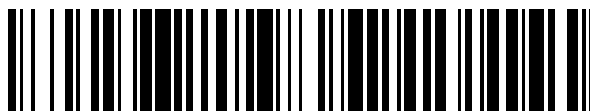


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 733**

51 Int. Cl.:

C07C 251/60 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2015** **PCT/EP2015/071178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016** **WO16042010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2015** **E 15775638 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 3194360**

54 Título: **Derivados de 4-oxo-N-(4-hidroxifenil)retinamida como agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

17.09.2014 IT MI20141603

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2018

73 Titular/es:

FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI TUMORI (50.0%)

Via Giacomo Venezian 1

20133 Milan, IT y

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO (50.0%)

72 Inventor/es:

DAIDONE, MARIA GRAZIA;

APPIERTO, VALENTINA;

TIBERIO, PAOLA;

DALLAVALLE, SABRINA;

MUSSO, LOANA y

NICCOLINI, ELISA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 686 733 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

Derivados de 4-oxo-N-(4-hidroxifenil)retinamida como agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer

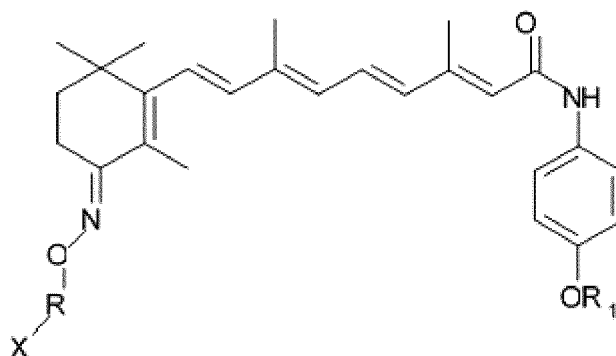
La presente invención se refiere a derivados de 4-oxo-fenretinida, formulaciones que los contienen, y su uso en la prevención y tratamiento de cáncer, ya sean solos o en combinación con otros compuestos.

- 5 Los retinoides son derivados naturales y sintéticos de vitamina A (retinol) que modulan diversos procesos celulares, tales como proliferación, diferenciación y apoptosis. La fenretinida de retinoide sintética o N-(4-hidroxifenil)retinamida (4-HPR) (Nagy L. et al., Cell Death Differ 5: 11-19; 1998) es un análogo no tóxico de Ácido Todo-Trans Retinoico (ATRA), (Veronesi U. et al., J Natl Cancer Inst 91: 1847-1856; 1999) que ha proporcionado resultados prometedores para trastornos preneoplásicos (Chiesa F. et al., Int J Cancer 115: 625-629; 2005; Moglia D. et al. Cancer Lett 110: 87-91; 1996; Tradati N et al., 1994) y neoplásicos (Veronesi U. et al., Ann Oncol 17: 106-171; 2006; De Palo G. et al., Gynecol Oncol 86: 24-27; 2002). Los estudios llevados a cabo *in vitro* han demostrado que 4-HPR inhibe la proliferación e induce apoptosis en las estirpes de células tumorales de diversos histotipos, y se han propuestos diversos mecanismos, tales como generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) y posterior estrés oxidativo (Hail N. et al., Apoptosis 11:1677-1694; 2006; Appierto V. et al., Carcinogenesis 30:824-831; 2009).
- 10 4-oxo-N-(4-hidroxifenil)retinamida o 4-oxo-4-HPR es un metabolito polar natural de 4-HPR, identificado en muestras de plasma de pacientes tratados con 4-HPR y en el medio de células cancerígenas tratadas con 4-HPR (Villani M.G. et al., Clin Cancer Res 10:6265-75; 2004). 4-oxo-4-HPR induce efectos antiproliferativos y apoptóticos en diversas estirpes celulares cancerígenas (es decir, estirpes celulares de neuroblastoma, cáncer de ovario y mama) y es de dos a cuatro veces más efectivo que 4-HPR en la inhibición de la proliferación celular. De manera interesante, 4-oxo-4-HPR también es efectivo en células cancerígenas resistentes a 4-HPR y, en combinación con 4-HPR, muestra un efecto sinérgico (Villani M.G. et al., Cancer Res 66: 3238-47; 2006). Los estudios moleculares han demostrado que el efecto antitumoral de 4-oxo-4-HPR se debe a al menos dos mecanismos de acción independientes: 1) 4-oxo-4-HPR, a diferencia de 4-HPR y otros retinoides, inhibe la polimerización de tubulina, causando a marcada acumulación de células en fase mitótica, acopladas con formación aberrante del huso (es decir, organización multipolar sin pérdida de integridad del centrosoma). 2) Por otro lado, de forma similar a 4-HPR, 4-oxo-4-HPR provoca la apoptosis a través de una cascada de señalización relacionada con ROS que implica respuesta a estrés del retículo endoplásmico (ER), activación de quinasas N-terminal de Jun (JNK) y sobre-regulación de la proteína morfogenética ósea PLAcental (PLAB) (Appierto V. et al., Oncogene; 26:3952-62; 2007; Appierto V. et al., Carcinogenesis 30:824-31; 2009; Tiberio P. et al. PLoS One; 5(10):e13362; 2010). También se ha descrito 4-oxo-4HPR como agente antitumoral en el documento WO2005092314. La capacidad de 4-oxo-4-HPR para actuar a través de al menos dos mecanismos no relacionados podría proporcionar una explicación a la capacidad del retinoide para ser más potente que el fármaco parental y podría probablemente permitir contrarrestar el desarrollo de resistencia al fármaco. Además, este modo distintivo puede permitir que 4-oxo-4-HPR actúe sobre diferentes tipos de tumores humanos de forma más eficiente que 4-HPR. Además, el tratamiento combinado de 4-oxo-4-HPR con otros agentes antimicrotúbulo (tales como alcaloides de vinca y taxanos, que poseen elevada toxicidad y frentes a los cuales se desarrolla resistencia de forma sencilla) o fármacos quimioterapéuticos convencionales podría permitir la disminución de las dosis de estos agentes y, a continuación, reducir sus efectos secundarios.

40 Sin embargo, 4-oxo-4-HPR presenta solubilidad muy baja y se encontraron concentraciones del retinoide en plasma muy bajas y altamente variables en experimentos llevados a cabo *in vivo*, lo que impide la reproducibilidad de los resultados y su posible uso clínico.

Los derivados de acuerdo con la invención poseen una mayor solubilidad en fluidos biológicos y por tanto, mejor biodisponibilidad, al tiempo que mantienen la actividad citotóxica y los mecanismos de acción de 4-oxo-4-HPR.

La presente invención se refiere a compuestos que tienen la formula (I) siguiente y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



(I)

en la que:

X es -COOH o NH₂, preferentemente -COOH;

R es una cadena de alquileo C₁-C₁₀ lineal o ramificada, preferentemente una cadena de alquileo C₁-C₆ lineal o ramificado, más preferiblemente -CH₂-;

- 5 R₁ es H, alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado, preferentemente C₁-C₆, arilo, o R₂CO-donde R₂ es un alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado, preferentemente C₁-C₆, o arilo.

"Cadena de alquileo C₁-C₁₀ lineal o ramificada" significa una cadena de alquilo bivalente que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, tales como -(CH₂)_n- en la que n es un número de 1 a 10, o cadenas ramificadas tales como -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-CH₂-CH₂- y similares.

- 10 Dicha "cadena de alquileo" puede opcionalmente estar sustituida por uno o más sustituyentes, tales como hidroxilo, halógeno, amino y similares.

R es preferentemente una cadena de alquileo C₁-C₆ lineal, más preferentemente -CH₂-.

La expresión "alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado" se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

- 15 La expresión "alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado" se refiere a grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, isobutilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo y similares.

- 20 El término "arilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático que tiene de 6 a 14 átomos de carbono y un anillo individual (tal como fenilo), o varios anillos, tales como naftilo, fenantrenilo, bifenilo y similares. Dicho "arilo" puede tener de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados entre hidroxilo, halógeno, haloalquilo, ciano, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ y similares.

R₁ es preferentemente H.

- 25 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula (I) en la que X es -COOH son aquellas con bases inorgánicas, tales como sodio, potasio, litio, hidróxidos de calcio y magnesio, o con aminas orgánicas apropiadas o amino ácidos, tales como sales de arginina y procaína. La sal de sodio es particularmente preferida.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula (I) en la que X es -NH₂ son aquellas con un ácido apropiado, por ejemplo ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, maleico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, acético o ácido p-toluensulfónico.

Los compuestos preferidos son:

- 30 Compuesto **1a**:
2-[3-[(1E,3E,5E,7E)-9-(4-hidroxianilino)-3,7-dimetil-9-oxo-nona-1,3,5,7-tetraenil]-2,4,4-trimetil-ciclohex-2-en-1-ilideno]amino]oxiacetato de sodio (4-aminooxiacetato de sodio-4-HPR);
Compuesto **1b** (LOM1098):
35 2-[3-[(1E,3E,5E,7E)-9-(4-hidroxianilino)-3,7-dimetil-9-oxo-nona-1,3,5,7-tetraenil]-2,4,4-trimetil-ciclohex-2-en-1-ilideno]amino]oxibutirato o butanoato de sodio (4-aminooxibutirato de sodio-4-HPR);
Compuesto **1c** (LOM1133):
2-[3-[(1E,3E,5E,7E)-9-(4-hidroxianilino)-3,7-dimetil-9-oxo-nona-1,3,5,7-tetraenil]-2,4,4-trimetil-ciclohex-2-en-1-ilideno]amino]oxihexanoato de sodio (4-aminooxihexanoato de sodio-4-HPR);

- 40 La presente invención comprende todos los posibles estereoisómeros y las mezclas racémicas u ópticamente activas de los mismos.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención presentan actividad antimitótica que les convierte en particularmente interesantes para el tratamiento de tumores de elevada proliferación. Además, los compuestos de acuerdo con la invención mantienen el mecanismo de acción dual de 4-oxo-4-HPR y, por tanto, pueden usarse para tratar tumores resistentes a fármacos.

- 45 Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden usar como fármacos antitumorales para diferentes tumores y, específicamente, para tumores hematológicos y sólidos de proliferación activa (ya sean metastásicos o no) y tumores resistentes a fármacos, incluyendo pero sin limitarse a cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, mesotelioma y otros sarcomas, estirpes celulares de neuroblastoma, linfoma, leucemia y melanoma.

- 50 En ensayos clínicos se ha observado que los derivados de retinol (tales como fenretinida) provocan menos toxicidad que los agentes quimioterápicos clásicos, y los datos preliminares obtenidos *in vivo* con la sal de 4-aminooxiacetato de sodio-4-HPR (1a) parece que demuestran que la toxicidad de este compuesto no es grave.

Otro objetivo de la invención es la combinación de los compuestos de acuerdo con la invención con otros compuestos y, por ejemplo, con otros fármacos antimitóticos (ya sean de estabilización o despolimerización de tubulina), con compuestos usados en quimioterapia convencional (tales como derivados de platino), con otros retinoides (en particular 4-HPR), con fármacos epigenéticos (en particular inhibidores de HDAC) y con fármacos destinados a dianas específicas (ya sean tumorales o no tumorales) (tales como trastuzumab para cáncer de mama HER2-positivo).

Otro objetivo de la invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) como principio activo y al menos un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente activo. El vehículo o diluyente farmacéuticamente activo está seleccionado sobre la base del procedimiento de administración recomendado y el conocimiento de la tecnología farmacéutica convencional disponible para la persona experta en el campo.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener vehículos biológicamente compatibles apropiados para administración a animales, tales como disolución salina, y opcionalmente sustancias auxiliares tales como excipientes, estabilizadores o diluyentes.

Dichas composiciones farmacéuticas se preparan preferentemente en forma de una dosis unitaria para administración oral, rectal, percutánea o parenteral. Los compuestos de acuerdo con la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que se puede determinar por parte de la persona experta en el campo, en base al peso del paciente, la edad y estado de salud, la frecuencia del tratamiento y cualesquiera tratamientos concomitantes.

Si se combinan con otros agentes, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden administrar de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden.

4-aminoxiacetato de sodio-4-HPR (sal 1a) tiene una capacidad satisfactoria para inhibir la proliferación de células tumorales (procedentes de tumores tanto sólidos como hematológicos), que se ha demostrado que es similar a la del fármaco parental, 4-oxo-4-HPR, en estirpes celulares de cáncer de ovario y mama y en mesotelioma de peritoneo, neuroblastoma células de linfoma (Tabla 1). El análisis del mecanismo de acción demostró que la sal 1a conserva la característica específica de 4-oxo-4-HPR de inducción de la muerte celular mediante activación de dos mecanismos independientes: la generación de ROS (actividad pro-apoptótica) y la parada del ciclo celular durante la fase mitótica (actividad antitubulina) (Figura 1). Además, los experimentos preliminares con tratamiento combinado demuestran que la sal 1a tiene una actividad sinérgica con plactaxel, cisplatino y 4-HPR en estirpes celulares tumorales de diferentes histotipos (Figura 2).

Para establecer si la sal 1a posee mayor solubilidad/biodisponibilidad que el compuesto parental, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* en modelos de ratón. Los resultados demuestran que la sal es más soluble que el compuesto parental y alcanza niveles de plasma hasta 60 veces mayores que 4-oxo-4-HPR y menos variabilidad (Tabla 2). Además, la acumulación del compuesto en proximidad con el sitio de inoculación observado en los ratones tratados con 4-oxo-4-HPR no se encontró en aquellos relacionados con la sal. Durante los experimentos para determinar los niveles de plasma de la sal 1a, se encontró que el compuesto no poseía elevada toxicidad para los animales cuando se administró a dosis diarias de 60 a 100 mg/kg.

La actividad antitumoral de la sal 1a se evaluó *in vivo* en ratones sometidos a xenoinjerto con células de mesotelioma humano (STO), cáncer de ovario (IGROV-1) y cáncer de mama (MDA-MB-231). Se evaluó la actividad de la sal 1a sobre células de mesotelioma en el primer experimento: el experimento mostró la tendencia de actividad del compuesto, aunque no alcanzó significación estadística (probablemente debido a la elevada variabilidad de la proliferación tumoral en los ratones del grupo de control) (Figura 3a). En lo que respecta al modelo de ovario, a las dosis de 60 y 90 mg/kg, la sal 1a aumentó significativamente la supervivencia de los ratones inoculados con células IGROV-1 ($p < 0,01$) sin signos evidentes de toxicidad grave (Figura 3b). Finalmente, en lo que respecta al modelo de cáncer de mama, se observó que la dosis de 90 mg/kg de sal 1a redujo la proliferación tumoral ($p = 0,01$) (Figura 3c) sin signos evidentes de toxicidad grave.

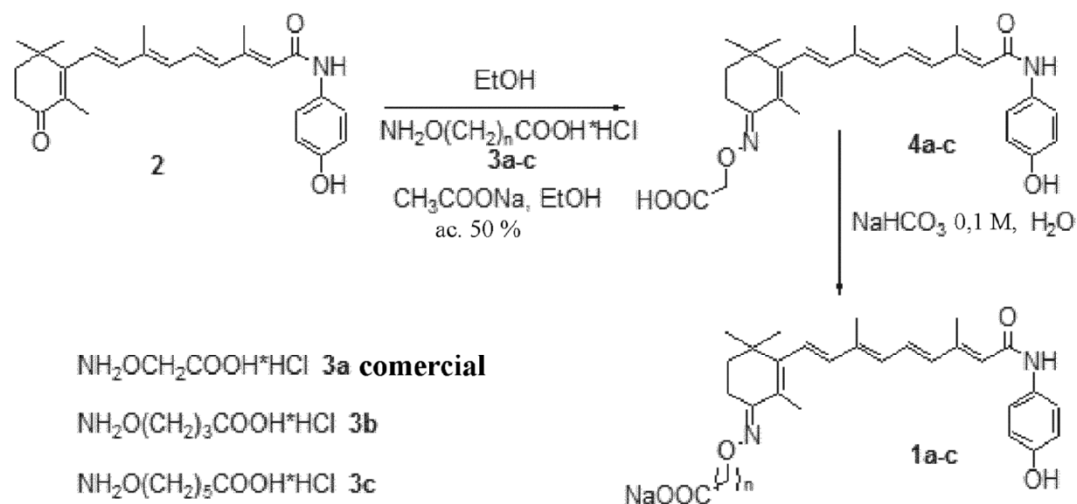
Los compuestos 1b (4-aminooxibutirato-4-HPR de sodio) y 1c (4-aminooxihexanoato-4-HPR de sodio) también se sometieron a ensayo en cuanto a actividad antitumoral *in vitro*: la capacidad de ambos compuestos para inhibir la proliferación tumoral fue similar a la de 4-aminooxiacetato-4-HPR de sodio (Tabla 3).

El compuesto (4-hidroxi-fenil)amida de ácido 9-[3-(2-amino-etoxiimino)-2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil]-3,7-dimetilnona-2,4,6,8-tetraenoico (1d) también se sometió a ensayo *in vitro* en cuanto a actividad antitumoral. En células de cáncer de ovario (A2780), el compuesto 1d indujo una parada de ciclo en G2-M acoplado con actividades antiproliferativas (IC_{50} tras 72 horas de tratamiento = 0,9548 μM) y apoptótica (pico sub-G1).

Los compuestos de acuerdo con la presente invención en los que X es -COOH se pueden preparar, por ejemplo, como se ejemplifica en el esquema de reacción, haciendo reaccionar el compuesto **2** (4-oxo-4-HPR) con un amino oxiácido apropiado, típicamente **3a-c**, y acetato de sodio, en un disolvente tal como etanol acuoso (como se describe en la referencia: J. Med. Chem. 2004, 47, 6716-6729). Los compuestos obtenidos de este modo se hacen reaccionar posteriormente con una disolución acuosa de una base, típicamente bicarbonato de sodio 0,1 M, proporcionando

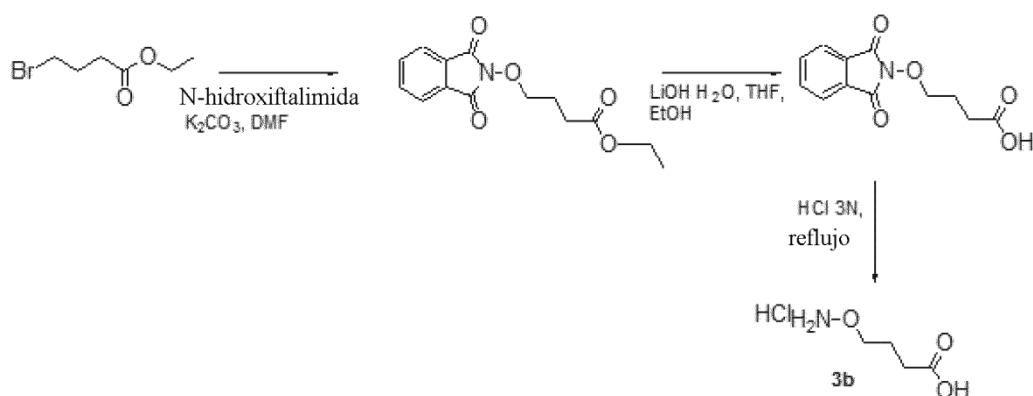
sales **1a-c** una vez que se ha retirado el agua (Esquema 1).

Esquema 1:

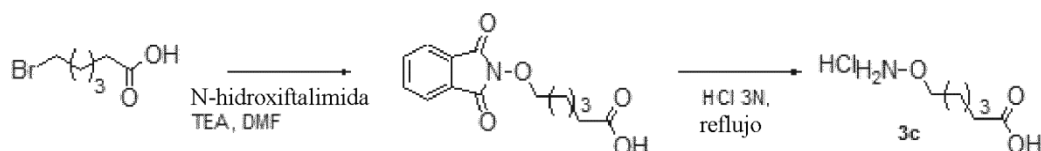


Se pueden preparar amino oxiácidos 3b y 3c por medio de los procedimientos presentados en los esquemas 2 y 3, respectivamente.

Esquema 2:

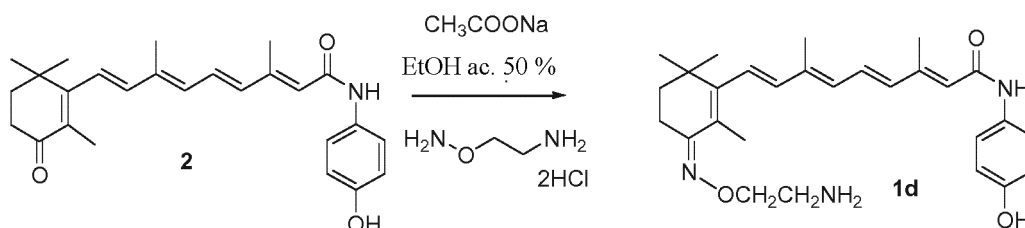


Esquema 3



Se pueden preparar los compuestos de fórmula (I) en la que X es NH_2 , por ejemplo, como se ejemplifica en el esquema de reacción 4, haciendo reaccionar el compuesto 2 (4-oxo-4-HPR) con dihidrocloruro de 2-aminoalcoxiamina tal como 2-aminoetoxiamina y acetato de sodio, en un disolvente tal como etanol acuoso.

Esquema 4



Se pueden obtener todos los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con los esquemas de reacción anteriores por medio de variación apropiada de los reactivos y los compuestos de partida. Los compuestos de partida se conocen o se pueden obtener a partir de compuestos comerciales por medio de reacciones conocidas por la persona experta.

5 Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación del compuesto 1a:

Se añadieron 17 ml de una solución de $\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{COOH} \cdot 1/2\text{HCl}$ (3a, 410 mg, 3,75 mmoles) y CH_3COONa (166 mg, 2,39 mmoles) en EtOH acuoso al 50 % a una suspensión del compuesto 2 (4-oxo-4-HPR, 700 mg, 1,73 mmoles) en EtOH (11 ml). Se mantuvo la reacción bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Después, el disolvente se retiró a baja presión y el residuo se diluyó con H_2O fría (20 ml), se trituró y finalmente se filtró a vacío. Se obtuvieron 739 mg (1,54 mmoles) del compuesto 4a (4-(carboximatoxiimino)fenretinida). Rendimiento: 89 %

Punto de fusión: 121,8 °C

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 7,43 (2H, d, J = 8,2 Hz); 7,08 (1H, s); 6,99 (1H, dd, J = 11,60; 14,6 Hz); 6,82 (2H, d, J = 8,2 Hz); 6,44-6,16 (4H, m); 5,82 (1H, s); 5,32 (2H, s); 2,72 (2H, t, J = 6,4 Hz); 2,44 (3H, s); 2,04 (3H, s); 1,91 (3H, s); 1,65 (2H, t, J = 6,4); 1,12 (6H, s).

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ : 9,78 (1H, s); 9,16 (1H, s a); 7,42 (2H, J = 8,24 Hz); 7,05-6,89 (1H, m); 6,68 (2H, d, J = 8,24); 6,47-6,24 (4H, m); 6,00 (1H, s); 4,57 (2H, s); 2,67-2,55 (2H, m); 2,33 (3H, s); 2,00 (3H, s); 1,82 (3H, s); 1,82 (3H, s); 1,63-1,49 (2H, m); 1,07 (6H, s).

Se añadieron 15,4 ml de una solución 0,1N de NaHCO_3 a una suspensión de 4a (739 mg, 1,54 mmoles) en 10 ml de H_2O . La reacción se dejó en agitación durante aproximadamente 22 horas. Después, el disolvente se retiró a baja presión. Se obtuvieron 760 mg (1,52 mmoles) del compuesto 1a. Rendimiento: 99 %

Punto de fusión: 188,6 °C (con dec.)

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ : 9,8 (1H, s); 9,38 (1H, s a); 7,42 (2H, d, J = 8,2 Hz); 6,97 (1H, dd, J = 14,3; 11,60 Hz); 6,68 (2H, d, J = 8,2 Hz); 6,44-6,24 (4H, m); 6,01 (1H, s); 4,12 (2H, s); 2,61-2,53 (2H, m); 2,32 (3H, s); 2,00 (3H, s); 1,82 (3H, s); 1,58-1,47 (2H, m); 1,05 (6H, s).

Ejemplo 2 - Preparación del compuesto 1b:

Se añadieron 0,5 ml de una solución de 3b (17 mg, 0,11 mmoles) y CH_3COONa (5 mg, 0,07 mmoles) en EtOH acuoso al 50 % a una suspensión del compuesto 2 (20 mg, 0,05 mmoles) en EtOH (0,5 ml). Se mantuvo la reacción bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se retiró a baja presión, el residuo se recogió con acetato de etilo, y la solución se lavó con H_2O y se secó sobre Na_2SO_4 . El producto en bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía de preparación en CH_2Cl_2 : CH_3OH 95: 5. Se obtuvieron 20 mg (0,04 mmoles) del compuesto 4b.

(4-(carboxipropoxiimino)fenretinida) (vidrio amarillo). Rendimiento: 80 %

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 7,39 (2H, m); 7,12 (1H, s); 6,96 (1H, dd, J = 10,6, 14,4); 6,78 (2H, m); 6,37-6,14 (4H, m); 5,80 (1H, s); 4,18 (2H, t, J = 6,0); 2,60 (2H, t, J = 6,6); 2,50 (2H, t, J = 7,3); 2,41 (3H, s); 2,07-1,97 (2H, m); 2,02 (3H, s); 1,90 (3H, s); 1,89-1,76 (2H, m); 1,07 (6H, s).

Se añadieron 280 μl de una solución 0,1N de NaHCO_3 a una suspensión de 4b (18 mg, 0,035 mmoles) en 0,5 ml de H_2O . La reacción se dejó en agitación durante aproximadamente 20 horas. Después, el disolvente se retiró a baja presión. Se obtuvieron 15 mg (0,028 mmoles) del compuesto 1b (sal de sodio de 4-(carboxipropoxiimino)fenretinida). Rendimiento: 81 %.

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ : 9,80 (1H, s); 7,40 (2H, m); 6,95 (1H, dd, J = 11,4, 14,4); 6-6,6 (2H, m); 6,42-6,24 (4H, m); 5,99 (1H, s); 3,97 (2H, t, J = 6,5); 2,31 (3H, s); 1,98 (3H, s); 1,92-1,79 (2H, m); 1,83 (3H, s); 1,79-1,63 (2H, m); 1,51 (2H, t, J = 7,2); 1,04 (6H, s).

Preparación del compuesto 3b (hidrocloruro de ácido 4-aminooxibutírico): 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)butirato de etilo.

Se añadieron N-hidroxifitalimida (1,11 g, 6,64 mmoles) y K_2CO_3 (1,84 g, 13,28 mmoles) a una solución de 4-bromobutirato de etilo (1 ml, 6,64 mmoles) en DMF anhidro (6,5 ml). La solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Cuando se había evaporado el disolvente, la mezcla de reacción se recogió con acetato de etilo y se lavó con una solución saturada de NaCl . La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente

se evaporó. El producto se cristalizó a partir de isopropanol (1,67 g). Rendimiento: 91 %.

Punto de fusión: 48,5 °C

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,86 (4H, m); 4,16 (2H, t, J = 6,4); 4,07 (2H, t, J = 7,0); 2,53 (2H, t, J = 7,3); 1,97-1,84 (2H, m); 1-19 (3H, t, J = 7,0).

5 *Ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)butírico.*

Se añadió una solución de LiOH·H₂O (0,8 g, 19,1 mmoles) en etanol (5,8 ml) y H₂O (5,8 ml) a una solución de 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)-butirato de etilo (1,65 g, 5,97 mmoles) en THF (18 ml), y la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante la noche. Cuando se hubieron evaporado los disolventes, se añadió una solución 6N de HCl (6 ml) y el producto bruto se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron con Na₂SO₄. A continuación se cristalizó el producto a partir de acetato de etilo. Se obtuvieron 1,1 g de producto. Rendimiento: 74 %.

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 11,25 (1H, s a); 7,83 (1H, d, J = 7,0); 7,65-7,48 (2H, m); 7,39 (1H, d, J = 7,3); 3,89 (2H, d, J = 7,3); 2,4 (2H, t, J = 7,3); 1,89-1,74 (2H, m).

Hidrocloreto de ácido 4-aminooxi-butírico. Se calentó una suspensión de *ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-iloxi)-butírico* (400 mg, 1,61 mmoles) en una solución 3N de HCl (2 ml) a reflujo durante 2 horas. Se filtró el ácido ftálico, se evaporó el filtrado y el producto se cristalizó a partir de metanol. Se obtuvieron 166 mg de producto 3b. Rendimiento: 66 %.

Punto de fusión: 140 °C

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 10,89 (3H, s a); 4,00 (2H, d, J = 6,4); 2,31 (2H, t, J = 7,3); 1,88-1,73 (2H, m).

- 20 Referencias: Cyclic hydroxamates, especially multiply substituted [1,2]oxazinan-3-ones, Wolfe, Saul et al. Canadian Journal of Chemistry, 81(8), 937-960; 2003; Method for the synthesis of oxazinone amino acid derivatives, Wolfe, Saul et al. PCT Int. Appl., 2003018565, 06 Mar 2003.

Ejemplo 3 - Preparación del compuesto 1c:

Se añadieron 0,65 ml de una solución de 3c (27 mg, 0,15 mmoles) y CH₃COONa (7 mg, 0,1 mmoles) en 50 % de EtOH acuoso a una suspensión del compuesto 2 (30 mg, 0,07 mmoles) en EtOH (0,56 ml). La reacción se puso bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se retiró a baja presión, el residuo se recogió con acetato de etilo, y la solución se lavó con H₂O y se secó sobre Na₂SO₄. A continuación, se purificó el producto bruto por medio de cromatografía de preparación en CH₂Cl₂:CH₃OH 95:5. Se obtuvieron 16 mg (0,03 mmoles) del compuesto 4c (4-(carboxipentoxiimino) fenretinida). Rendimiento: 43 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,41 (2H, m); 7,14 (1H, s); 7,07-6,90 (1H, m); 6,80 (2H, m); 6,41-6,13 (4H, m); 5,82 (1H, s); 4,12 (2H, t, J = 6,1); 2,62 (2H, t, J = 6,4); 2,49-2,3 (2H, m); 2,43 (3H, s); 2,03 (3H, s); 1,92 (3H, s); 1,82-1,40 (8H, m); 1,09 (6H, s).

Se añadieron 280 µl de una solución 0,1N de NaHCO₃ a una suspensión del compuesto 4c (15 mg, 0,028 mmoles) en 0,5 ml de H₂O. La reacción se dejó en agitación durante aproximadamente 20 horas. Después, el disolvente se retiró a baja presión. Se obtuvieron 11 mg (0,02 mmoles) del compuesto 1c. Rendimiento: 71 %.

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 9,84 (1H, s); 7,40 (2H, m); 7,02-6,86 (1H, m); 6,66 (2H, m); 6,44-6,23 (4H, m); 6,00 (1H, s); 3,98 (2H, t, J = 6,0); 2,31 (3H, s); 2,11-2,03 (2H, m); 1,98 (3H, s); 1,83 (3H, s); 1,83 (3H, s); 1,88-1,74 (2H, m); 1,64-1,34 (2H, m); 1,32-1,17 (2H, m) 1,03 (6H, s).

Preparación del compuesto 2c (ácido 6-aminooxi hexanoico):

Ácido 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-iloxi)-hexanoico. Se añadieron N-hidroxiftalimida (2,44 g, 15 mmoles) y trietilamina (6,3 ml, 45 mmoles) a una solución de ácido 6-bromohexanoico (3 g, 15 mmoles) en DMF anhidro (30 ml). La solución se dejó bajo agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Se filtró el precipitado formado y, cuando se hubo evaporado el disolvente, se purificó el producto bruto sobre Sephadex LH-20 con una mezcla 3:1:1 de hexano: acetona: éter etílico. Se obtuvieron 2,2 g de producto. Rendimiento: 53 %.

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,95-7,68 (4H, m); 4,23 (2H, t, J = 6,4); 2,43 (2H, t, J = 7,0); 1,93-1,68 (4H, m); 1,67-1,51 (2H, m).

Ácido 6-aminooxi-hexanoico. Se calentó una suspensión de *ácido 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-iloxi)-hexanoico* (120 mg, 0,43 mmoles) en una solución 3N de HCl (2 ml) a reflujo durante 3 horas. El precipitado se retiró por filtración, se evaporó el agua y se cristalizó el producto a partir de metanol. Se obtuvieron 66 mg de producto 3b. Rendimiento: 84 %.

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 10,88 (3H, s a); 3,95 (2H, t, J = 6,3); 2,18 (2H, t, J = 7,3); 1,62-1,41 (4H, m); 1,36-1,20 (2H, m).

Ejemplo 4 - Preparación del compuesto 1d:

Se trató una suspensión del compuesto 2 (23 mg, 0,05 mmoles) en etanol (500 µl) con una solución de dihidrocloruro de 2-aminoetoxiamina (16 mg, 0,11 mmoles) y acetato de sodio anhidro (6 mg, 0,07 mmoles) en etanol acuoso al 50 % (500 µl). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se

retiró a presión reducida y se purificó el material bruto por medio de cromatografía de preparación RP-18 en CH₃OH/H₂O 9: 1 para dar 18 mg de compuesto 1d. Rendimiento: 76 %. p.f. 134 °C.

¹H RMN (CH₃OH-d₄) δ: 7,37 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,05 (1H, dd, *J* = 11,3, 14,6), 6,74 (2H, d, *J* = 8,5), 6,48-6,20 (4H, m), 5,99 (1H, s), 4,33-4,25 (2H, m), 3,28-3,22 (2H, m), 2,70 (2H, t, *J* = 6,41 Hz), 2,37 (3H, s), 2,04 (s, 3H), 1,91 (3H, s), 1,62 (2H, t, *J* = 6,4).

Ejemplo 5 - Experimentos farmacológicos

Experimentos in vitro

Se evaluó la actividad antiproliferativa de diversos compuestos 1a-c (tanto en monoterapia como en tratamiento combinado) sobre diferentes estirpes celulares tumorales por medio de ensayo B de sulforodamina tras 72 horas de tratamiento, y se calculó la dosis capaz de inhibir el 50 % de proliferación (IC₅₀) para la monoterapia (los resultados se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 3), mientras que se determinó el índice de Kern (KI) como el índice de refracción de sinergismo/antagonismo para el tratamiento combinado (los resultados se muestran en la Figura 2).

Con respecto a la evaluación del mecanismo de acción, se determinó la generación ROS tras 5 horas de tratamiento con el uso de una sonda de diacetato de 5-(and -6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA), al tiempo que se evaluó el ciclo celular por medio de tinción con yoduro de propidio. Se llevó a cabo el análisis citofluorimétrico (FACS) en ambos casos.

Experimentos in vivo

Para evaluar los niveles de plasma de la sal 1a, se administraron 4-oxo-4-HPR (120 mg/kg) y sal 1a (4-aminooxiacetato de sodio-4-HPR) (60 y 100 mg/kg) i.p. a ratones atímicos durante 4 días consecutivos (una vez al día), y se evaluaron los niveles de plasma por medio de HPLC 5 horas después de la última administración (los resultados se resumen en la Tabla 2).

Con respecto a mesotelioma, se inocularon los ratones s.c. con células STO y el tratamiento con la sal 1a comenzó un día después de la inoculación con células tumorales (dosis: 30 y 60 mg/kg i.p.; 5 días/semana durante 4 semanas). Se trataron los ratones de control con el mismo disolvente que se usó para disolver la sal. Se examinaron los animales dos veces por semana para comprobar el peso y cualquier signo de toxicidad. Se evaluó el crecimiento tumoral en los diversos grupos (control y tratado) y se analizaron estadísticamente las diferencias (los resultados se muestran en la Figura 3a).

Para el modelo de ovario, se inocularon los ratones atímicos s.c. con células IGROV-1 y el tratamiento con la sal 1a comenzó un día después de la inoculación con células tumorales (dosis: 30, 60 y 90 mg/kg i.p.; 5 días/semana durante 4 semanas). Se trataron los ratones de control con el mismo disolvente que se usó para disolver la sal. Se examinaron los animales dos veces por semana para comprobar el peso y cualquier signo de toxicidad. Se evaluó el tiempo de supervivencia de los diversos grupos (control y tratado) y se analizaron estadísticamente las diferencias. Se llevaron a cabo los experimentos por duplicado, y se obtuvieron resultados comparables (los resultados se muestran en la Figura 3b).

Por lo que respecta al modelo de cáncer de mama, se inocularon células de cáncer de mama humanas (MDA-MB-231) en un lecho de grasa de mama de ratones NOD/SCID-gamma, y el tratamiento con la sal 1a comenzó una semana tras la inoculación de la célula tumoral (dosis: 90 mg/kg; 4 días/semana durante 5 semanas). Se examinaron los animales dos veces por semana para comprobar el peso y cualquier signo de toxicidad. Se evaluó el crecimiento del tumor en los diversos grupos (control y tratado), y se analizaron estadísticamente las diferencias. Se llevaron a cabo los experimentos por duplicado, y se obtuvieron resultados comparables (los resultados se muestran en la Figura 3c).

Tabla 1. Actividad antiproliferativa de la sal 1a en diferentes estirpes de células tumorales

Estirpe de célula tumoral CI ₅₀ (μM)	
<u>Ovario</u>	
A2780	2,78
IGROV-1	3,82
SKOV-3	5,96
<u>Mama</u>	
T47-D	3,95

(continuación)

Estirpe de célula tumoral CI_{50} (μM)

MDA-MB-231 3,97

BT-474 3,69

Neuroblastoma

SK-N-BE 1,55

SK-N-SH 1,9

Sk-N-5Y 1,3

Mesotelioma

STO 1,48

MESO 1,28

Linfoma

JVM-2 1,11

Tabla 2. Niveles de plasma *in vivo*

Compuesto	Dosis	Nivel de plasma
4-OXO-4-HPR	120 mg/Kg	0,8 $\mu M \pm 0,4$
Sal 1a	60 mg/Kg	60,3 $\mu M \pm 2,52$
Sal 1a	100 mg/Kg	63,7 $\mu M \pm 2,08$

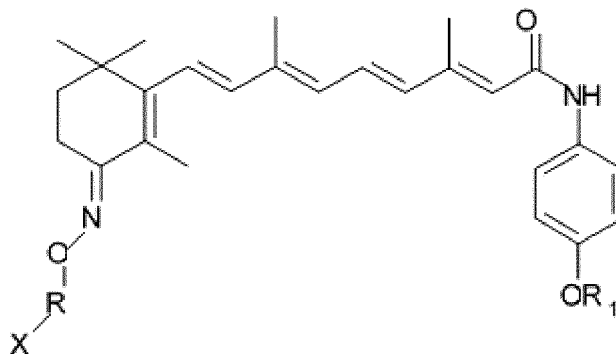
4-oxo-4-HPR: 5 % de SDS, 5 % cremofor, H₂O.Sal 1a: 5 % de SDS, H₂O.

- 5 **Tabla 3.** Actividad antiproliferativa de las sales 1b (LOM1098) y 1c (LOM1133) en diferentes estirpes de células tumorales

Estirpe de célula tumoral	CI_{50} (μM)	
	LOM1098	LOM1133
<u>Ovario</u>		
A2780	3,59	2,37
IGROV-1	3,54	2,19
<u>Mama</u>		
T47-D	4,20	3,00
MDA-MB-231	4,26	2,95

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(I)

en la que:

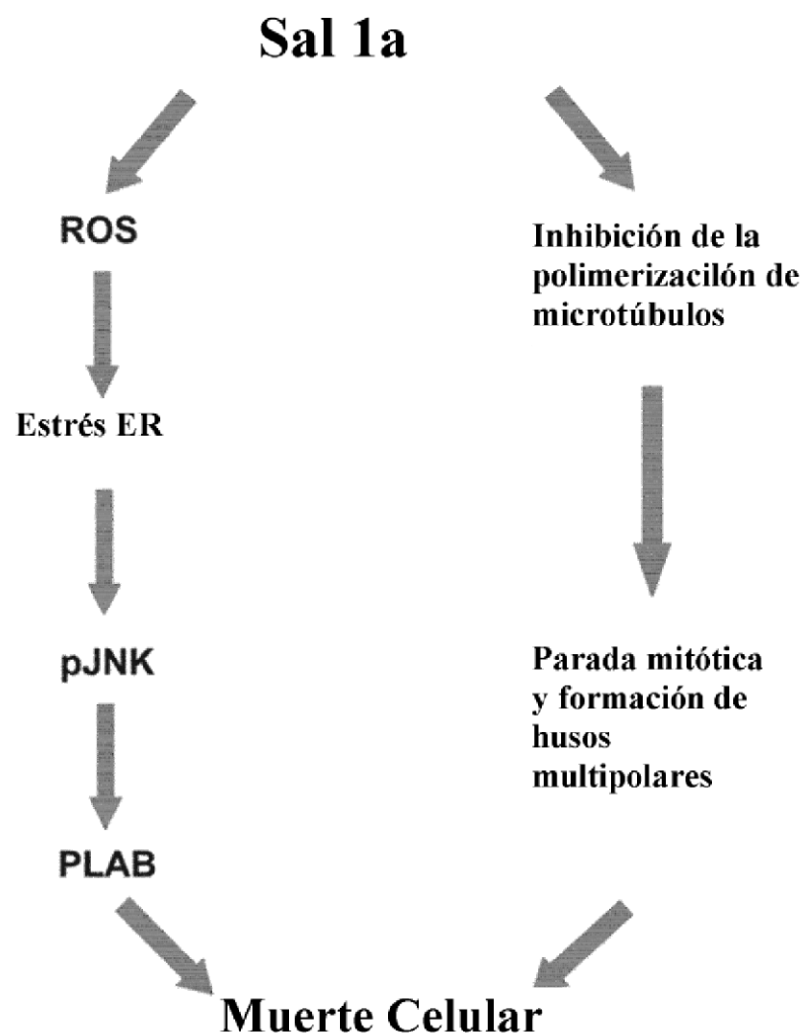
- 5 X es -COOH o NH₂;
R es una cadena de alquileo C₁-C₁₀ lineal o ramificado; y
R₁ es H, alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado, arilo, o R₂CO- donde R₂ es un alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado.
2. El compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que X es -COOH.
- 10 3. La sal de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 2 con un metal alcalino o alcalino-térreo, una amina orgánica o un amino ácido.
4. La sal de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 3 con sodio, potasio, litio, calcio o magnesio.
5. El compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que X es NH₂.
6. El compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que R es una cadena de alquileo C₁-C₆ lineal o ramificada.
7. El compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que R₁ es H.
- 20 8. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:
2-[3-[(1E,3E,5E,7E)-9-(4-hidroxianilino)-3,7-dimetil-9-oxo-nona-1,3,5,7-tetraenil]-2,4,4-trimetil-ciclohex-2-en-1-ilideno]amino]oxiacetato de sodio (compuesto 1a);
2-[3-[(1E,3E,5E,7E)-9-(4-hidroxianilino)-3,7-dimetil-9-oxo-nona-1,3,5,7-tetraenil]-2,4,4-trimetil-ciclohex-2-en-1-ilideno]amino]oxibutirato de sodio (compuesto 1b);
25 2-[3-[(1E,3E,5E,7E)-9-(4-hidroxianilino)-3,7-dimetil-9-oxo-nona-1,3,5,7-tetraenil]-2,4,4-trimetil-ciclohex-2-en-1-ilideno]amino]oxihexanoato de sodio (compuesto 1c).
9. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como un medicamento.
10. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como un agente antitumoral o quimiopreventivo.
11. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el tratamiento de tumores sólidos o hematológicos (metastásicos y no metastásicos).
12. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, mesotelioma y otros sarcomas, estirpes celulares de neuroblastoma, linfoma, leucemia y melanoma.
- 35 13. Una combinación de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con uno o más medicamentos seleccionados entre el grupo que consiste en agentes antimitóticos, compuestos

usados en quimioterapia convencional, retinoides naturales o sintéticos, fármacos epigenéticos o medicamentos específicos de diana (tumores o no-tumores).

14. La combinación de acuerdo con la reivindicación 13 en la que el compuesto de fórmula (I) y los medicamentos adicionales se administran al mismo tiempo o de forma secuencial, en cualquier orden.

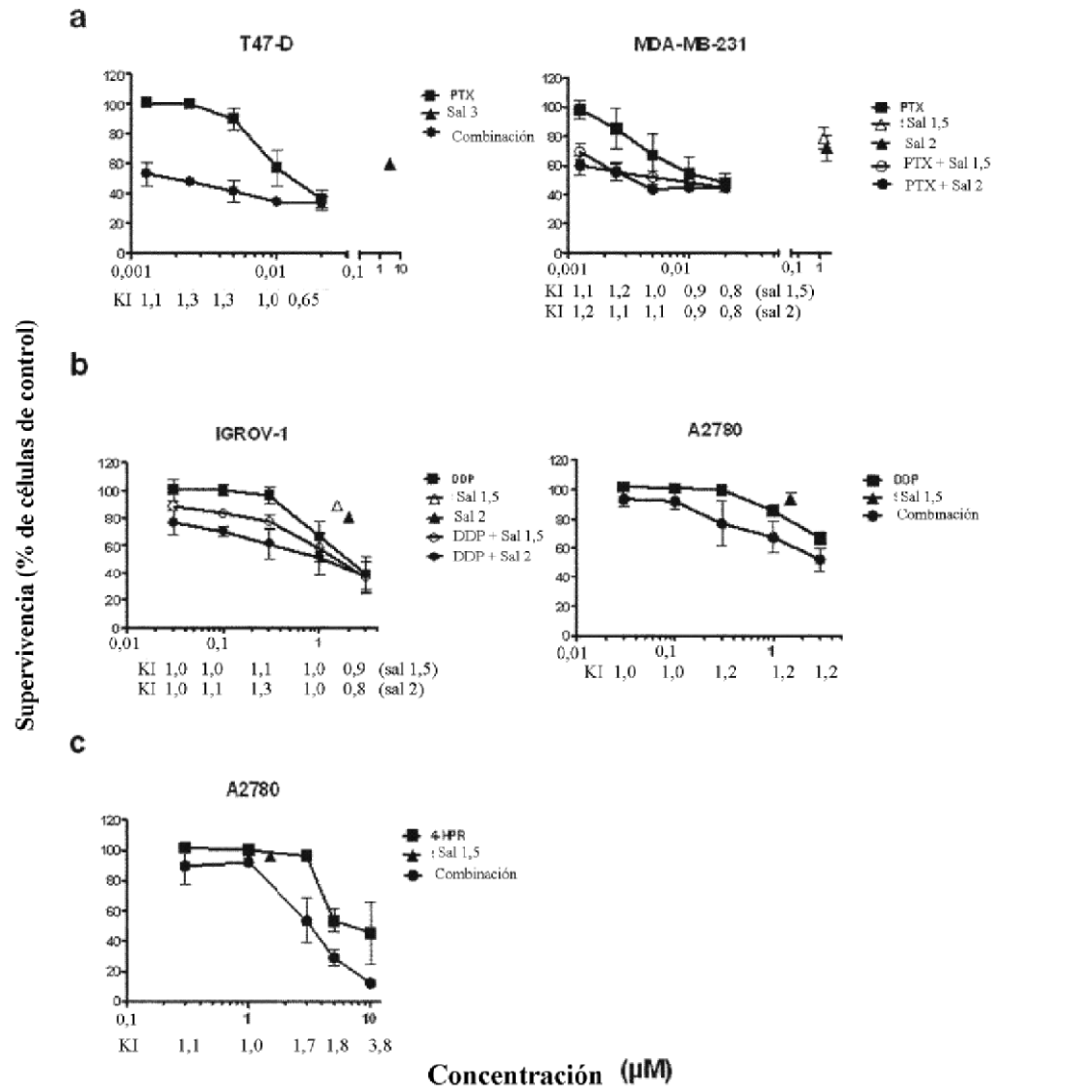
- 5 15. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como principio activo y un vehículo y/o eluyente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1



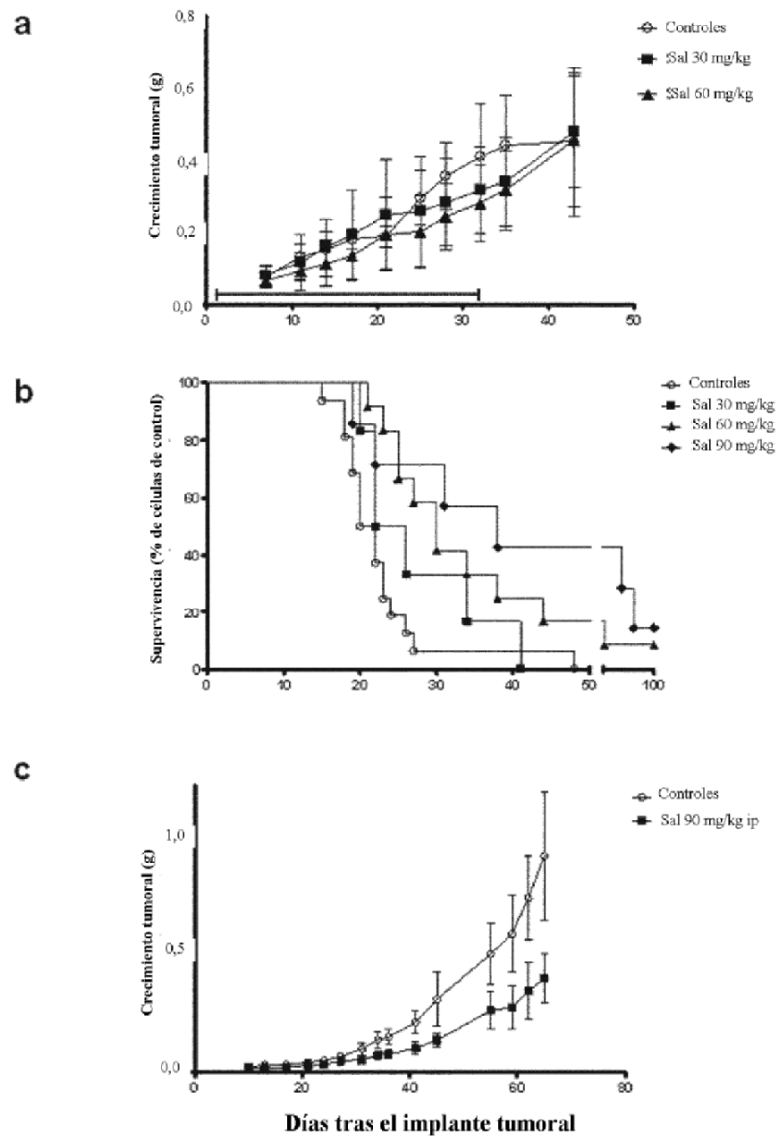
Mecanismos de acción de la sal 1a.
 ROS = generación de especies de oxígeno reactivas
 ER = retículo endoplásmico

Figura 2



Actividad antiproliferativa del tratamiento combinado de la sal 1a con a) paclitaxel (PTX); b) cisplatino (DDP); o c) ferritinida (4-HPR).

Ass = combinación de los dos compuestos.

Figura 3

Actividad antitumoral in vivo de la sal 1a en a) células de mesotelioma (STO); b) células de cáncer de ovario (IGROV-1); y c) células de cáncer de mama (MDA-MB-231).