayo de viabilidad celular

Se cultivaron 8.000 células de diferentes cánceres en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. (Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control de fondo que carecían de células pero contenían el mismo volumen de medio). 24 horas después de la siembra, se añadió medio nuevo. Para evaluar la citotoxicidad in vitro, cada compuesto se disolvió en DMSO y se preparó inmediatamente antes de los experimentos y se diluyó en medio completo antes de la adición a los cultivos celulares. Después, se añadieron los compuestos de ensayo al medio de cultivo para las concentraciones decrecientes designadas (de 600 nM a 10 nM). La viabilidad celular se determinó 48 horas después usando colorante cristal violeta (Sigma-Aldrich), que se solubilizó en etanol y se midió la absorbancia a 588 nm usando un lector de placa Tecan Saire II. Los experimentos se llevaron a cabo en repeticiones de seis, y se generaron las curvas de concentración-respuesta por análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados de los datos usando GraphPad Prism (San Diego, CA). La inhibición del crecimiento (GI₅₀) para cada compuesto se definió como una concentración de fármaco que llevaba a una reducción de 50% de la A588 comparado con los controles.

Ejemplo 9: Transferencia Western

Para el análisis por transferencia Western, se prepararon extractos de proteína total mediante la lisis de células en tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM [pH 8,0], EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, SDS al 0,1%, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). Se separaron 50 µg de proteínas solubles totales por SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y la membrana se bloqueó durante 1 hora con leche desnatada al 4%, seguido de incubación durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios contra la histona acetilada H3 (1:1000, Upstato, n° 06-599), ezrina (1:10000, Sigma, E-8897), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; 1:20000, Santa Cruz, sc-47724), histona H3 (H3; 1:1000, Santa Cruz, sc-8654). Después las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó usando Super Signal WestDura. La expresión de la ezrina y GAPDH se usó como control de carga.

Ejemplo 10: Ensayos para determinar el efecto del largazol y sus análogos en el crecimiento de células de cáncer

Se cultivaron 8.000 células de diferentes cánceres o células no transformadas en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. (Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control del nivel de fondo que carecían de células pero contenían el mismo volumen de medio). 24 horas después de la siembra, se añadió medio nuevo. Para evaluar la citotoxicidad in vitro, cada compuesto se disolvió en DMSO y se preparó inmediatamente antes de los experimentos y se diluyó en medio completo antes de la adición a los cultivos celulares. Después, se añadieron los compuestos de ensayo al medio de cultivo para las concentraciones decrecientes designadas (de 600 nM a 10 nM). La viabilidad celular se determinó 48 después usando colorante cristal violeta (Sigma-Aldrich), que se solubilizó en etanol y se midió la absorbancia a 588 nm usando un lector de placa Tecan Safire II. Los experimentos se llevaron a

cabo en repeticiones de seis, y se generaron las curvas de concentración-respuesta por análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados de los datos usando GraphPad Prism (San Diego, CA). La inhibición del crecimiento (GI_{50}) para cada compuesto se definió como una concentración de fármaco que llevaba a una reducción de 50% de la A_{588} comparado con los controles.

- 5 Ejemplo 11: Estudios de micromatrices de ADN para determinar el efecto de SAHA, largazol y sus análogos en los perfiles de expresión de genes de células de cáncer.

Se sembraron células HCT116 por triplicado hasta aproximadamente 60% de confluencia. Después de 8 horas, las células se trataron con el vehículo de control DMSO (0,01%), SAHA (200 μ M), largazol (20 nM) o ejemplo 1 (20 nM). Las células se incubaron durante 6 o 24 horas, seguido de un lavado con solución salina tamponada con fosfato. Se extrajo el ARN total usando un kit de extracción ARN RNeasy Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) inmediatamente después del lavado. La concentración de ARN total se determinó usando un espectrómetro Lambda 800 UV/VIS (PerkinElmer, Waltham, MA) y se procesó para la hibridación con marcaje, lavado y barrido en el University of Colorado-Denver Health Sciences Center. Se usaron tres matrices GeneChip® Human Gene 1,0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA) para cada uno de los tiempos de medición, tipos de células y tratamientos para un total de 24 matrices. Se usaron ficheros de valores de expresión para cada muestra usando el algoritmo Robust Multichip Average (RMA). La expresión diferencial se determinó usando el paquete de software R *limma* para generar modelos lineales y estadísticos Bayesianos empíricos. Los genes se consideraron expresados de forma diferencial si el P valor, ajustado para ensayo múltiple usando el método de Benjamini y Hochberg, era $\leq 5\%$ y el log-cambio de 2 veces era ≤ 1 o ≥ -1 . Se usó el programa GeneSpring GX (Agilent, Santa Clara, CA) para la agrupación jerárquica y la generación de mapas de calor.

10

15

20

Referencias

- Allfrey, V.G., Faulkner, R., y Mirsky, A.E. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 786-794.
- Berge, S.M., Bighley, L.D., y Monkhouse, D.C. 1977. Pharmaceutical salts. *Journal of pharmaceutical sciences* 66(1): 1-19.
- Bowers, A., West, N., Taunton, J., Schreiber, S.L., Bradner, J.E., y Williams, R.M. 2008. Total synthesis and biological mode of action of largazole: a potent class I histone deacetylase inhibitor. *J Am Chem Soc* 130(33): 11219-11222.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., y Pavletich, N.P. 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401(6749): 188-193.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., y Horinouchi, S. 2002. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62(17): 4916-4921.
- Ghosh, A.K. y Kulkarni, S. 2008. Enantioselective total synthesis of (+)-largazole, a potent inhibitor of histone deacetylase. *Org Lett* 10(17): 3907-3909.
- Hang, H.C. y Bertozzi, C.R. 2001. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Accounts of chemical research* 34(9): 727-736.
- Kiick, K.L., Saxon, E., Tirrell, D.A., y Bertozzi, C.R. 2002. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 19-24.
- Kim, D.H., Kim, M., y Kwon, H.J. 2003. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. *J Biochem Mol Biol* 36(1): 110-119.
- Koho, K.T. 1991. In (ed. F.P.C. Ltd).
- Lane, A.A. y Chabner, B.A. 2009. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol* 27(32): 5459-5468.

Leder, A., Orkin, S., y Leder, P. 1975. Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis. *Science* 190(4217): 893-894.

Lemieux, G.A. y Bertozzi, C.R. 1998. Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends in biotechnology* 16(12): 506-513.

Marks, P.A. 2010. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 19(9): 1049-1066.

Marks, P.A. y Breslow, R. 2007. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 25(1): 84-90.

Masuoka, Y., Shin-Ya, K., Furihata, K., Nagai, K., Suzuki, K., Hayakawa, Y. y Seto, H. 2001. Phoenistatin, a new gene expression-enhancing substance produced by *Acremonium fusigerum*. *J Antibiot (Tokyo)* 54(2): 187-190.

Minucci, S. y Pelicci, P.G. 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6(1): 38-51.

Nasveschuk, C.G., Ungermannova, D., Liu, X., y Phillips, A.J. 2008. A concise total synthesis of largazole, solution structure, and some preliminary structure activity relationships. *Org Lett* 10(16): 3595-3598.

Newkirk, T.L., Bowers, A.A., y Williams, R.M. 2009. Discovery, biological activity, synthesis and potential therapeutic utility of naturally occurring histone deacetylase inhibitors. *Nat Prod Rep* 26(10): 1293-1320.

Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T., y Savolainen, J. 2008. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* 7(3): 255-270.

Sato, T., Friend, C., y De Harven, E. 1971. Ultrastructural changes in Friend erythroleukemia cells treated with dimethyl sulfoxide. *Cancer Res* 31(10): 1402-1417.

Seiser, T., Kamena, F., y Cramer, N. 2008. Synthesis and biological activity of largazole and derivatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(34): 6483-6485.

Shigematsu, N., Ueda, H., Takase, S., Tanaka, H., Yamamoto, K., y Tada, T. 1994. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* 47(3): 311-314.

Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.-C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E.M., Dougan, D.R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M.W., Swanson, R.V., McRee,

D.E., y Tari, L.W. 2004. Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* 12(7): 1325-1334.

Taori, K., Paul, V.J., y Luesch, H. 2008. Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the Floridian marine cyanobacterium *Symploca* sp. *J Am Chem Soc* 130(6): 1806-1807.

Ueda, H., Manda, T., Matsumoto, S., Mukumoto, S., Nishigaki, F., Kawamura, I., y Shimomura, K. 1994a. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J Antibiot (Tokyo)* 47(3): 315-323.

Ueda, H., Nakajima, H., Hori, Y., Goto, T., y Okuhara, M. 1994b. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 58(9): 1579-1583.

Ungermannova, D. 2010. P27 as a Molecular Target for Cancer Therapeutics: Discovering Small Molecule Inhibitors of P27 Proteolysis and Structure-Activity Relationship and Mechanistic Studies of Largazole, A Potent Inhibitor of Histone Deacetylase. Ph.D. thesis. University of Colorado-Boulder, Boulder, CO, USA

Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkühler, C., y Di Marco, S. 2004. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(42): 15064-15069.

Manfred E. Wolff 1995. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 5th Edition. Volume 1: Principles and Practice. Manfred E. Wolff (ed.), Wiley-Interscience, New York. 172-178, 931-932.

Ying, Y., Liu, Y., Byeon, S.R., Kim, H., Luesch, H., y Hong, J. 2008a. Synthesis and activity of largazole analogues with linker and macrocycle modification. *Org Lett* 10(18): 4021-4024.

Ying, Y., Taori, K., Kim, H., Hong, J., y Luesch, H. 2008b. Total synthesis and molecular target of largazole, a histone deacetylase inhibitor. *J Am Chem Soc* 130(26): 8455-8459.

Zeng, X., Yin, B., Hu, Z., Liao, C., Liu, J., Li, S., Li, Z., Nicklaus, M.C., Zhou, G., y Jiang, S. Total synthesis and biological evaluation of largazole and derivatives with promising selectivity for cancers cells. *Org Lett* 12(6): 1368-1371.

Tabla 1

Clase	Enzimas	Dependiente de Zn ²⁺	Localización	Expresión
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Si	Núcleo	Ubicua
Ila	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	Si	Núcleo y citoplasma	Específica de tejido
Ilb	HDAC6, HDAC10	Si	Citoplasma	Específica de tejido
III	Sirtuinas 1-7	No	Variable	Variable
IV	HDAC11	Si	Núcleo y citoplasma	Ubicua

Tabla 2. Inhibición del crecimiento celular GI₅₀ en nM

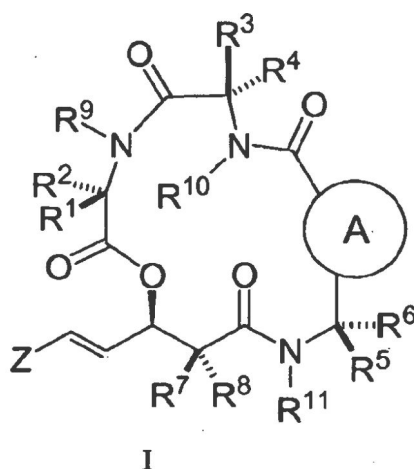
Compuestos (nM)	Líneas celulares		HME
	HCT-116	MDA-MB231	
Largazol	28	71±8	600
CGN-362	600	600	600
CGN-363	600	600	600
CGN-722	9±1	27±6	600
Ejemplo 1	16±2	53	600
Ejemplo 4	17	53±3	600

Tabla 3. Resumen del número de genes cuyos niveles de expresión cambiaban en dos veces tras el tratamiento con los compuestos químicos indicados en comparación con el DMSO de control

	nº de genes
	Cambio de 2 veces
Largazol a las 6 h	529
Largazol a las 24 h	566
Ejemplo 1 a las 6 h	421
Ejemplo 1 a las 24 h	174
SAHA a las 6 h	338
SAHA a las 24 h	34
TOTAL	32321

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I)



en donde

5 A es arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

Z es -(CH₂)_nSR₁₂;

10 R₁ y R₂ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o R₁ y R₂ juntos, o uno de R₁ y R₂ junto con R₉ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀ o heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

15 R₃ y R₄ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o R₃ y R₄ juntos, o uno de R₃ y R₄ junto con R₁₀ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀ o heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂, -CONR₂₀R₂₂ y -S(O)_mR₂₀;

20 R₅ y R₆ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o R₅ y R₆ juntos, o uno de R₅ y R₆ junto con R₁₁ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀ o heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

25 R₇ y R₈ son independientemente H, F, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o R₇ y R₈ juntos forman un cicloalquilo C₃-C₁₀ o heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

30 R₉ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o junto con uno de R₁ y R₂ forman un cicloalquilo C₃-C₁₀ o heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

35 R₁₀ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o junto con uno de R₃ y R₄ forma un cicloalquilo C₃-C₁₀ o heterocicloalquilo C₃-C₁₀, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

40 R₁₁ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, o junto con uno de R₅ y R₆ forma un cicloalquilo C₃-C₈ o heterocicloalquilo C₃-C₈, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀ y

heterocicloalquilo C₃-C₁₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

5 R₁₂ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, -COR₂₀, -CONR₂₀R₂₂, -COOR₂₀, -COCR₂₀R₂₂NR₂₀R₂₂, -SR₂₀ o -P(O)(OR₂₄)₂;

R₂₀ y R₂₂ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo o heteroarilo;

R₂₄ es independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, Na, K o Ca;

m = 1 o 2; y

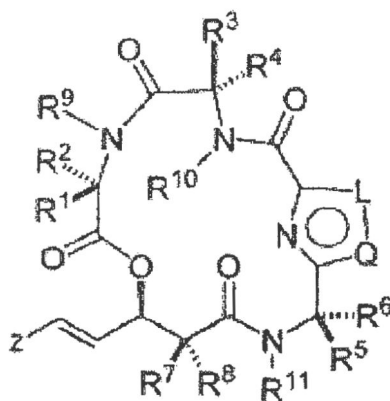
n = 1-6;

10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2.- Un compuesto según la reivindicación 1, en donde A es un anillo de heteroarilo de 5 miembros que tiene al menos un átomo de nitrógeno.

3.- Un compuesto según la reivindicación 1, en donde A es un anillo de heteroarilo de 6 miembros que tiene al menos un átomo de nitrógeno.

15 4.- Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, representado por la fórmula (II)



II

en donde

R₁-R₁₂, R₂₀, R₂₂, R₂₄, Z, m y n son como se definen en la reivindicación 1;

L y Q son independientemente S, O, N o CR₂₆; y

20 R₂₆ es independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo o heteroarilo, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde A es un oxazol o tiazol.

6.- Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5, en donde

R₁ y R₂ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₁ y R₂ juntos forman cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₃ y R₄ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₃ y R₄ juntos forman cicloalquilo C₃-C₁₀;

30 R₅ y R₆ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₅ y R₆ juntos forman cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₇ y R₈ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₇ y R₈ juntos forman cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente H o alquilo C₁-C₁₀; y

R₁₂ es -COR₂₀, en donde R₂₀ es independientemente H o alquilo C₁-C₁₀.

7.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 6, seleccionado de:

5 octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo;

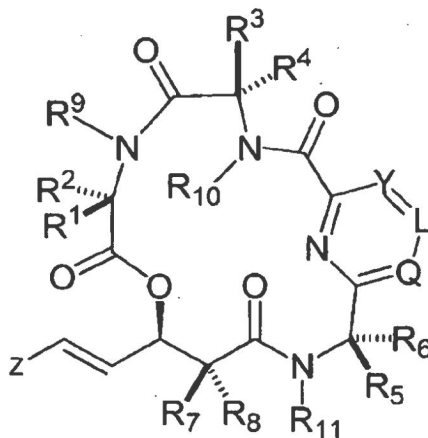
etanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-4,4-dimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13.2.1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo;

octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-7-isopropil-2,5,8,12-tetraoxo-9-oxa-16-tia-3,6,13,18-tetraazaespiro[biciclo[13.2.1]octadeca[1(17),15(18)]dieno-4,1'-ciclopropano]-10-il)but-3-enilo; y

10 octanotioato de S-(E)-4-((7S,10S)-4,4,7-trimetil-2,5,8,12-tetraoxo-9,16-dioxa-3,6,13,18-tetraazabicyclo[13,2,1]octadeca-1(17),15(18)-dien-10-il)but-3-enilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

8.- Un compuesto según la reivindicación 1 o 3, representado por la fórmula (III)



III

15 en donde

R₁-R₁₂, R₂₀, R₂₂, R₂₄, Z, m y n son como se definen en la reivindicación 1;

L, Q e Y son independientemente N o CR₂₆; y

20 R₂₆ es independientemente H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo o heteroarilo, en donde el alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, -CN, -COOH, -CF₃, -OCH₂F, -OR₂₀, -NR₂₀R₂₂, -NCOR₂₀R₂₂ y -CONR₂₀R₂₂;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

9.- Un compuesto de la reivindicación 8, en donde

25 R₁ y R₂ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₁ y R₂ juntos forman un cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₃ y R₄ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₃ y R₄ juntos forman un cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₅ y R₆ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₅ y R₆ juntos forman un cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₇ y R₈ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, o R₇ y R₈ juntos forman un cicloalquilo C₃-C₁₀;

R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente H o alquilo C₁-C₁₀; y

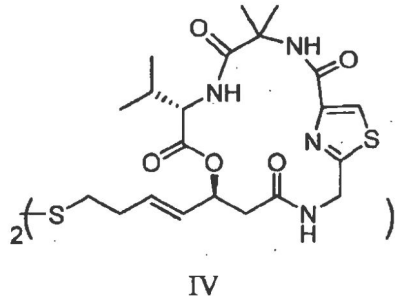
30 R₁₂ es -COR₂₀, en donde R₂₀ es independientemente H o alquilo C₁-C₁₀.

10.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 8 o 9, que es

(7S,10S)-4,4-dimetil-10-[(1E)-4-(octanoilsulfanyl)but-1-en-1-il]-7-(propan-2-il)-9-oxa-3,6,13,19-tetraazabicyclo[13.3.1]nonadeca-1(18),15(19),16-trieno-2,5,8,12-tetrona;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 11.- El compuesto de fórmula (IV):



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

12.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 13.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, que además comprende uno o más agentes antineoplásicos.

14.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usar en el tratamiento de una enfermedad mediada por una enzima HDAC.

15.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usar como un medicamento.

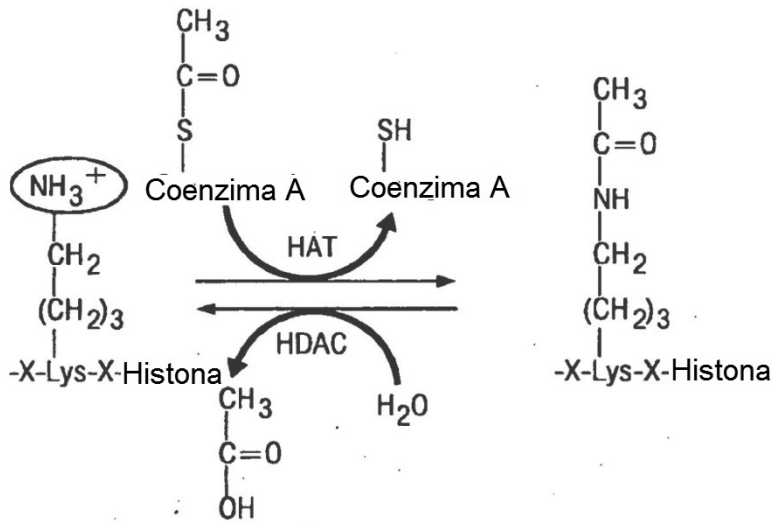


FIG. 1A

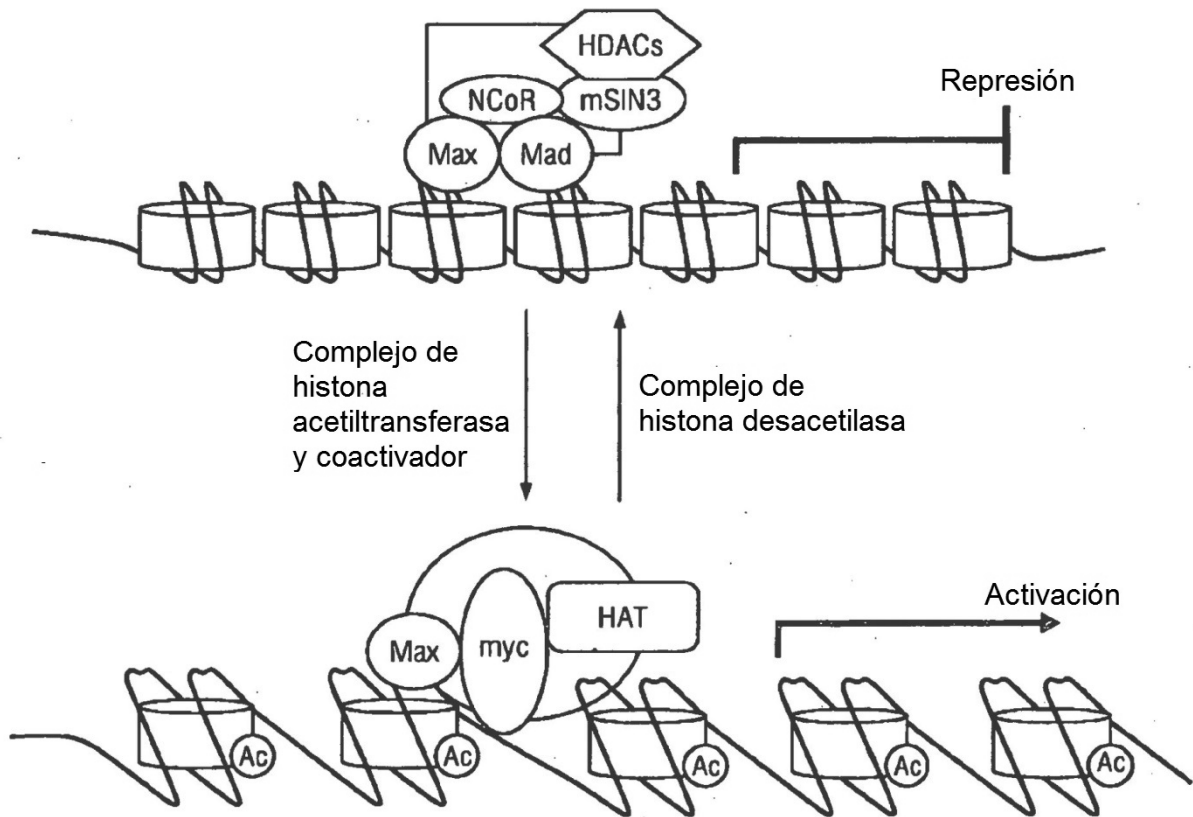
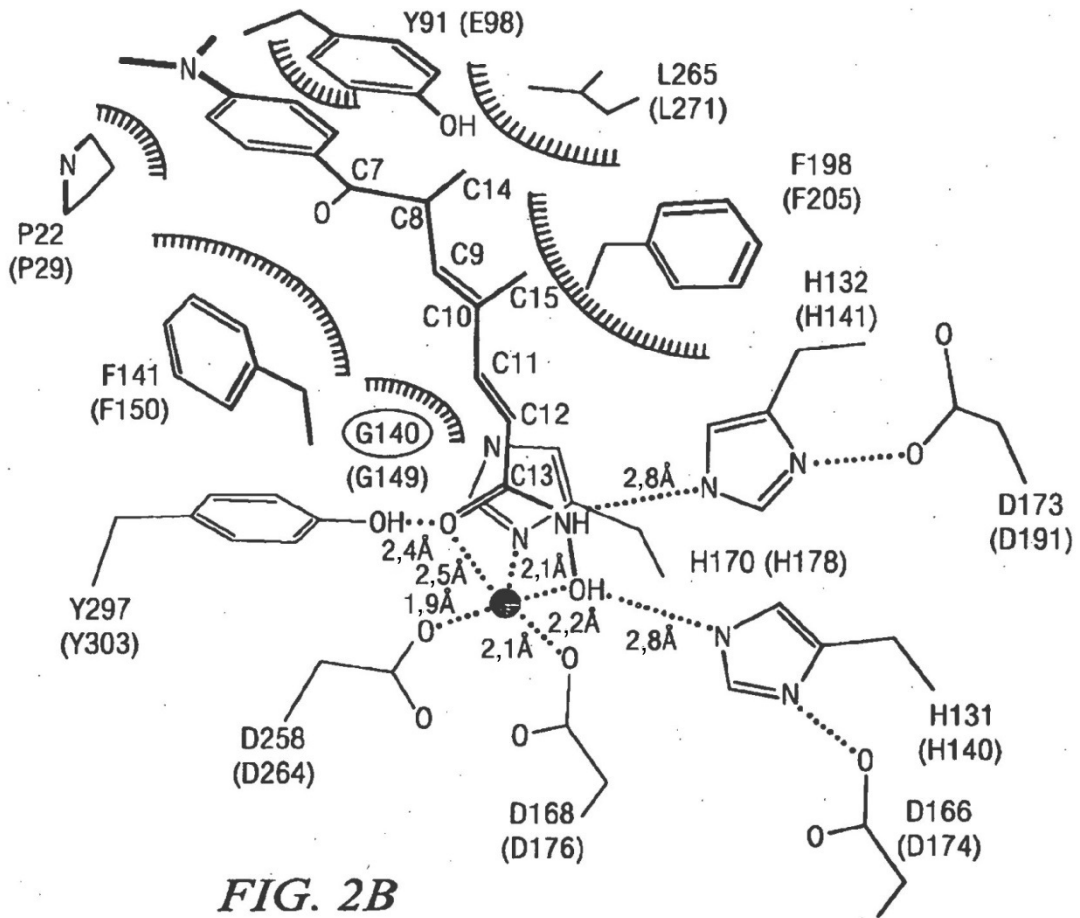
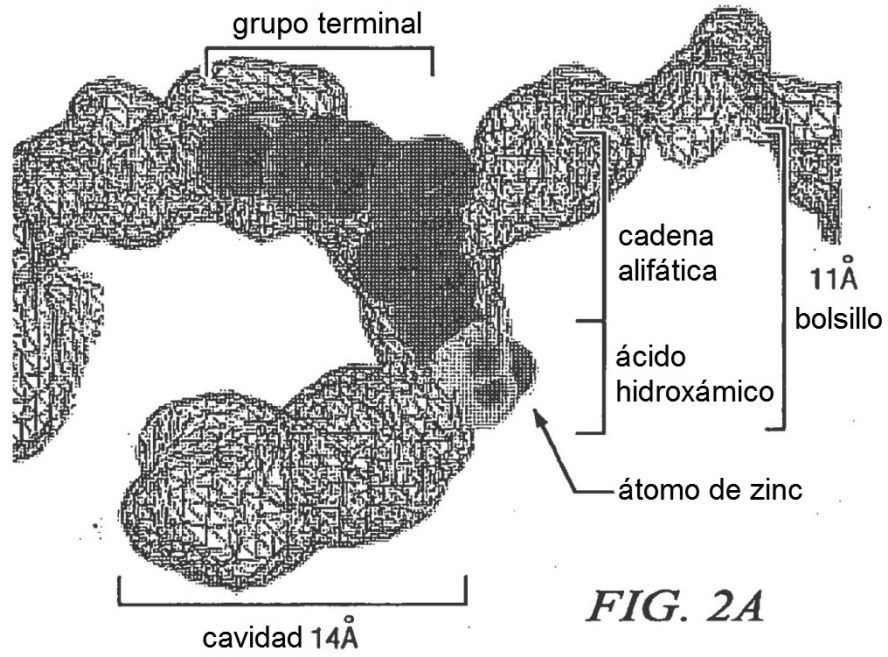


FIG. 1B



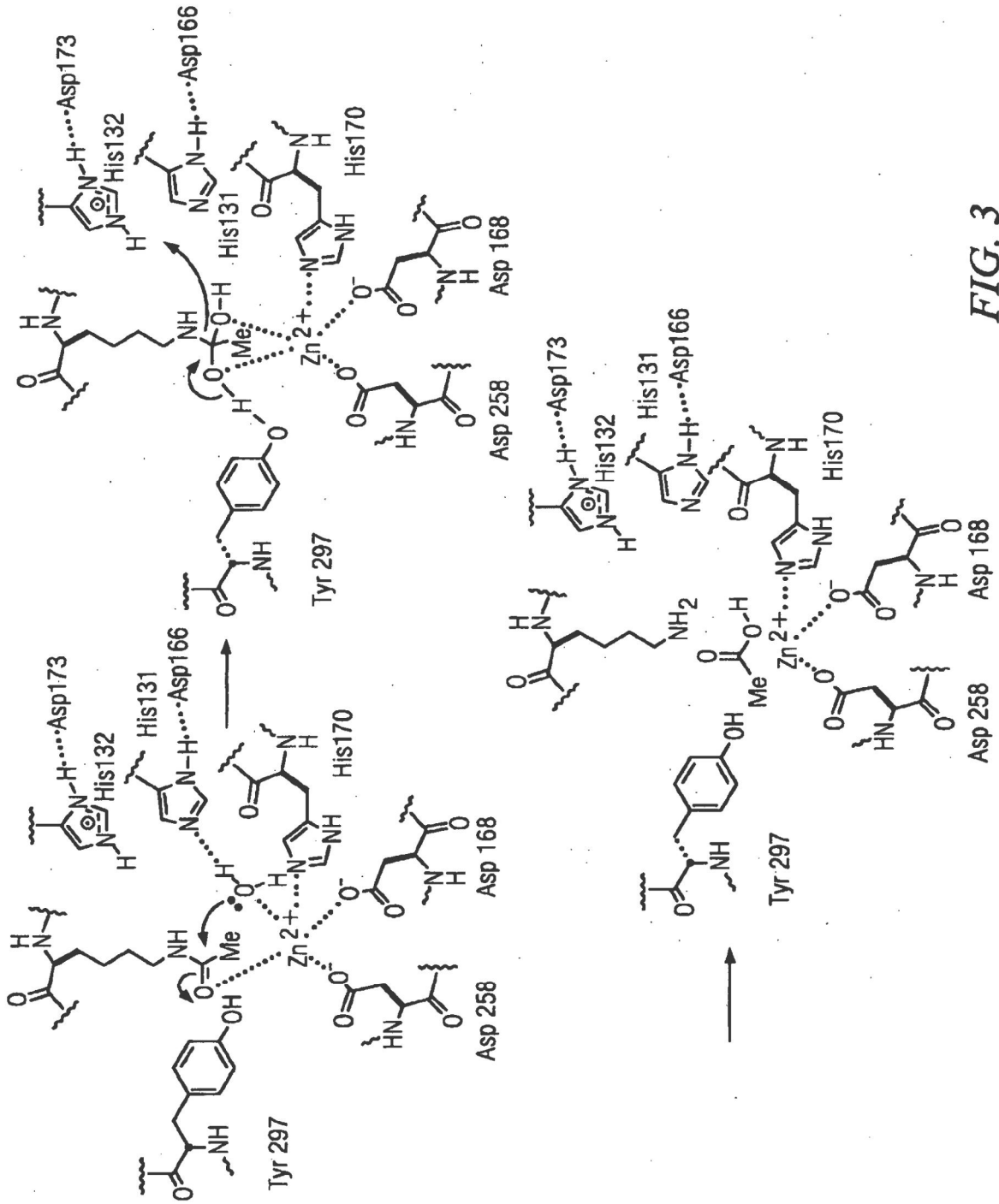


FIG. 3

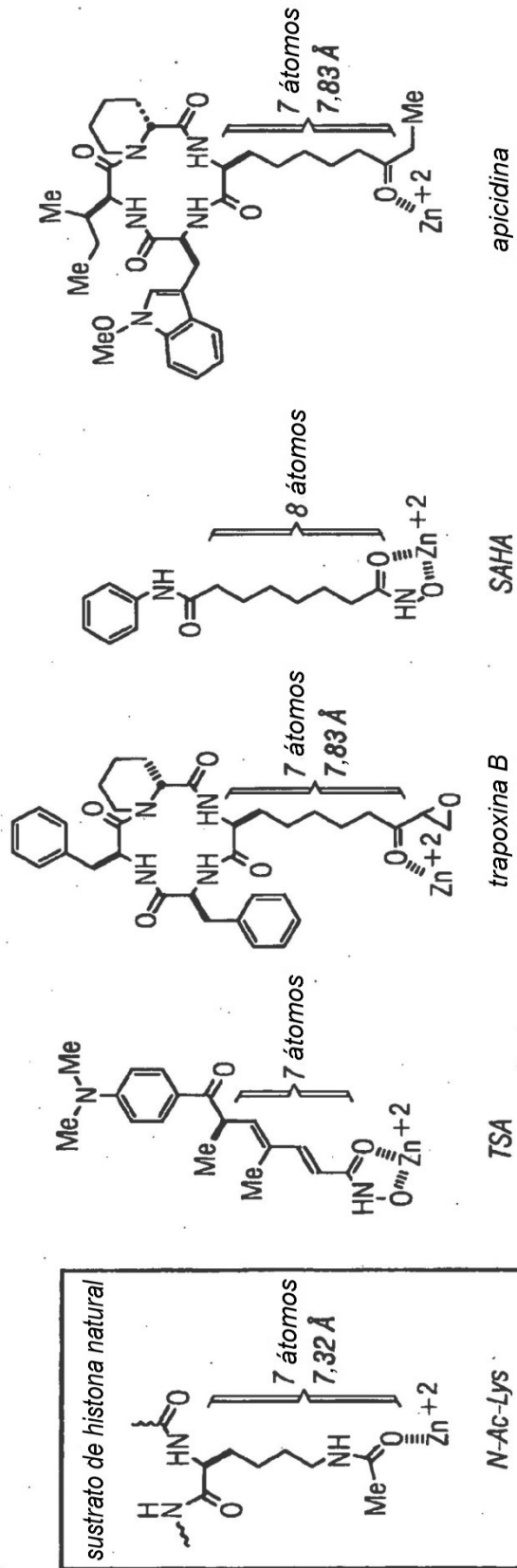


FIG. 4

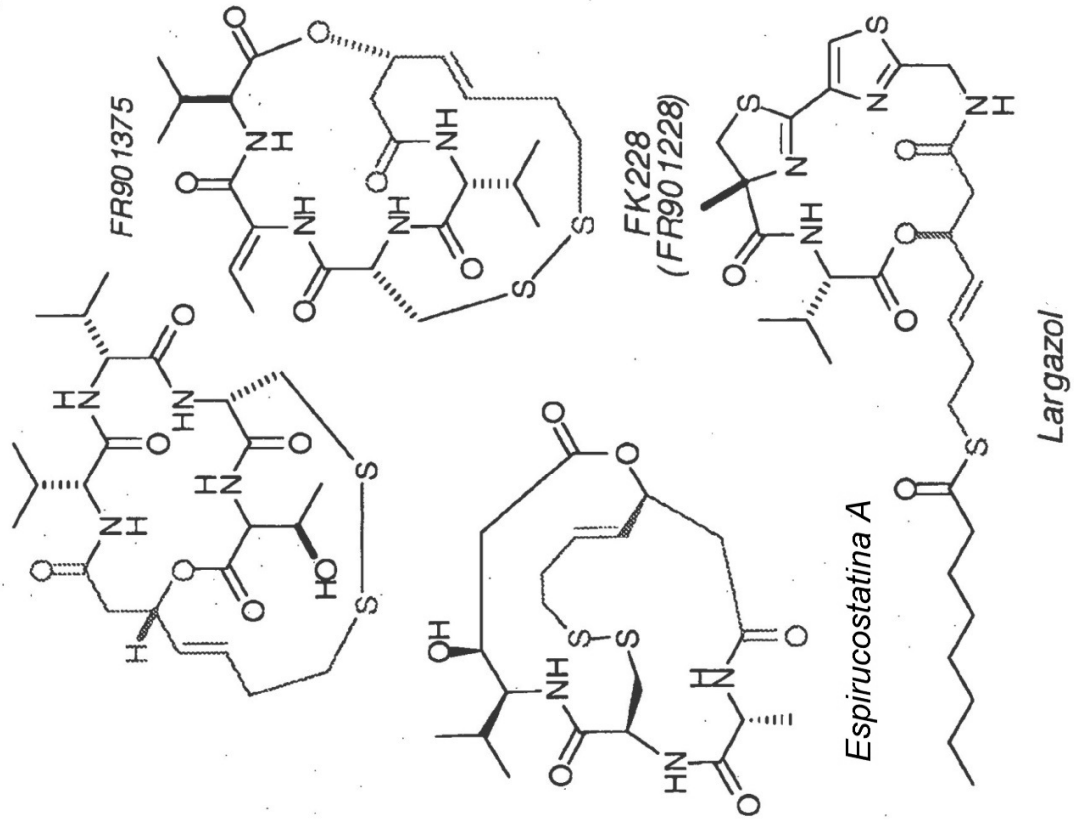


Figura 5

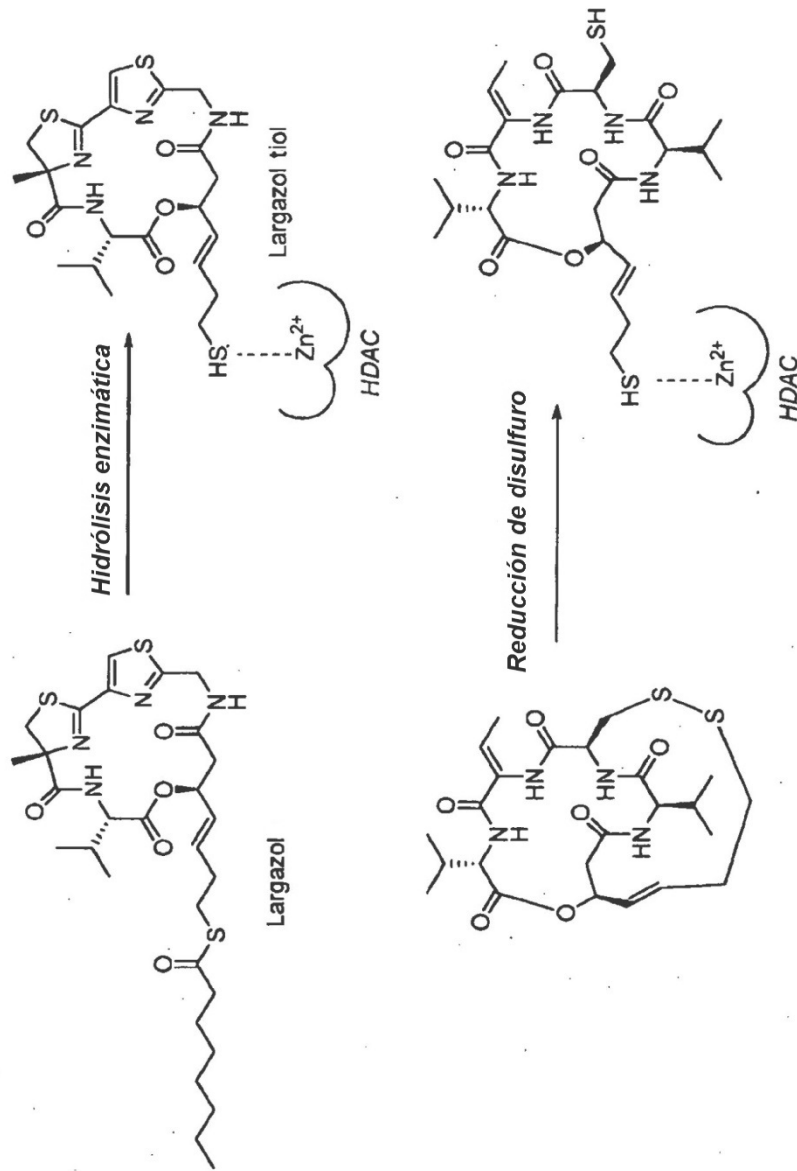


Figura 6

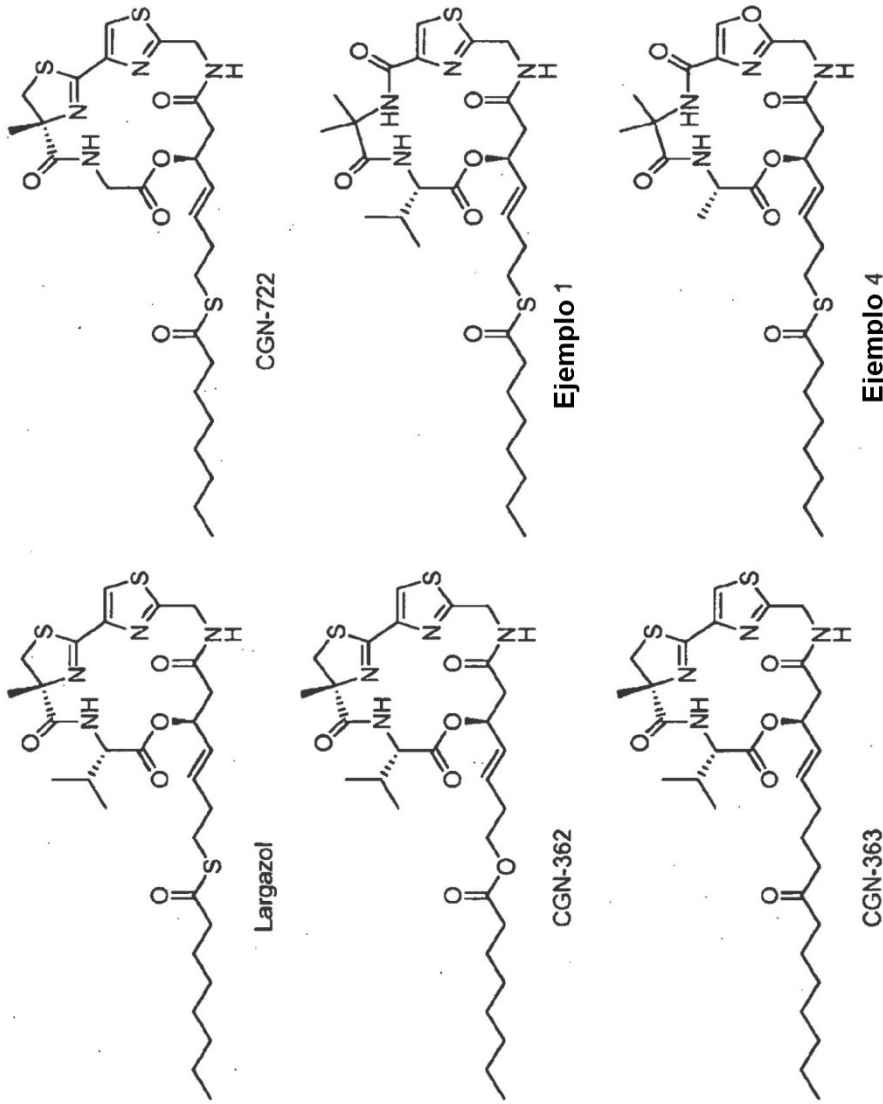
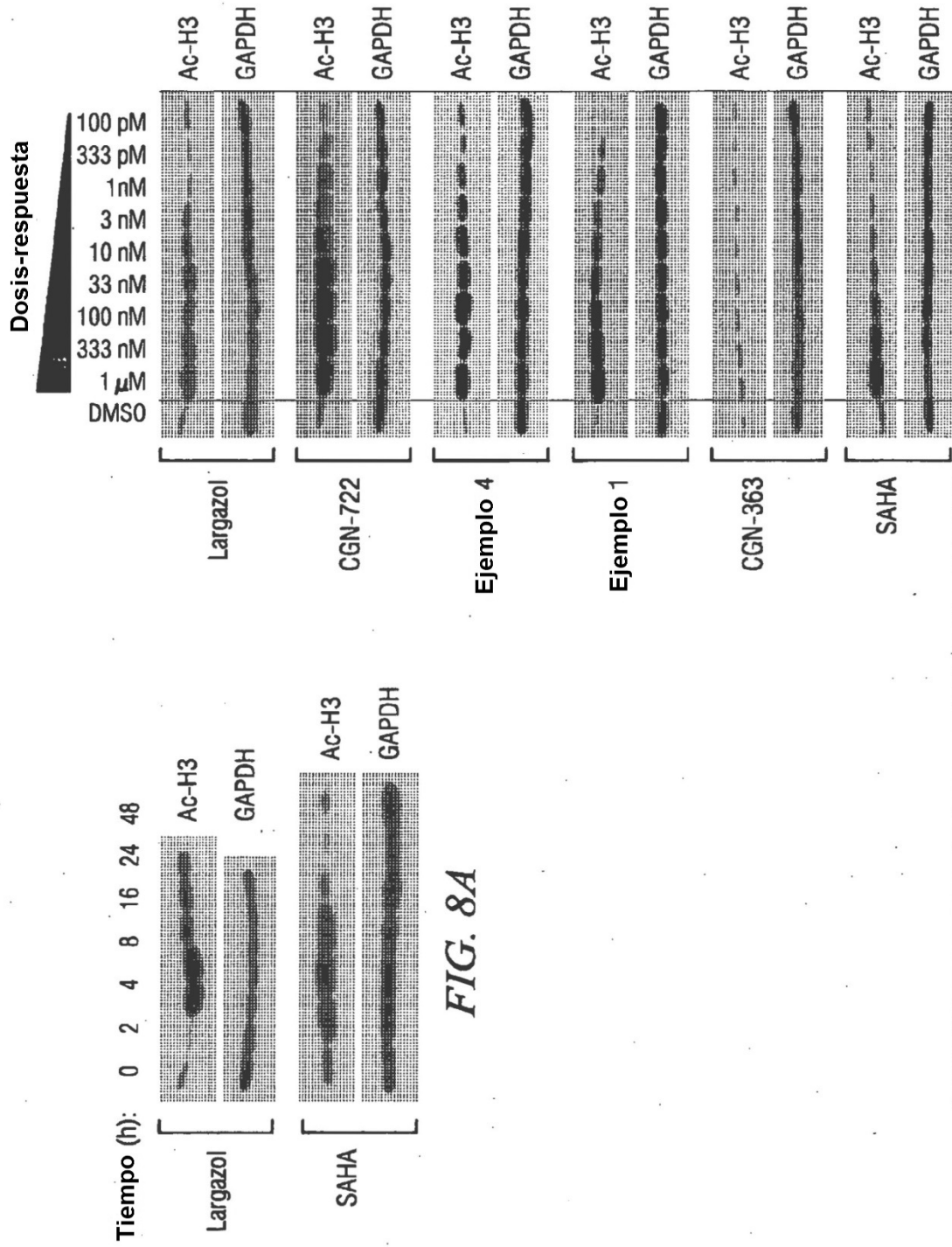


Figura 7



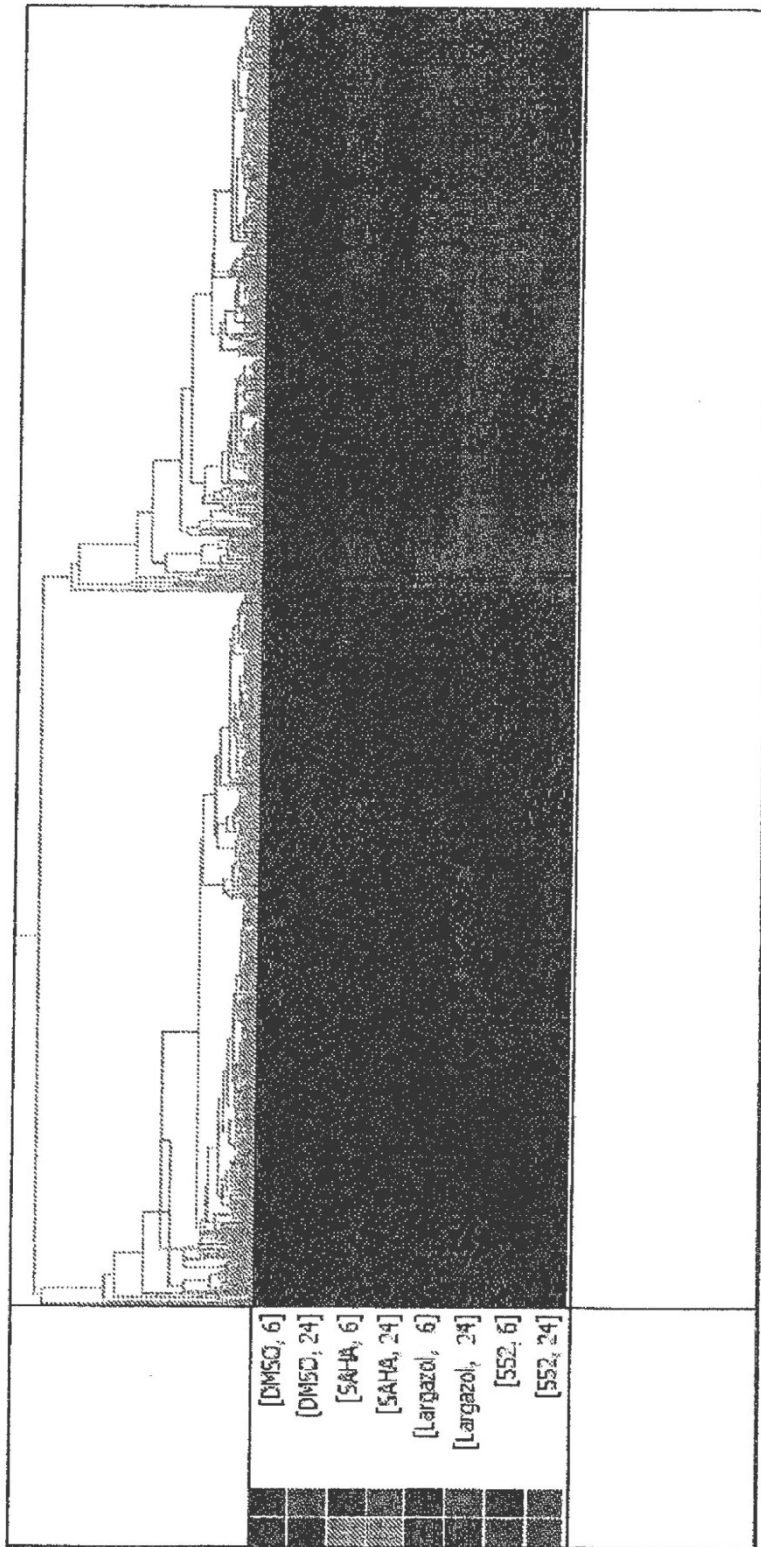


FIG. 9A

