

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 293**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/56** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2007 E 10195563 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2295410**

54 Título: **Inhibidor de HDAC**

30 Prioridad:

**06.10.2006 GB 0619753**

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

**24.07.2017**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY  
DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**DAVIDSON, ALAN HORNSBY;  
MOFFAT, DAVID FESTUS CHARLES;  
DAY, FRANCESCA ANN y  
DONALD, ALASTAIR DAVID GRAHAM**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 626 293 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

## Inhibidor de HDAC

La presente invención se refiere a un compuesto que inhibe miembros de la familia de enzimas histona desacetilasas y a su uso en el tratamiento de enfermedades de proliferación celular, incluyendo cánceres, enfermedades de poliglutamina, por ejemplo, enfermedad de Huntington, enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, por ejemplo artritis reumatoide y rechazo del trasplante de órganos, diabetes, trastornos hematológicos, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y las secuelas inflamatorias de infecciones.

**Antecedentes de la invención**

En las células eucarióticas el ADN está empaquetado con histonas, para formar la cromatina. Aproximadamente 150 pares de bases de ADN se envuelven dos veces alrededor de un octámero de histonas (dos de cada una de las histonas 2A, 2B, 3 y 4) para formar un nucleosoma, la unidad básica de la cromatina. La estructura ordenada de la cromatina necesita ser modificada para permitir la transcripción de los genes asociados. La regulación de la transcripción es clave para la diferenciación, la proliferación y la apoptosis, y, por lo tanto, está estrechamente controlada. El control de los cambios en la estructura de la cromatina (y por lo tanto de la transcripción) está mediado por modificaciones covalentes en las histonas, especialmente en las colas N-terminales. Las modificaciones covalentes (por ejemplo metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación) de las cadenas laterales de aminoácidos están mediadas enzimáticamente (se puede encontrar una revisión de las modificaciones covalentes de las histonas y su papel en la regulación de la transcripción en S. L. Berger, *Oncogene*, 2001, 20, 3007-3013. Véase M. Grunstein, *Nature*, 1997, 389, 349-352; A. P. Wolffe, *Science*, 1996, 272, 371-372; y P. A. Wade et al, *Trends Biochem. Sci.*, 1997, 22, 128-132, revisiones de la acetilación de las histonas y la transcripción).

La acetilación de las histonas se asocia con áreas de cromatina que son transcripcionalmente activas, mientras que los nucleosomas con niveles bajos de acetilación son, típicamente, transcripcionalmente silenciosos. El estado de acetilación de las histonas está controlado por dos clases de enzimas de actividades opuestas; las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas desacetilasas (HDAC). En las células transformadas se cree que la expresión inadecuada de las HDAC da como resultado el silenciamiento de los genes supresores de tumores (para una revisión de las funciones potenciales de las HDAC en la tumorigénesis, véase S. G. Gray y B. T. The, *Curr. Mol. Med.*, 2001, 1, 401-429). Se han descrito inhibidores de las enzimas HDAC en la bibliografía y se ha demostrado que inducen la reactivación transcripcional de ciertos genes, lo que da como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas, la inducción de la apoptosis y la inhibición del crecimiento tumoral en animales (véase una revisión en W. K. Kelly et al, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2002, 11, 1695-1713). Tales hallazgos sugieren que los inhibidores de las HDAC tienen potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como cáncer (O. H. Kramer et al, *Trends Endocrinol.*, 2001, 12, 294-300; D. M. Vigushin y R. C. Coombes, *Anticancer Drugs*, 2002, 13, 1-13).

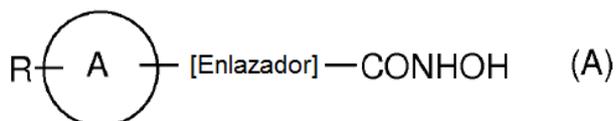
Además, otros han propuesto que la actividad aberrante de HDAC o la acetilación de histonas está implicada en las siguientes enfermedades y trastornos; enfermedades de poliglutamina, enfermedad de Huntington (R. E. Hughes, *Curr Biol*, 2002, 12, R141-R143; A. McCampbell et al, *Proc. Soc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98, 15179-15184; E. Hockly et al, *Proc. Soc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100, 2041-2046), otras enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer (B. Hempfen y J. P. Brion, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55, 964-972), enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplante de órganos (S. Skov et al, *Blood*, 2003, 101, 1430-1438; N. Mishra et al, *J. Clin. Invest.*, 2003, 111, 539-552), diabetes (A. L. Mosley y S. Ozcan, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 19660 - 19666) y complicaciones de la diabetes, infección (incluidas infecciones por protozoos (S. J. Darkin-Rattray et al, *Proc. Soc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93, 13143-13147)) y trastornos hematológicos, incluyendo talasemia (O. Witt et al, *Blood*, 2003, 101, 2001-2007). Las observaciones contenidas en estos manuscritos sugieren que la inhibición de HDAC debe tener beneficio terapéutico en estas y otras enfermedades relacionadas .

Se han sugerido muchos tipos de compuestos inhibidores de HDAC y actualmente se están evaluando clínicamente varios de estos compuestos para el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, las siguientes publicaciones de patentes describen tales compuestos:

US 5.369.108	WO 01/70675	WO 02/30879
WO 01/18171	WO 01/38322	WO 02/26703
US 4.254.220	WO 02/069947	WO 02/26696
WO 03/082288	WO 02/22577	WO 03/075929
WO 03/076395	WO 03/076400	WO 03/076401
WO 03/076421	WO 03/076430	WO 03/076422
WO 03/082288	WO 03/087057	WO 03/092686
WO 03/066579	WO 03/011851	WO 04/013130
WO 04/110989	WO 04/092115	WO 04/224991

WO 04/076386	WO 05/014588	WO 05/018578
WO 05/019174	WO 05/004861	WO 05/007091
WO 05/030704	WO 05/013958	WO 05/028447
WO 05/026907	WO 06/0166	

Muchos de los inhibidores de HDAC conocidos en la técnica tienen un molde estructural, que puede representarse como en la fórmula (A):



5 en la que el anillo A es un sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico con sustituyentes opcionales R, y [Enlazador] es un radical enlazador de diversos tipos. El grupo hidroxamato funciona como un grupo de unión a metal, que interacciona con el ion metálico en el sitio activo de la enzima HDAC, que se encuentra en la base de una cavidad en la estructura enzimática plegada. El anillo o sistema de anillos A se encuentra dentro o en la entrada de la bolsa que contiene el ion metálico, extendiéndose el radical - [enlazador] - más profundamente en esa bolsa que une A al grupo de ácido hidroxámico unido al metal. En la técnica y ocasionalmente en el presente documento, el anillo o sistema de anillo A se refiere a veces informalmente como el "grupo de cabeza" del inhibidor.

10 El uso de profármacos para mejorar la liberación en órganos y tejidos diana o para superar las propiedades farmacocinéticas deficientes del fármaco original es un enfoque de química medicinal bien conocido. La administración de profármacos éster, por ejemplo, que son hidrolizados por carboxiesterasas séricas *in vivo* en los ácidos parentales activos, puede dar lugar a mayores niveles en suero del ácido parental que la administración del propio ácido.

### **Breve descripción de la invención**

La presente invención da a conocer un nuevo inhibidor de HDAC que tiene utilidad farmacéutica en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres o inflamación que se benefician de la inhibición intracelular de HDAC, que tiene un grupo éster de aminoácido alfa que facilita la penetración del agente a través de la pared celular y, por lo tanto, permite que la actividad de la carboxiesterasa intracelular hidrolice el éster para liberar el ácido parental. Cuando está cargado, el ácido no es transportado fácilmente fuera de la célula, donde, por lo tanto, se acumula y aumenta la concentración intracelular del inhibidor activo de HDAC. Esto conduce a aumentos en la potencia y la duración de la acción. Por tanto, este compuesto se caracteriza por tener un resto de éster alfa-aminoácido que es un sustrato para la carboxiesterasa intracelular (también denominada en el presente documento "motivo de esterasa") unido covalentemente al molde molecular original.

### **Descripción detallada de la invención**

De acuerdo con la invención se proporciona ciclopentil (2S)-ciclohexil[({6-[3-(hidroxiamino)-3-oxopropil]piridin-3-il}metil)amino]acetato, o una sal, N-óxido, hidrato o solvato del mismo.

Dicho compuesto se puede usar para la inhibición de la actividad de la histona desacetilasa, *ex vivo* o *in vivo*.

30 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona el uso de dicho compuesto para el tratamiento de la enfermedad de proliferación celular, enfermedades de poliglutamina, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazo al trasplante, diabetes, trastornos hematológicos o infecciones, particularmente para el tratamiento de la proliferación de células cancerosas, enfermedad de Huntington o enfermedad de Alzheimer, o para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Como se usa en el presente documento, el término "sal" incluye sales de adición de bases, de adición de ácidos y sales cuaternarias. Los compuestos de la invención que son ácidos pueden formar sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, con bases tales como hidróxidos de metales alcalinos, por ejemplo, hidróxidos de sodio y de potasio; hidróxidos de metales alcalinotérreos, por ejemplo hidróxidos de calcio, de bario y de magnesio; con bases orgánicos, por ejemplo N-metil-D-glucamina, colina tris(hidroximetil)amino-metano, L-arginina, **L- lisina**, N-etil piperidina, dibencilamina y similares. Los compuestos (I) que son básicos pueden formar sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos, por ejemplo con ácidos hidrácidos, tales como ácidos clorhídrico o bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico y similares, y con ácidos orgánicos, por ejemplo con ácidos acético, tartárico, succínico, fumárico, maleico, málico, salicílico, cítrico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, benzoico, bencenosulfónico, glutámico, láctico y mandélico, y similares.

Cabe esperar que los compuestos de la invención se puedan recuperar en forma de hidrato o solvato. El término "solvato" se usa en el presente documento para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una cantidad estequiométrica de una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término 'hidrato' se emplea cuando dicho disolvente es agua.

## 5 **Discusión adicional**

Tal como se ha afirmado anteriormente, el éster de la invención es principalmente un profármaco del ácido carboxílico correspondiente en el que se convierte mediante esterasas intracelulares. Sin embargo, mientras permanezca sin hidrolizar, el éster tiene actividad inhibitoria de HDAC por derecho propio.

*El grupo hidroxamato -C(=O)NHOH*

10 En el compuesto de la invención, el grupo hidroxamato funciona como un grupo de unión a metal, que interacciona con el ion metálico en el sitio activo de la enzima HDAC, que se encuentra en la base de una cavidad en la estructura enzimática plegada.

Se sabe que los macrófagos desempeñan un papel principal en los trastornos inflamatorios a través de la liberación de citocinas, en concreto TNF $\alpha$  e IL-1 (van Roon et al., Arthritis and Rheumatism, 2003, 1229-1238). En la artritis reumatoide son los principales contribuyentes al mantenimiento de la inflamación de las articulaciones y la destrucción de las articulaciones. Los macrófagos también están implicados en el crecimiento y desarrollo de tumores (Naldini y Carraro, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 3-8). Por tanto, los agentes dirigidos selectivamente a la proliferación y función de las células macrófagos podrían ser valiosos en el tratamiento del cáncer y las enfermedades autoinmunes. Cabría esperar que dirigir agentes a tipos de células específicas conduzca a la reducción de efectos secundarios. Los inventores han descubierto que la forma en que el motivo de esterasa está unido al inhibidor determina si se hidroliza por acción de las tres carboxilesterasas humanas o simplemente por la acción de la hCE-1 y, por tanto, si se acumula o no en diferentes tipos de células. Específicamente, se ha encontrado que los macrófagos y otras células derivadas del linaje mielomonocítico, tanto normales como cancerosas, contienen la carboxilesterasa humana hCE-1, mientras que otros tipos de células no. Cuando el nitrógeno del motivo esterasa R<sub>1</sub>CH(R<sub>2</sub>)NH- no está unido directamente a un carbonilo (-C (= O) -), como en el caso del compuesto de la invención, y el éster solo es hidrolizado por la hCE -1, y, por lo tanto, el inhibidor se acumula selectivamente en las células relacionadas con los macrófagos.

## **Utilidades**

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, el compuesto al que se refiere la invención es un inhibidor de la actividad de HDAC y, por lo tanto, es de uso en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, esclerosis múltiple, diabetes, dermatitis atópica, enfermedad de injerto contra el huésped o lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

35 Se entenderá que el nivel de dosis específica para un paciente concreto dependerá de una serie de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico usado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta que se está tratando. Los niveles óptimos de dosis y la frecuencia de dosificación se determinarán mediante ensayos clínicos. Sin embargo, cabe esperar que una dosis típica esté en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 50 mg por kg de peso corporal.

40 El compuesto al que se refiere la invención se puede preparar para administrar por cualquier vía que sea compatible con sus propiedades farmacocinéticas. Las composiciones que se pueden administrar por vía oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, preparaciones líquidas o en gel, tales como soluciones o suspensiones orales, tópicas o parenterales estériles. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de presentación de dosis unitaria y pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; 45 cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricante para formación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata, o agentes humectantes aceptables tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos se pueden recubrir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires o se pueden formular como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, jarabe de glucosa, grasas comestibles hidrogenadas de 50 gelatina; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y, si se desea, agentes aromatizantes o colorantes convencionales.

Para la aplicación tópica en la piel, se puede formar el fármaco en crema, loción o ungüento. Las formulaciones de

crema o ungüento que pueden usarse para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en libros de texto estándar de productos farmacéuticos tal como la Farmacopea Británica.

5 Para la aplicación tópica por inhalación, el fármaco puede formularse para administrar en aerosol, por ejemplo, mediante atomizadores de chorro a presión o atomizadores ultrasónicos, o, preferentemente, mediante aerosoles dosificados impulsados por propelentes o administración sin propelentes de polvos micronizados, por ejemplo, cápsulas para inhalación u otros sistemas de administración en "polvo seco". Excipientes, tales como, por ejemplo, propelentes (por ejemplo, Frigen en el caso de los aerosoles dosificados), sustancias de superficie activa, emulsionantes, estabilizantes, conservantes, aromatizantes y cargas (por ejemplo, lactosa en el caso de inhaladores de polvo) pueden estar presentes en dichas formulaciones inhaladas. Para los propósitos de inhalación, se dispone de un gran número de aparatos con los que se pueden generar y administrar aerosoles de tamaño de partícula óptimo, usando una técnica de inhalación que sea apropiada para el paciente. Además del uso de adaptadores (espaciadores, expansores) y recipientes en forma de pera (por ejemplo, Nebulator®), Volumatic®) y dispositivos automáticos que emiten un atomizador (Autohaler®), para aerosoles dosificados, en particular en el caso de los inhaladores de polvo, se dispone de varias soluciones técnicas (por ejemplo, Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o los inhaladores, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente europea EP 0 505 321).

20 Para la aplicación tópica en el ojo, el fármaco puede prepararse en una solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. También se pueden incluir aditivos, por ejemplo tampones, tales como metabisulfito sódico o edeato disódico; conservantes, incluyendo agentes bactericidas y fungicidas, tales como acetato o nitrato de fenilmercurio, cloruro de benzalconio o clorhexidina y agentes espesantes tales, como hipromelosa.

El ingrediente activo también puede administrarse por vía parenteral en un medio estéril. Dependiendo del vehículo y la concentración utilizados, el fármaco puede suspenderse o disolverse en el vehículo. Ventajosamente, se pueden disolver en el vehículo adyuvantes, tales como anestésico local, conservante y agente tampón.

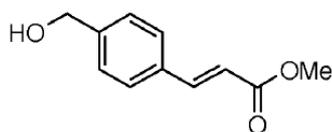
25 La preparación del compuesto de la invención, y sus propiedades inhibitoras de HDAC, se describirán a continuación:

#### Abreviaturas

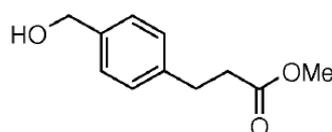
MeOH	= metanol
EtOH	= etanol
EtOAc	= acetato de etilo
Boc	= <i>tert</i> -butoxicarbonilo
DCM	= diclorometano
DMF	= dimetilformamida
DCE	= 1,2 dicloroetano
TMSOK	= trimetilsilanósido de potasio
DMSO	= dimetilsulfóxido
TFA	= ácido trifluoroacético
THF	= tetrahidrofurano
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato sódico
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	= carbonato potásico
HCl	= ácido clorhídrico
ac.	= solución acuosa
sat.	= saturado
DIPEA	= diisopropiletilamina
NaH	= hidruro sódico
NaOH	= hidróxido sódico
STAB	= triacetoxiborohidruro sódico
NaCNBH <sub>3</sub>	= cianoborohidruro sódico
NaHCO <sub>3</sub>	= hidrógenocarbonato de sodio
Pd/C	= paladio sobre carbono
TBME	= éter <i>tert</i> -butilmetílico
TPAP	= perrutenato de tetrapropilamonio
(COCl) <sub>2</sub>	= cloruro de oxalilo
N <sub>2</sub>	= nitrógeno
PyBop	= hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi- <i>tris</i> -pirrolidino-fosfonio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	= sulfato sódico
Et <sub>3</sub> N	= trietilamina

NH <sub>3</sub>	= amoníaco
TMSCl	= trimetilclorosilano
NH <sub>4</sub> Cl	= cloruro amónico
LiAlH <sub>4</sub>	= hidruro de litio y aluminio
PyBrOP	= fosfoniohexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino
MgSO <sub>4</sub>	= sulfato magnésico
<sup>n</sup> BuLi	= n-butillitio
CO <sub>2</sub>	= dióxido de carbono
EDCI	= hidrocloreuro de <i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilcarbodiimida
Et <sub>2</sub> O	= éter dietílico
LiOH	= hidróxido de litio
HOBt	= 1-hidroxibenzotriazol
TLC	= cromatografía de capa fina
CLEM	= cromatografía de líquidos con espectrometría de masas
ml	= mililitro(s)
g	= gramo(s)
mg	= miligramo(s)
mol	= mol(es)
mmol	= milimol(es)
HPLC	= cromatografía de líquidos de alto rendimiento
RMN	= resonancia magnética nuclear
TA	= temperatura ambiente
h	= hora(s)

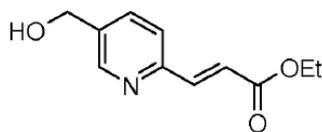
**Intermedios básicos:**



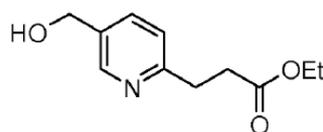
**Intermedio A de referencia**



**Intermedio B de referencia**



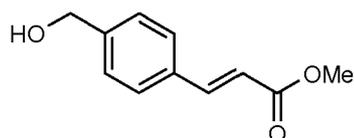
**Intermedio E**



**Intermedio F**

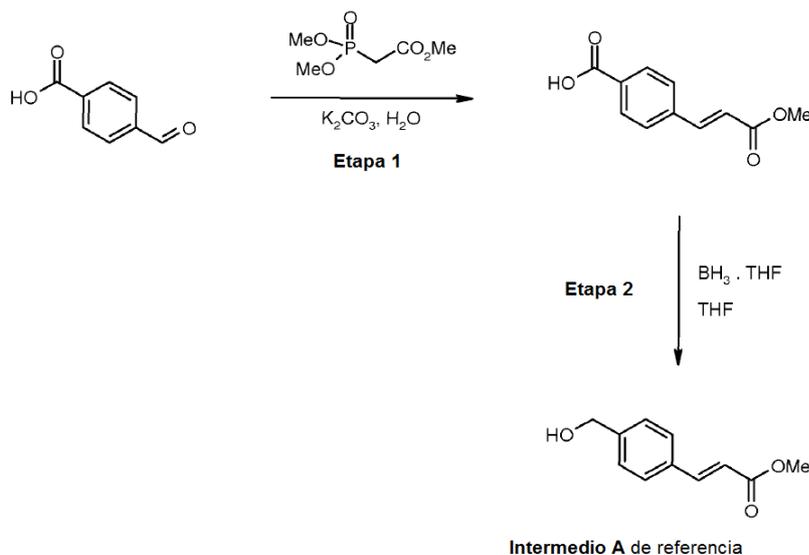
Intermedio de referencia A:

(2E)-3-[4-(hidroximetil)fenil]-1-acrilato de metilo



5

El compuesto del título se preparó mediante la metodología siguiente:



**Etapa 1 - Preparación de ácido 4-[(1E)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-il]benzoico**

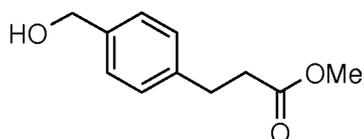
- 5 Se añadieron ácido 4-formilbenzoico (20 g, 0,133 mol) y  $K_2CO_3$  (55 g, 0,398 mol) a agua (350 ml) y se enfriaron a 0-5 °C. Se cargó fosonoacetato de trimetilo (26 ml, 0,160 mol) gota a gota manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 15 °C. La reacción se calentó a continuación y se agitó a TA durante 1,5 horas antes de acidificar hasta a pH ~ 1. El precipitado resultante se filtró y se secó *al vacío* para proporcionar el producto del título en forma de un sólido de color amarillo claro (29,5 g, cant.). RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$ : 7,89-7,52 (5H, m), 6,59 (1 H, d, J = 16,2Hz), 3,7 (3H, s).

**Etapa 2 - Preparación de (2E)-3-[4-(hidroximetil)fenil]acrilato de metilo (Intermedio A)**

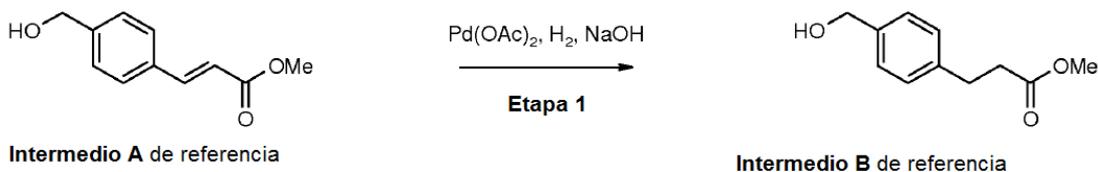
- 10 El producto de la etapa 1 (10 g, 48 mmol) se añadió a THF (80 ml) y se enfrió a 0-5 °C. Gota a gota se añadió complejo de borano-THF, 1 M en THF (97 ml, 96 mmol) y la reacción se dejó calentar a TA y se agitó durante 2 horas. A continuación, se inactivó con 1:1 de  $HCl_{ac}$  al 10 %/THF, después se extrajeron las fases orgánicas *al vacío*. El residuo se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución de  $NaHCO_3$  sat. (50 ml), después salmuera (50 ml), se secaron ( $MgSO_4$ ) y se concentraron *al vacío* para proporcionar el producto del título en forma de un aceite de color amarillo (2,75 g, 30 %). RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7,75-7,70 (5H, m), 6,54 (1 H, d, J = 16,2Hz), 4,64 (2H, s), 3,80 (3H, s).
- 15

Intermedio de referencia B:

Ácido metil-3-[4-(hidroximetil)fenil]propanoico



- 20 El compuesto del título se preparó mediante la metodología siguiente:

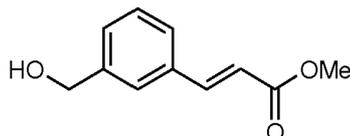


**Etapa 1 - Preparación de ácido 3-[4-(hidroximetil)fenil]propanoico(Intermedio B).**

- 5 **Intermedio A** (3 g, 15,6 mmol) y acetato de paladio (0,3 g, 1,3 mmol) se añadieron a NaOH<sub>ac</sub> 0,5N (50 ml), se purgó y se agitó con hidrógeno durante 4,5 horas. La reacción se filtró a través de celite, se lavó con DCM (30 ml), se acidificó a pH ~ 1 con HCl<sub>ac</sub> al 10 % y se extrajo con EtOAc (2 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron *al vacío* para dar el producto del título como un sólido de color amarillo claro (2,85 g, 94 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 5: 7,25 (4H, ABq, J = 10,9, 22,9 Hz), 4,57 (2H, s), 3,68 (3H, s), 2,92 (2H, t, J = 9,8Hz), 2,60 (2H, t, J = 9,8 Hz).

Intermedio de referencia C:

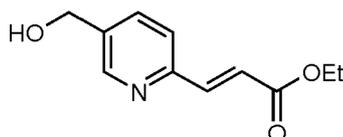
Ácido metil (2E)-3-[3-(hidroximetil)fenil]acrílico



- 10 El compuesto del título se preparó a partir de ácido 3-formilbenzoico mediante la misma metodología usada para preparar el intermedio de referencia A. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5: 7,63 (1 H, d, J = 15,9Hz), 7,42 (2H, d, J = 8,4Hz), 7,30 (2H, d, J = 8,1 Hz), 6,37 (1 H, d, J = 15,9Hz), 4,61 (2H, s), 3,77 (3H, s).

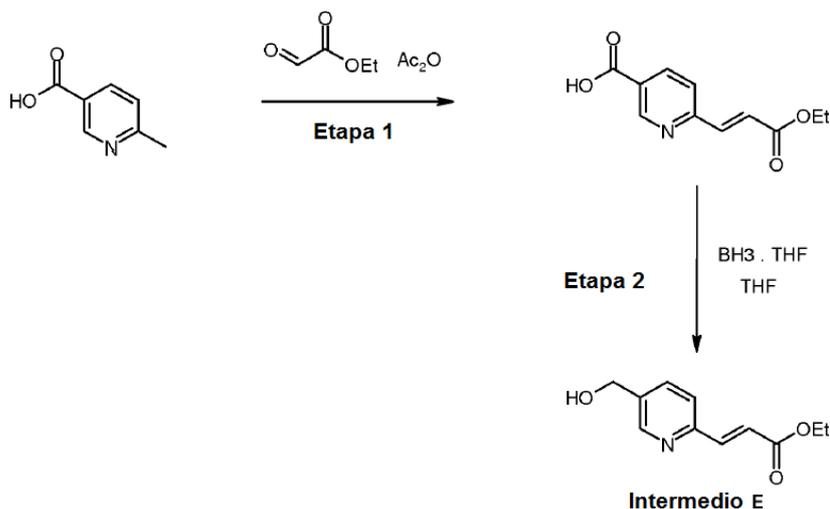
Intermedio E:

Ácido etil-(2E)-3-[5-(hidroximetil)piridin-2-il]acrílico



15

El compuesto del título se preparó mediante la metodología siguiente:



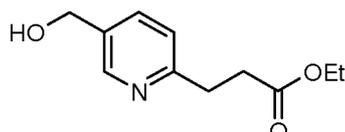
*Etapa 1* - Preparación de ácido 6-[(1E)-3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il]nicotínico

- 20 Se añadieron ácido 6-metilnicotínico (5 g, 36 mmol) y glioxalato de etilo (*solución al 50 %* en tolueno - 8,7 ml, 44 mmol) a Ac<sub>2</sub>O (25 ml) y se agitó en atmósfera de nitrógeno. La reacción se calentó a 130 °C durante 3 horas, después se dejó enfriar a TA durante 17 horas. A continuación, la reacción se inactivó con agua (10 ml) y se concentró a sequedad *al vacío* para dar el producto en forma de un sólido de color marrón (11,6 g, >100 %). m/z = 222 [M+H]<sup>+</sup>.

*Etapa 2* - Preparación de (2E)-3-[5-(hidroximetil)piridin-2-il]acrilato de etilo (**Intermedio E**)

- 25 Gota a gota se añadió complejo de borano-THF (1 M en THF - 84 ml, 0,084 mol) a una suspensión del producto de la etapa 1 (11,6 g, 52 mmol) en THF (100 ml), en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó a TA durante 1,5

- horas, después se inactivó con HCl<sub>ac</sub> 2N (20 ml). El THF se retiró *al vacío*, el residuo se basificó a pH ~ 9 con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, después se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO<sub>4</sub>), después se concentraron *al vacío* para proporcionar el producto en bruto como un aceite de color marrón. La purificación mediante cromatografía en columna dio el producto deseado en forma de un sólido de color amarillo (1,86 g, 25 %).  
 5 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8,59 (1 H, s), 7,91-7,63 (3H, m), 6,88 (1 H, d, J = 15,9Hz), 4,70 (2H, s), 4,28 (2H, c), 1,35 (3H, t).

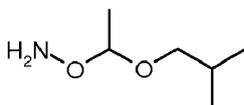
**Intermedio F:**Ácido etil-3-[5-(hidroximetil)piridin-2-il]propanoico

- 10 El compuesto del título se preparó a partir del **Intermedio E** mediante la misma metodología usada para preparar el **Intermedio B**.

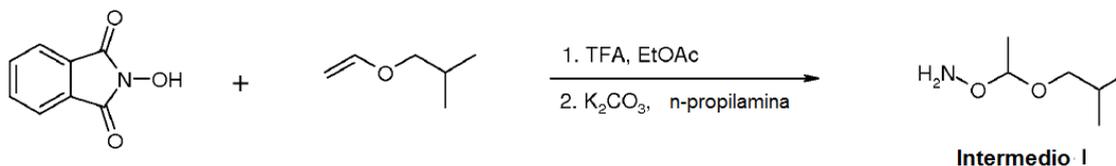
RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,49 (1 H, s), 7,65 (1 H, d, J = 5,7Hz), 7,21 (1 H, d, J = 7,8Hz), 4,68 (2H, s), 4,13 (2H, c, J = 7,2Hz), 3,12 (2H, t, J = 7,5Hz), 2,77 (2H, t, J = 7,2Hz), 1,24 (3H, t, J = 7,2Hz).

**Intermedio I:**

- 15 O-(1-Isobutoxietil)hidroxilamina

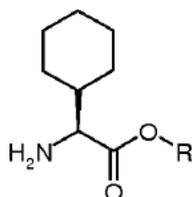


El compuesto del título se preparó mediante la metodología siguiente:



El **Intermedio I** se preparó siguiendo la metodología descrita en el documento WO 01/60785.

- 20 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 0,85 (6H, d), 1,15 (3H, d), 1,75 (1H, m), 3,18 (1H, dd), 3,42 (1 H, dd), 4,53 (1 H, c), 5,82 (2H, s).

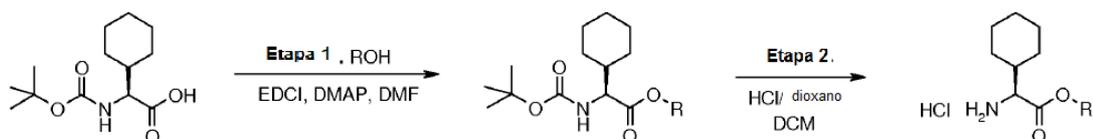
**Intermedio de aminoácido:**

**Int. J1** R = ciclopentilo

*Preparación:*

- 25 El Intermedio J1 anterior se preparó a partir del aminoácido y el alcohol correspondientes de acuerdo con el método descrito a continuación:

## Procedimiento.

**Etapa 1 - Preparación de (2S)-[(terc-butoxicarbonil)amino](ciclohexil)acetato de ciclopentilo**

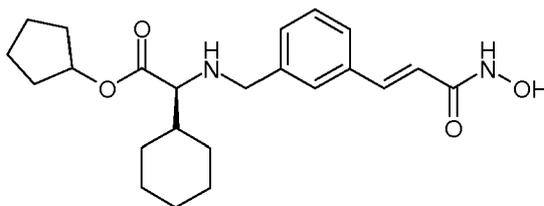
5 A una solución de ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-ciclohexil-propiónico (5 g, 19,4 mmol) en DMF (50 ml) a 0 °C se añadió ciclopentanol (8,8 ml, 97,15 mmol), EDCI (4,09 g, 21,37 mmol) y, por último, DMAP (237 mg, 1,94 mmol). La mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó durante 18 horas. The DMF se retiró *al vacío* para dar un aceite transparente. Esto se separó entre agua y EtOAc. La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró *al vacío*. El extracto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 25 % en heptano) para producir el producto deseado en forma de un aceite transparente (14,87 g, 55 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) 5: 7,09 (1 H, d), 5,08 (1 H, t), 3,76 (1 H, t), 1,50-1,85 (10H, m a), 1,39 (9H, s), 1,00-1,25 (9H, m a).

10 **Etapa 2 - Preparación de clorhidrato de (2S)-amino(ciclohexil)acetato de ciclopentilo**

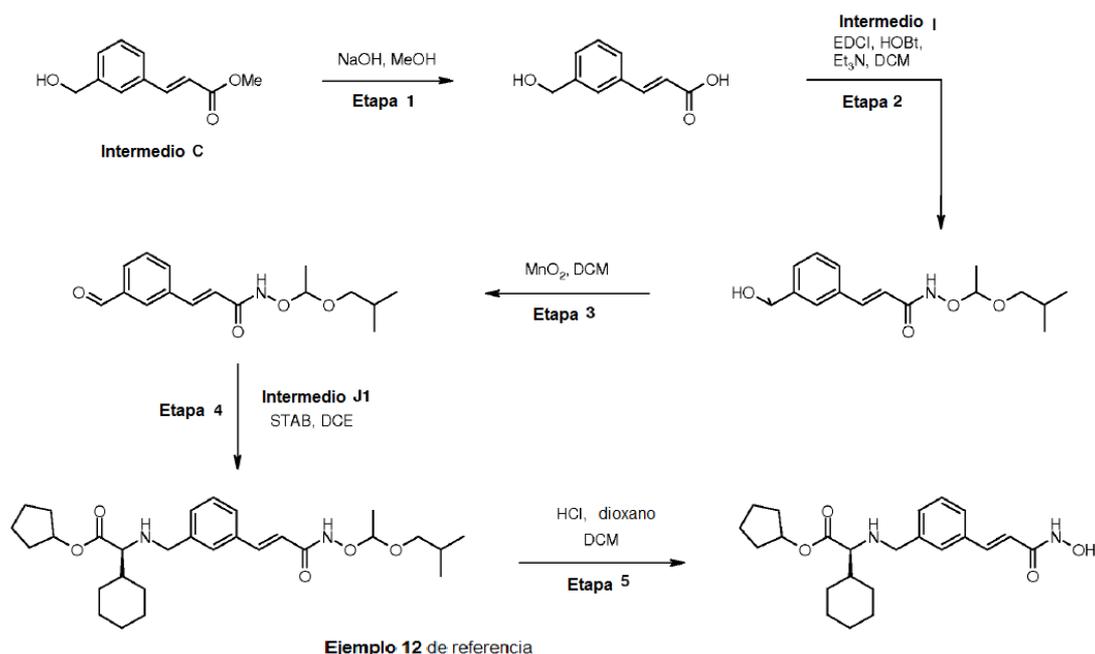
**(Intermedio J1)**

15 El producto de la etapa 1 (14,87 g, 45,69 mmol) se disolvió en DCM (100 ml) y se trató con HCl 4 M/dioxano (22,8 ml, 91,38 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 24 horas. La mezcla en bruto se concentró a presión reducida para dar un aceite de color naranja. Esto se trituró con Et<sub>2</sub>O, para dar un precipitado de color blanco. Esto se lavó además con Et<sub>2</sub>O, para dar el producto deseado en forma de un polvo de color blanco (7,78 g, 65%). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) 5: 8,45 (3H, s a), 5,22 (1 H, t), 3,28 (1 H, d), 1,95-1,50 (10H, m a), 1,30-0,90 (9H, m a).

Todos los intermedios anteriores se usaron en reacciones de acoplamiento de aminoácidos en forma de la base libres. Para un individuo versado en la técnica, será evidente que cada base libre puede prepararse mediante titulación de las sales descritas anteriormente con una base inorgánica adecuada (por ejemplo, NaHCO<sub>3</sub>).

**20 Modelo de protocolo de síntesis:**Preparación de (2S)-ciclohexil(3-[(1E)-3-(hidroxiamino)-3-oxoprop-1-en-1-il]bencil)amino)acetato de ciclopentilo

El compuesto del título se preparó mediante la metodología siguiente:



**Etapa 1** - Preparación de ácido (2E)-3-[3-(hidroximetil)fenil]acrílico

El **Intermedio C** (16,04 g, 83,5 mmol) se añadió a NaOH<sub>ac</sub> 1M (28 ml) y MeOH (41 ml) y se agitó a TA durante 15,5 horas. Se retiró el MeOH *al vacío* y el residuo se lavó con EtOAc. La fase acuosa se acidificó a pH ~ 1 y el precipitado resultante se filtró y se secó *al vacío* para dar el producto del título en forma de un sólido de color blanco (7,29 g, >49 %). m/z = 179 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapa 2** - Preparación de (2E)-3-[3-(1-hidroxietil)fenil]-N-(1-isobutoxi)etoxiacrilamida

El producto de la etapa 1 (7,29 g, 41 mmol), EDCI (9,4 g, 49 mmol) y HOBt (6,6 g, 49 mmol) se añadieron a DCM (100 ml) y se agitaron a TA durante 30 minutos. El **Intermedio I** (17,3 ml, 123 mmol) y trietilamina (28,5 ml, 205 mmol) se cargaron y la reacción se agitó a TA durante 2,5 horas. La reacción se separó con agua, la fase acuosa se extrajo con DCM (50 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron *al vacío*. El material en bruto se purificó mediante cromatografía en columna, para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo claro (6,54 g, 54 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7,71-7,33 (5H, m), 6,57 (2H, d, J = 15,6Hz), 5,01 (1H, m), 4,65 (2H, s), 3,32 (2H, m), 1,40 (3H, d, J = 5,4Hz), 0,93 (6H, m).

**Etapa 3** - Preparación de (2E)-3-(3-formilfenil)-N-(1-isobutoxi)etoxiacrilamida

El producto de la etapa 2 (6,5 g, 22 mmol) y dióxido de manganeso (9,6 g, 110 mmol) se agitaron en DCM (100 ml) a TA durante 16 horas. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró a sequedad para proporcionar el producto en forma de un sólido de color gris (4,8 g, 75 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 10,05 (1 H, s), 8,06 (1 H, s), 7,97-7,52 (4H, m), 6,55 (1 H, d), 5,05 (1 H, m), 3,35 (2H, m), 1,47-1,44 (3H, m), 0,94 (6H, m).

**Etapa 4** - Preparación de (2S)-ciclohexil[3-[(1E)-3-[(1-isobutoxi)etoxi]amino]-3-oxoprop-1-en-1-il]bencil]amino]acetato de ciclopentilo

El producto de la etapa 3 (0,3 g, 1,03 mmol) y el **Intermedio J1** (0,32 g, 1,22 mmol) se disolvieron en 1,2-dicloroetano (10 ml). Se cargó STAB (0,33 g, 1,56 mmol) y la reacción se agitó en nitrógeno durante 1 hora. Después, se inactivó con una solución de NaHCO<sub>3</sub> sat. (10 ml). La fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 10 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron a sequedad *al vacío* para dar el producto en forma de un aceite de color marrón (0,59 g, >100 %). m/z = 501 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapa 5** - Preparación de (2S)-ciclohexil[3-[(1E)-3-(hidroxiamino)-3-oxoprop-1-en-1-il]bencil]amino]acetato de ciclopentilo

Se añadió HCl 4N en dioxano (0,59 ml, 2,4 mmol) a una solución del producto de la etapa 4 (0,59 g, 1,2 mmol) en DCM y la reacción se agitó durante 3 horas. La reacción se concentró a sequedad *al vacío* para dar un aceite de color amarillo. La purificación mediante HPLC preparativa dio el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (11,5 mg, 2,4 %). Pureza mediante CLEM > 95 %, m/z = 400,5 [M+H]<sup>+</sup>, RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 10,75 (1 H, s), 9,03 (1 H, s), 7,25-7,51 (5H, m), 6,45 (1 H, d, J = 15,6Hz), 5,09 (1 H, m), 3,64 (2H, dd), 2,83 (1 H, m), 1,42-1,93 (13H, m), 0,92-1,25 (6H, m).

**El compuesto de la invención** (Ejemplo 62) se preparó usando la misma metodología que en el modelo de protocolo de síntesis anterior, pero usando intermedios diferentes:

Nombre químico	Intermedios usados	Datos analíticos
(2S)-ciclohexil[({6-[3-(hidroxiamino)-3-oxopropil]piridin-3-il}metil)amino]acetato de ciclopentilo	F, J1	Pureza mediante CLEM 93 %, m/z = 404 [M+H] <sup>+</sup> , RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, d <sub>6</sub> -DMSO) δ: 10,41 (1H, s), 8,70 (1H, s), 8,34 (1H, s), 7,59 (1H, d, J = 6Hz), 7,19 (1H, d, J = 7,8Hz), 5,08 (1H, m), 3,80-3,41 (2H, c), 2,92 (2H, t, J = 7,2Hz), 2,81 (1H, m), 2,37 (2H, t, J = 8,1Hz), 1,91-0,87 (19H, m).

### Medición de las actividades biológicas

#### Actividad de histona desacetilasa

- 5 La capacidad de los compuestos para inhibir las actividades de la histona desacetilasa se midió usando el ensayo de actividad fluorescente HDAC disponible comercialmente de Biomol. En resumen, el sustrato *Fluor de Lys*<sup>TM</sup>, una lisina con una acetilación epsilon-amino, se incubó con la fuente de actividad histona desacetilasa (extracto nuclear de HeLa) en presencia o ausencia de inhibidor. La desacetilación del sustrato sensibiliza al sustrato al desarrollador de *Fluor de Lys*<sup>TM</sup>, que genera un fluoróforo. Por lo tanto, la incubación del sustrato con una fuente de actividad de HDAC tiene como resultado un incremento de la señal que disminuye en presencia de un inhibidor de HDAC.

Los datos se expresan como un porcentaje del control, medido en ausencia de inhibidor, restandose la señal de fondo de todas las muestras, del modo siguiente:

$$\% \text{ de actividad} = [(S^i - B) / (S^o - B)] \times 100$$

- 15 donde S<sup>i</sup> es la señal en presencia del sustrato, enzima e inhibidor, S<sup>o</sup> es la señal en presencia de sustrato, enzima y el vehículo en que se disuelve el inhibidor, y B es la señal de fondo medida en ausencia de enzima.

Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron mediante análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados de ocho puntos de datos a la ecuación para una respuesta de dosis sigmoidea con una pendiente variable (% de actividad contra la concentración log del compuesto), usando el software Graphpad Prism.

- 20 La actividad histona desacetilasa de extracto nuclear bruto derivado de células HeLa se usó para cribado. La preparación, adquirida en 4C (Seneffe, Bélgica), se preparó a partir de células HeLa cosechadas en fase de crecimiento exponencial. El extracto nuclear se preparó de acuerdo con la metodología descrita por J. D. Dignam, Nucl. Acid. Res., 1983, 11, 1475-1489, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. La composición del tampón final fue Hepes 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,2 mM y glicerol al 20 % (v/v).

- 25 Los resultados de CI<sub>50</sub> se asignaron a uno de los 3 intervalos siguientes:

Intervalo A: CI<sub>50</sub> < 100 nM,  
Intervalo B: CI<sub>50</sub> de 101 nM a 1.000 nM;  
e Intervalo C: CI<sub>50</sub> > 1001 nM;  
na = no analizado.

- 30 Ensayo de inhibición de células U937 y HUT

Las líneas de células cancerosas (U937 y HUT) en crecimiento en fase log se cosecharon y se sembraron a 1.000 - 2.000 células/pocillo (100 µl volumen final) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Tras 24 horas de crecimiento, se trató a las células con el compuesto. A continuación, las placas se volvieron a incubar durante 72 - 96 horas más antes de realizar un ensayo de viabilidad celular WST-1 de acuerdo con las instrucciones de los proveedores (Roche Applied Science).

- 35 Los datos se expresaron como un porcentaje de la inhibición del control, medido en ausencia de inhibidor, del modo siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [(S^i / S^o) \times 100]$$

en la que S<sup>i</sup> es la señal en presencia de inhibidor y S<sup>o</sup> es la señal en presencia de DMSO.

- 40 Se generaron curvas de respuesta a la dosis de 8 concentraciones (concentración máxima final 10 µM, con diluciones por 3), usando 6 duplicados.

## ES 2 626 293 T3

Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron mediante análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados a la ecuación para una respuesta de dosis sigmoidea con una pendiente variable (% de actividad contra la concentración log del compuesto), usando el software Graphpad Prism.

Los resultados de  $CI_{50}$  se asignaron a uno de los 3 intervalos siguientes:

- 5      Intervalo **A**:  $CI_{50} < 330 \text{ nM}$ ,  
 Intervalo **B**:  $CI_{50}$  de 331 nM a 3.300 nM;  
 e Intervalo **C**:  $CI_{50} > 3301 \text{ nM}$ ;  
 na = no analizado.

### Ensayo de inhibición de células HeLa

- 10      Las células HeLa en crecimiento en fase log se cosecharon y se sembraron a 1.000 células/pocillo (200  $\mu\text{l}$  volumen final) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Tras 24 horas de crecimiento celular, se trató a las células con los compuestos (concentración final de 20  $\mu\text{M}$ ). Las placas se reincubaron después durante 72 horas adicionales antes de realizar un ensayo de viabilidad celular de sulforhodamina B (SRB) de acuerdo con la metodología descrita por Skehan et al, J. Natl. Cane. Inst., 1990, 82, 1107-1112.
- 15      Los datos se expresaron como un porcentaje de la inhibición del control, medido en ausencia de inhibidor, del siguiente modo:-

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [(S^i/S^o) \times 100]$$

en la que  $S^i$  es la señal en presencia de inhibidor y  $S^o$  es la señal en presencia de DMSO.

- 20      Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron mediante análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados de ocho puntos de datos a la ecuación para una respuesta de dosis sigmoidea con una pendiente variable (% de actividad contra la concentración log del compuesto), usando el software Graphpad Prism.

Los resultados de  $CI_{50}$  se asignaron a uno de los 3 intervalos siguientes:

- 25      Intervalo **A**:  $CI_{50} < 330 \text{ nM}$ ,  
 Intervalo **B**:  $CI_{50}$  de 331 nM a 3.300 nM;  
 e Intervalo **C**:  $CI_{50} > 3301 \text{ nM}$ ;

*Tabla de resultados:*

Ejemplo	Actividad de HDAC	Actividad de U937	Actividad de HUT	Actividad de HeLa
<b>62</b>	A	A	A	na
<b>"na" significa "no analizado hasta la fecha".</b>				

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es (2S)-ciclohexil[({6-[3-(hidroxiamino)-3-oxopropil]piridin-3-il}metil)amino]acetato de ciclopentilo, o una sal, N-óxido, hidrato o solvato del mismo.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es (2S)-ciclohexil[({6-[3-(hidroxiamino)-3-oxopropil]piridin-3-il}metil)amino]acetato de ciclopentilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es (2S)-ciclohexil[({6-[3-(hidroxiamino)-3-oxopropil]piridin-3-il}metil)amino]acetato de ciclopentilo.
4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición es para administración oral en forma de comprimido, cápsula, polvo, gránulo, pastilla para chupar o preparación en líquido o en gel.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de enfermedades por proliferación celular, enfermedades de poliglutamina, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazo al trasplante de órganos, diabetes, trastornos hematológicos o infección.
- 15 7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el tratamiento es de proliferación de células cancerosas, enfermedad de Huntington o enfermedad de Alzheimer.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de cáncer, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, esclerosis múltiple, diabetes, dermatitis atópica, enfermedad del injerto contra el huésped, lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.
- 20 9. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento es de artritis reumatoide.
10. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de proliferación celular, enfermedades de poliglutamina, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazo al trasplante de órganos, diabetes, trastornos hematológicos o infección.
- 25 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el tratamiento es de proliferación de células cancerosas, enfermedad de Huntington o enfermedad de Alzheimer.
12. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, esclerosis múltiple, diabetes, dermatitis atópica, enfermedad del injerto contra el huésped, lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.
- 30 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el tratamiento es de artritis reumatoide.