

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 258**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2014** **PCT/US2014/068263**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015** **WO15084905**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2014** **E 14867332 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3076973**

54 Título: **Combinaciones de inhibidores de histona desacetilasa y fármacos inmunomoduladores**

30 Prioridad:

03.12.2013 US 201361911086 P
08.10.2014 US 201462061368 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2021

73 Titular/es:

ACETYLON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
70 Fargo Street, Suite 205
Boston, MA 02210, US

72 Inventor/es:

QUAYLE, STEVEN, NORMAN y
JONES, SIMON, STEWART

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 806 258 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

Combinaciones de inhibidores de histona desacetilasa y fármacos inmunomoduladores

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta aplicación reivindica prioridad sobre las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos Núm. de Serie 61/911.086, presentada el 3 de diciembre de 2013 y 62/061.368, presentada en 8 de octubre de 2014.

10 **Antecedentes**

Tint Lwin et al: "A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas", Journal of Clinical Investigation, vol. 123, núm. 11. 1 de noviembre de 2013, páginas 4612-4626, XP055389682, US ISSN: 0021-9738 DOI: 10.1172/JCI64210 describen datos que sugieren que la interacción linfoma-estroma en el microentorno del linfoma afecta directamente a la biología del linfoma a través de la regulación genética y epigenética.

J Amengual: Blood Journal, Blood 2012 120:1650, 1 de enero de 2012, XP055389512 ilustra que el doble direccionamiento de las rutas de degradación de proteínas con el inhibidor selectivo de HDAC6 Rocilinostat (ACY-1215) y Bortezomib demuestra actividad antitumoral sinérgica en modelos preclínicos de linfoma.

Sahakian Eva et al., Blood, vol. 120, núm. 21, noviembre de 2012, página 1660, & 54th annual meeting and exposition of the American-Society-of-hematology (ASH); Atlanta, GA, EE.UU., 08 - 11 de diciembre de 2012, ISSN: 0006-4971; XP055363021 ilustra que una "combinación de ACY1215, un inhibidor selectivo de la histona desacetilasa 6 (HDAC6) con el inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), Ibrutinib, representa una nueva estrategia terapéutica en el linfoma de células del manto (MCL)".

Las enzimas histona desacetilasa (HDAC) representan dianas terapéuticas atractivas en el linfoma, pero desafortunadamente los inhibidores de HDAC no selectivos han llevado a toxicidades limitantes de la dosis en los pacientes.

La clase de fármacos inmunomoduladores (IMiD), que incluyen lenalidomida y pomalidomida, muestran propiedades anti-linfoma en una variedad de modelos de linfoma y han demostrado actividad clínica en pacientes con linfoma.

Debido a las toxicidades limitantes de la dosis de las terapias anteriores, existe una necesidad continua en la técnica de composiciones y métodos más eficaces y menos tóxicos para el tratamiento del linfoma. Para satisfacer estas necesidades, en la presente memoria se proporcionan combinaciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador, y métodos para el tratamiento del linfoma. Las combinaciones y métodos de la invención son bien tolerados y no muestran las toxicidades limitantes de la dosis de las terapias anteriores.

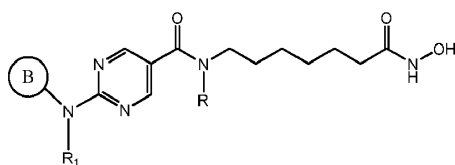
40 **Compendio de la invención**

En el primer aspecto de la presente invención, se proporciona la combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del linfoma de la reivindicación 1.

45 En la presente memoria se proporcionan combinaciones farmacéuticas para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita.

Se proporcionan combinaciones que comprenden un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) y un fármaco inmunomodulador (IMiD) para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, se proporciona una combinación farmacéutica para el tratamiento del linfoma que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de histona desacetilasa 6 (HDAC6) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un fármaco inmunomodulador (IMiD) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. También se proporciona una combinación farmacéutica para el tratamiento del linfoma que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de histona desacetilasa 6 (HDAC6) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un fármaco inmunomodulador (IMiD) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la combinación se administra a dosis que no serían eficaces cuando uno o ambos compuestos se administraran solos, pero cuyas cantidades son eficaces combinadas.

El inhibidor específico de HDAC6 es un compuesto de Fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde,

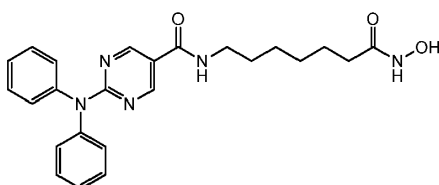
el anillo B es arilo o heteroarilo;

5 R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁-C₆;

y

R es H o alquilo C₁-C₆

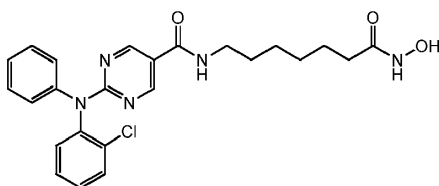
10 En realizaciones preferidas, el compuesto de Fórmula I es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

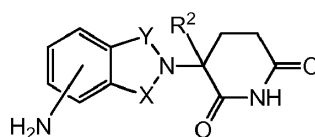
15

En otras realizaciones más, el compuesto de Fórmula I es:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

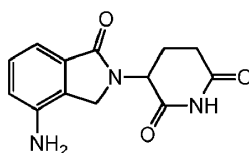
El fármaco inmunomodulador es un compuesto de Fórmula III:



(III)

25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde,
uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es CH₂ o C=O; y
R² es H o alquilo C₁-C₆

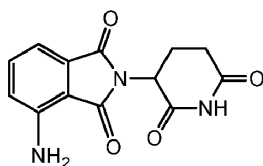
30 En realizaciones preferidas, el compuesto de Fórmula III es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35

En otras realizaciones preferidas más, el compuesto de Fórmula III es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

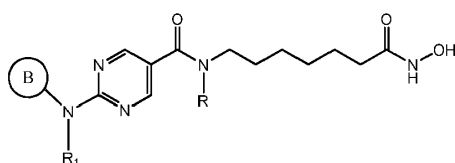
- 5 En algunas realizaciones, el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran con un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en formas de dosificación separadas. En otras realizaciones, el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en una forma de dosificación única.

En algunas realizaciones, el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en diferentes momentos. En otras realizaciones, el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran sustancialmente al mismo tiempo.

En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de HDAC y un IMiD logra un efecto sinérgico en el tratamiento del sujeto que lo necesita.

El inhibidor específico de HDAC6 es un compuesto de Fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde,

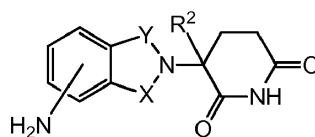
el anillo B es arilo o heteroarilo;
25 R_1 es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C_1-C_6 ;

y

R es H o alquilo C_1-C_6 ; y

el fármaco inmunomodulador es un compuesto de Fórmula III:

30

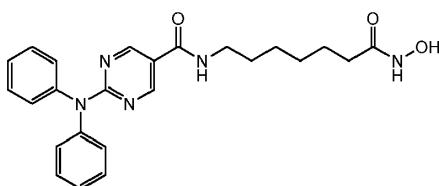


(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde,

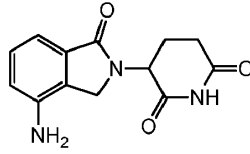
35 uno de X e Y es $C=O$, el otro de X e Y es CH_2 o $C=O$; y
 R^2 es H o alquilo C_1-C_6 .

En realizaciones específicas de las combinaciones, el inhibidor específico de HDAC6 es:



40

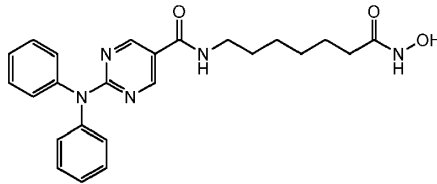
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
el fármaco inmunomodulador es:



5

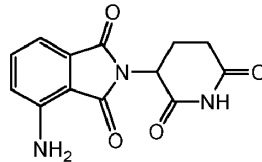
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones específicas de las combinaciones, el inhibidor específico de HDAC6 es:



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
el fármaco inmunomodulador es:

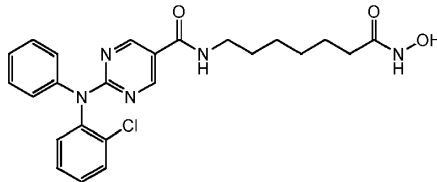


15

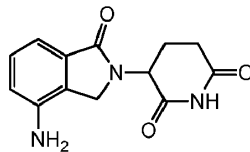
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones específicas de las combinaciones, el inhibidor específico de HDAC6 es:

20



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
el fármaco inmunomodulador es:

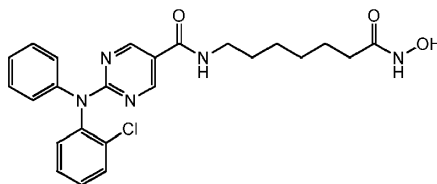


25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

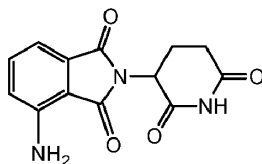
En realizaciones específicas de las combinaciones, el inhibidor específico de HDAC6 es:

30



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

el fármaco inmunomodulador es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Se proporciona un método para disminuir la progresión del ciclo celular mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

10 Se proporciona un método para aumentar la apoptosis celular mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

Se proporciona un método para suprimir reguladores transcripcionales en el cáncer mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

15 Otros objetos, características y ventajas serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. La descripción detallada y los ejemplos específicos se dan solo a modo ilustrativo ya que serán evidentes para los expertos en la técnica diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención a partir de esta descripción detallada. Además, los ejemplos demuestran el principio de la invención.

20 Breve descripción de las figuras

Las **Figuras 1A-F** muestran los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de las células de Linfoma de Células del Manto Mino (MCL) con un inhibidor de HDAC6 y un IMiD. La **Figura 1A** muestra los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de células de MCL Mino con **Compuesto A** y lenalidomida (parte superior) o pomalidomida (parte inferior). La **Figura 1B** muestra los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de células de MCL Mino con **Compuesto B** y lenalidomida (parte superior) o pomalidomida (parte inferior). La **Figura 1C** muestra los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de células de MCL Mino con **Compuesto C** y lenalidomida (parte superior) o pomalidomida (parte inferior). La **Figura 1D** muestra los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de células MCL Jeko1 con **Compuesto A** y pomalidomida. La **Figura 1E** muestra los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de células MCL Jeko1 con **Compuesto B** y lenalidomida (parte superior) o pomalidomida (parte inferior). La **Figura 1F** muestra los Gráficos de Sinergia F_A/CI después del tratamiento de células MCL Jeko1 con **Compuesto C** y lenalidomida (parte superior) o pomalidomida (parte inferior). Los puntos de datos con valores de Índice de Combinación (CI) <1 indican combinaciones de tratamiento que dan como resultado disminuciones sinérgicas en la viabilidad celular.

La **Figura 2A** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Jeko1 durante 4 días con DMSO, **Compuesto B** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto B** con IMiD sobre la inhibición del ciclo celular. El tratamiento combinado con cualquiera de los IMiD dio como resultado reducciones adicionales en la progresión del ciclo celular compatibles con una disminución de la proliferación.

La **Figura 2B** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Mino durante 4 días con DMSO, **Compuesto A** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto A** con IMiD sobre la inhibición del ciclo celular. El tratamiento combinado con cualquiera de los IMiD dio como resultado reducciones adicionales en la progresión del ciclo celular compatibles con una disminución de la proliferación.

La **Figura 2C** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Mino durante 4 días con DMSO, **Compuesto B** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto B** con IMiD sobre la inhibición del ciclo celular. El tratamiento combinado con cualquiera de los IMiD dio como resultado reducciones adicionales en la progresión del ciclo celular compatibles con una disminución de la proliferación.

La **Figura 3A** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Jeko1 durante 4 días con DMSO, **Compuesto A** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto A** con cualquier IMiD sobre la inducción de la apoptosis. El tratamiento combinado con cualquiera de los IMiD produjo aumentos sinérgicos en la apoptosis celular.

La **Figura 3B** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Jeko1 durante 4 días con DMSO, **Compuesto B** (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto B** con pomalidomida sobre la inducción de apoptosis. El tratamiento combinado con cualquiera de los IMiD produjo aumentos sinérgicos en la apoptosis celular.

La **Figura 4** es una imagen de una inmunotransferencia de células de linfoma de células del manto Jeko1 que

muestra que la combinación de **Compuesto A** y pomalidomida condujo a una mayor supresión de la expresión de MYC, IRF4 e IKZF3, todos los cuales son reguladores transcripcionales clave en el cáncer. Los marcadores de apoptosis (PARP escindido) también se incrementaron mediante el tratamiento combinado

5 Descripción detallada

La presente solicitud se dirige, generalmente, a combinaciones que comprenden un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) y un fármaco inmunomodulador (IMiD) para su uso en el tratamiento del linfoma, como se define en las reivindicaciones.

Definiciones

A continuación, se enumeran las definiciones de varios términos utilizados para describir esta invención. Estas definiciones se aplican a los términos tal como se utilizan a lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, a menos que se limiten de otra manera en casos específicos, individualmente o como parte de un grupo más grande.

El término "aproximadamente" generalmente indica una posible variación de no más de 10%, 5% o 1% de un valor. Por ejemplo, "aproximadamente 25 mg/kg" generalmente indicará, en su sentido más amplio, un valor de 22,5-27,5 mg/kg, es decir, $25 \pm 2,5$ mg/kg.

El término "alquilo" se refiere a radicales hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada saturados que contienen, en ciertas realizaciones, entre uno y seis, o uno y ocho átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de radicales alquilo C₁-C₆ incluyen, pero no se limitan a, radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, neopentilo, *n*-hexilo; y los ejemplos de radicales alquilo C₁-C₈ incluyen, pero no se limitan a, radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, neopentilo, *n*-hexilo, heptilo y octilo.

El número de átomos de carbono en un sustituyente alquilo se puede indicar con el prefijo "C_x-C_y", donde x es el mínimo e y es el número máximo de átomos de carbono en el sustituyente. Del mismo modo, una C_x cadena representa una cadena de alquilo que contiene x átomos de carbono.

El término "alcoxi" se refiere a un radical -O-alquilo.

Los términos "cicloalquilo" o "cicloalquileno" denotan un grupo monovalente derivado de un compuesto de anillo carbocíclico saturado o parcialmente no saturado monocíclico o policíclico. Los ejemplos de cicloalquilo C₃-C₈ incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo; y los ejemplos de cicloalquilo C₃-C₁₂ incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, biciclo[2,2,1]-heptilo y biciclo[2,2,2]octilo. También se contemplan grupos monovalentes derivados de un compuesto de anillo carbocíclico monocíclico o policíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo y similares.

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono o policíclico que tiene uno o más anillos aromáticos, condensados o no condensados, que incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen 6 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de seis a diez átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de seis a dieciséis átomos de carbono.

El término "heteroarilo" se refiere a un radical o sistema anular mono- o poli-cíclico (p. ej., bi-, o tri-cíclico o más) fusionado o no fusionado que tiene al menos un anillo aromático, donde uno o más de los átomos que forman el anillo es un heteroátomo tal como oxígeno, azufre o nitrógeno. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene de aproximadamente uno a seis átomos de carbono, y en realizaciones adicionales de uno a quince átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo contiene de cinco a dieciséis átomos en el anillo, de los cuales un átomo del anillo se selecciona entre oxígeno, azufre y nitrógeno; cero, uno, dos o tres átomos del anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente entre oxígeno, azufre y nitrógeno; y los átomos del anillo restantes son carbono. Heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, indolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo, acridinilo, y similares.

El término "halo" se refiere a un halógeno, tal como flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "combinación" se refiere a dos o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una afección o trastorno terapéutico descritos en la presente descripción. Tal combinación de agentes terapéuticos puede estar en forma de una sola píldora, cápsula o solución intravenosa. Sin embargo, el término "combinación" también abarca la situación en la que los dos o más agentes terapéuticos están en píldoras, cápsulas o soluciones intravenosas separadas. Del

mismo modo, el término "terapia combinada" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una afección o trastorno terapéutico descritos en la presente descripción. Tal administración abarca la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, como en una sola cápsula que tiene una razón fija de ingredientes activos o en recipientes múltiples o separados (p. ej., cápsulas) para cada ingrediente activo. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de manera secuencial, aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos al tratamiento de las afecciones o trastornos descritos en la presente memoria.

El término "HDAC" se refiere a histona desacetilasas, que son enzimas que eliminan los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas centrales, lo que conduce a la formación de una cromatina condensada y silenciada transcripcionalmente. Actualmente hay 18 histona desacetilasas conocidas, que se clasifican en cuatro grupos. Las HDAC de Clase I, que incluyen HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, están relacionadas con el gen RPD3 de la levadura. Las HDAC de Clase II, que incluyen HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10, están relacionadas con el gen Hda1 de levadura. Las HDAC de Clase III, que también se conocen como sirtuinas, están relacionadas con el gen Sir2 e incluyen SIRT1-7. Las HDAC de Clase IV, que contienen solo HDAC11, tienen características de HDAC tanto de Clase I como de Clase II. El término "HDAC" se refiere a una o más de las 18 histona desacetilasas conocidas, a menos que se especifique lo contrario.

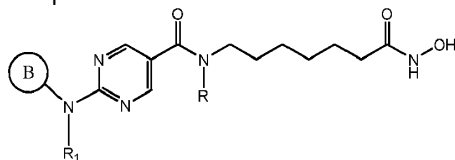
El término "específico de HDAC6" significa que el compuesto se une a HDAC6 en un grado sustancialmente mayor, tal como 5X, 10X, 15X, 20X mayor o más, que a cualquier otro tipo de enzima HDAC, tal como HDAC1 o HDAC2. Es decir, el compuesto es selectivo para HDAC6 sobre cualquier otro tipo de enzima HDAC. Por ejemplo, un compuesto que se une a HDAC6 con una CI_{50} de 10 nM y a HDAC1 con una CI_{50} de 50 nM es específico de HDAC6. Por otro lado, un compuesto que se une a HDAC6 con una CI_{50} de 50 nM y a HDAC1 con una CI_{50} de 60 nM no es específico de HDAC6.

El término "inhibidor" es sinónimo del término antagonista.

Inhibidores de histona desacetilasa (HDAC)

En la presente memoria se proporcionan combinaciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesite.

Las combinaciones de la invención comprenden un inhibidor de histona desacetilasa 6 (HDAC6), en donde el inhibidor específico de HDAC6 es un compuesto de Fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde,

el anillo B es arilo o heteroarilo;

R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁-C₆;

y

R es H o alquilo C₁-C₆.

Los compuestos representativos de Fórmula I incluyen, pero no se limitan a:

Compuesto A	Compuesto B
2-(difenilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)-pirimidina-5-carboxamida CI_{50} (nM) HDAC6 = 10 HDAC3 = 84	2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida CI_{50} (nM) HDAC6 = 4 HDAC3 = 76

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

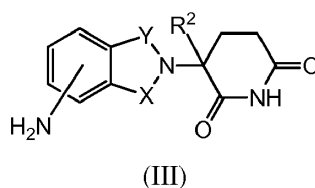
La preparación y las propiedades de los inhibidores selectivos de HDAC6 según la Fórmula I se proporcionan en la Solicitud de Patente Internacional Núm. PCT/US2011/021982.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria no están solvatados. En otras realizaciones, uno o más de los compuestos están en forma solvatada. Como se conoce en la técnica, el solvato puede ser cualquiera de los disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares.

Fármacos inmunomoduladores (IMiD)

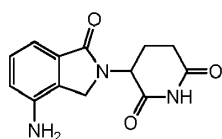
Las combinaciones y métodos de la invención comprenden un fármaco inmunomodulador (IMiD) en donde el IMiD es una talidomida de Fórmula III.

El fármaco inmunomodulador es un compuesto de Fórmula III:

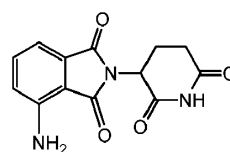


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde, uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es CH₂ o C=O; y R² es H o alquilo C₁-C₆.

Los compuestos representativos de Fórmula III incluyen, pero no se limitan a:



Compuesto E



Compuesto F

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

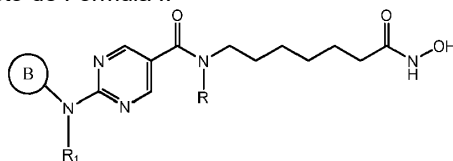
La preparación y las propiedades de los fármacos inmunomoduladores de acuerdo con la Fórmula III se proporcionan en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.635.517; 6.281.230; 6.335.349; y 6.476.052; así como la Solicitud de Patente Internacional Núm. PCT/US97/013375.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria no están solvatados. En otras realizaciones, uno o más de los compuestos están en forma solvatada. Como se conoce en la técnica, el solvato puede ser cualquiera de los disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares.

Combinaciones/Combinaciones Farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan combinaciones para su uso en el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesite.

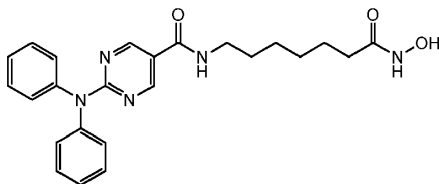
El inhibidor de HDAC es un compuesto de Fórmula I:



(I)

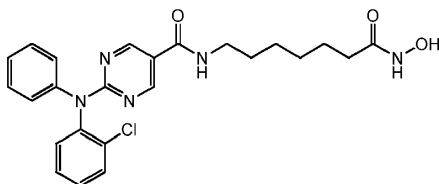
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones preferidas, el compuesto de Fórmula I es:



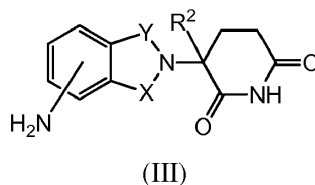
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otras realizaciones más, el compuesto de Fórmula I es:



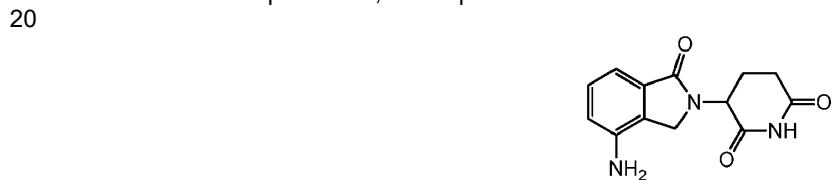
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El fármaco inmunomodulador es un compuesto de Fórmula III:



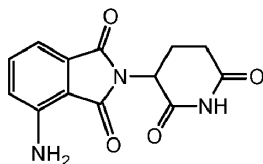
15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones preferidas, el compuesto de Fórmula III es:



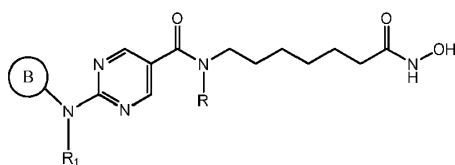
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En otras realizaciones preferidas más, el compuesto de Fórmula III es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Se proporciona una terapia combinada que comprende un inhibidor específico de HDAC6 y un fármaco inmunomodulador, en donde el inhibidor específico de HDAC6 es un compuesto de Fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde,

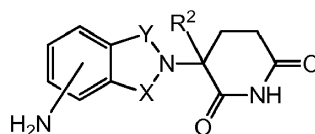
el anillo B es arilo o heteroarilo;

R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁-C₆;

y

R es H o alquilo C₁-C₆; y

el fármaco inmunomodulador es un compuesto de Fórmula III:



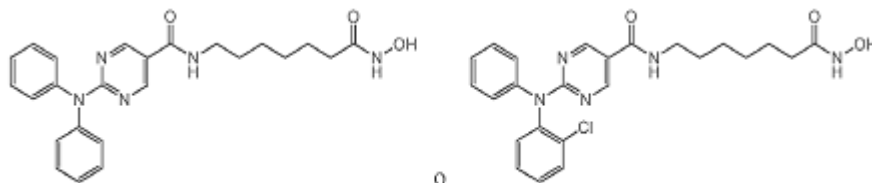
(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde,

uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es CH₂ o C=O; y

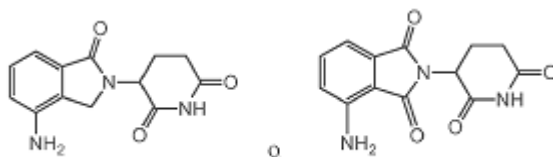
R² es H o alquilo C₁-C₆.

En realizaciones específicas de las combinaciones, el inhibidor específico de HDAC6 es:



o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y

el fármaco inmunomodulador es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Aunque los compuestos de las Fórmulas I y III se representan en sus formas neutras, en algunas realizaciones, estos compuestos se utilizan en una forma de sal farmacéuticamente aceptable. Como se emplea en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en donde el compuesto parental se modifica convirtiendo un radical ácido o alcalino existente en su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos alcalinos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto parental formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto parental que contiene un radical alcalino o ácido por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o álcali libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del álcali o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las

listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977).

Administración/Dosis

El inhibidor de HDAC (un compuesto de Fórmula I) se puede administrar simultáneamente con el fármaco inmunomodulador (un compuesto de Fórmula III). La administración simultánea generalmente significa que ambos compuestos se introducen en el paciente exactamente al mismo tiempo. Sin embargo, la administración simultánea también incluye la posibilidad de que el inhibidor de HDAC y el IMiD se introduzcan en el paciente en diferentes momentos, pero la diferencia en el tiempo es lo suficientemente minúscula como para que el primer compuesto administrado no tenga tiempo de tener efecto en el paciente antes de la entrada del segundo compuesto administrado. Tales tiempos retardados corresponden típicamente a menos de 1 minuto, y más típicamente, menos de 30 segundos. En un ejemplo, en donde los compuestos están en solución, se puede lograr la administración simultánea administrando una solución que contiene la combinación de compuestos. En otro ejemplo, se puede emplear la administración simultánea de soluciones separadas, una de las cuales contiene el inhibidor de HDAC y la otra que contiene el IMiD. En un ejemplo en donde los compuestos están en forma sólida, se puede lograr la administración simultánea administrando una composición que contiene la combinación de compuestos. Alternativamente, se puede lograr la administración simultánea administrando dos composiciones separadas, una que comprende el inhibidor de HDAC y la otra que comprende el IMiD.

En otras realizaciones, el inhibidor de HDAC y el IMiD no se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el inhibidor de HDAC se administra antes que el IMiD. En otras realizaciones, el IMiD se administra antes que el inhibidor de HDAC. La diferencia de tiempo entre las administraciones no simultáneas puede ser mayor de 1 minuto, cinco minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, dos horas, tres horas, seis horas, nueve horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas. En otras realizaciones, se deja tiempo para que el primer compuesto administrado surta efecto en el paciente antes de que se administre el segundo compuesto administrado. Generalmente, la diferencia en el tiempo no se extiende más allá del tiempo para que el primer compuesto administrado complete su efecto en el paciente, o más allá del tiempo en que el primer compuesto administrado se elimina o desactiva total o sustancialmente en el paciente.

En algunas realizaciones, uno o ambos del inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en una cantidad o dosificación terapéuticamente eficaces. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de inhibidor de HDAC6 (un compuesto de Fórmula I) o un fármaco inmunomodulador (un compuesto de Fórmula III) que, cuando se administra a un paciente por sí misma, trata eficazmente el linfoma. Una cantidad que demuestra ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" en un caso dado, para un sujeto en particular, puede no ser eficaz para el 100% de los sujetos tratados de manera similar para la enfermedad o afección en consideración, aunque tal dosificación sea considerada "una cantidad terapéuticamente eficaz" por profesionales cualificados. La cantidad del compuesto que corresponde a una cantidad terapéuticamente eficaz depende en gran medida del tipo de cáncer, la fase del cáncer, la edad del paciente que se está tratando y otros hechos. En general, las cantidades terapéuticamente eficaces de estos compuestos son bien conocidas en la técnica, tal como se proporciona en las referencias de soporte citadas anteriormente.

En otras realizaciones, uno o ambos del inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en una cantidad o dosis subterapéuticamente eficaz. Una cantidad subterapéuticamente eficaz es una cantidad de inhibidor de HDAC (un compuesto de Fórmula I) o fármaco inmunomodulador (un compuesto de Fórmula III) que, cuando se administra a un paciente por sí mismo, no inhibe completamente a lo largo del tiempo la actividad biológica de la diana prevista.

Ya sea que se administre en cantidades terapéuticas o subterapéuticas, la combinación del inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador debería ser eficaz en el tratamiento del linfoma. Por ejemplo, una cantidad subterapéutica de un compuesto de Fórmula III (fármaco inmunomodulador) puede ser una cantidad eficaz si, cuando se combina con un compuesto de Fórmula I (inhibidor de HDAC), la combinación es eficaz en el tratamiento del linfoma.

En algunas realizaciones, la combinación de compuestos muestra un efecto sinérgico (es decir, mayor que el efecto aditivo) en el tratamiento del linfoma. El término "efecto sinérgico" se refiere a la acción de dos agentes, tales como, por ejemplo, un inhibidor de HDAC y un IMiD, que produce un efecto, por ejemplo, ralentización de la progresión sintomática del cáncer o síntomas del mismo, que es mayor que la simple adición de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. Se puede calcular un efecto sinérgico, por ejemplo, utilizando métodos adecuados como la ecuación Sigmoidea de Emax (Holford, N. H. G. y Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet 6: 429-453 (1981)), la ecuación de la aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación de efecto de la mediana (Chou, T. C. y Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación mencionada anteriormente se puede aplicar a los datos experimentales para generar un gráfico correspondiente para ayudar a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Los gráficos correspondientes

asociados con las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, la curva de isoblograma y la curva de índice de combinación, respectivamente.

En diferentes realizaciones, dependiendo de la combinación y las cantidades eficaces utilizadas, la combinación de compuestos puede inhibir el crecimiento del cáncer, lograr la estasis del cáncer o incluso lograr una regresión del cáncer sustancial o completa.

Si bien las cantidades de un inhibidor de HDAC y un IMiD deberían dar como resultado el tratamiento eficaz del linfoma, las cantidades, cuando se combinan, preferiblemente no son excesivamente tóxicas para el paciente (es decir, las cantidades están preferiblemente dentro de los límites de toxicidad establecidos por las pautas médicas). En algunas realizaciones, para evitar una toxicidad excesiva y/o para proporcionar un tratamiento más eficaz del linfoma, se proporciona una limitación en la dosificación administrada total. Típicamente, las cantidades consideradas en la presente memoria son por día; sin embargo, en la presente memoria también se consideran los ciclos de medio día y dos días o tres días.

Se pueden utilizar diferentes regímenes de dosificación para el tratamiento del linfoma. En algunas realizaciones, una dosificación diaria, tal como cualquiera de las dosificaciones ilustrativas descritas anteriormente, se administra una, dos veces, tres veces o cuatro veces al día durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días. Dependiendo de la fase y la gravedad del cáncer, se puede emplear un tiempo de tratamiento más corto (p. ej., hasta cinco días) junto con una dosificación alta o se puede emplear un tiempo de tratamiento más largo (p. ej., diez o más días, o semanas, o un mes o más) junto con una dosificación baja. En algunas realizaciones, se administra una dosificación una o dos veces al día cada dos días. En algunas realizaciones, cada dosificación contiene tanto un inhibidor de HDAC como un IMiD para su suministro en forma de una dosificación única, mientras que en otras realizaciones, cada dosificación contiene un inhibidor de HDAC y un IMiD para su suministro en forma de dosificaciones separadas.

Los compuestos de Fórmula I o III, o sus formas de sal o solvato farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, se pueden administrar a través de cualquiera de los modos de administración aceptados o agentes conocidos en la técnica. Los compuestos se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, nasal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), tópica, transdérmica, intravaginal, intravesical, intracisternal o rectal. La forma de dosificación puede ser, por ejemplo, un polvo liofilizado sólido, semisólido, o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas de gelatina blandas elásticas o duras, polvos, soluciones, suspensiones, supositorios, aerosoles, o similares, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración simple de dosificaciones precisas. Una ruta particular de administración es la oral, particularmente una en la que se puede ajustar un régimen de dosificación diaria conveniente de acuerdo con el grado de gravedad de la enfermedad que se vaya a tratar.

Como se comentó anteriormente, el inhibidor de HDAC y el IMiD de la combinación farmacéutica se pueden administrar en una sola dosis unitaria o en formas de dosificación separadas. Por consiguiente, la frase "combinación farmacéutica" incluye una combinación de dos fármacos en una forma de dosificación única o en formas de dosificación separadas, es decir, los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables descritos a lo largo de la solicitud se pueden combinar con un inhibidor de HDAC y un IMiD en una sola dosis unitaria, así como se pueden combinar individualmente con un inhibidor de HDAC y un IMiD cuando estos compuestos se administran por separado.

Los agentes auxiliares y coadyuvantes pueden incluir, por ejemplo, agentes conservantes, humectantes, de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, perfumantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de los microorganismos generalmente se proporciona por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También se pueden incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Los agentes auxiliares también pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponadores del pH y antioxidantes, tales como, por ejemplo, ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado y similares.

Las formas de dosificación sólidas se pueden preparar con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros conocidos en la técnica. Pueden contener agentes opacificadores y pueden tener una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una cierta parte del tracto intestinal de manera retardada. Los ejemplos de composiciones incluidas que se pueden utilizar son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación se preparan, por ejemplo, disolviendo,

dispersando, etc., los inhibidores de HDAC o fármacos inmunomoduladores descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y coadyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares; agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida; aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de sorbitán y ácidos grasos; o mezclas de estas sustancias, y similares, para formar así una solución o suspensión.

Generalmente, dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso de los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y de 99% a 1% en peso de un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición estará entre aproximadamente 5% y aproximadamente 75% en peso de un compuesto descrito en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

Los métodos reales de preparación de tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990).

Métodos de tratamiento

Se proporcionan métodos para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una combinación farmacéutica de la invención. Por lo tanto, se proporcionan métodos para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

El sujeto considerado en la presente memoria es típicamente un ser humano. Sin embargo, el sujeto puede ser cualquier mamífero para el que se desee el tratamiento. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para aplicaciones tanto humanas como veterinarias.

Los términos "tratar" o "tratamiento" indican que el método ha mitigado, al menos, la proliferación celular anormal. Por ejemplo, el método puede reducir la tasa de crecimiento de linfoma en un paciente, o prevenir el crecimiento continuo o la propagación del linfoma, o incluso reducir el alcance general del linfoma.

Como tal, se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto E, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto E, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto E, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Sin embargo, este método no es parte de la invención.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Sin embargo, este método no es parte de la invención.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto E, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se proporciona un método para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 El sujeto puede haber sido previamente refractario a un fármaco inmunomodulador.

Se proporcionan métodos para disminuir la progresión del ciclo celular mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

10 Se proporcionan métodos para aumentar la apoptosis celular mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

Se proporcionan métodos para suprimir los reguladores transcripcionales en el cáncer mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de HDAC y un fármaco inmunomodulador.

15 Kits

Se proporcionan kits. Los kits incluyen envases que comprenden compuestos o composiciones como se describe en la presente memoria. Se proporcionan kits que comprenden un inhibidor de HDAC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un IMiD o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 La expresión "envase" representa cualquier recipiente que contiene los compuestos o composiciones presentados en la presente memoria. El envase puede ser una caja o envoltura. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, entre otros, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo de administración y tratamiento previstos.

30 El kit también puede contener elementos que no están contenidos dentro del envase, pero que están unidos al exterior del envase, por ejemplo, pipetas.

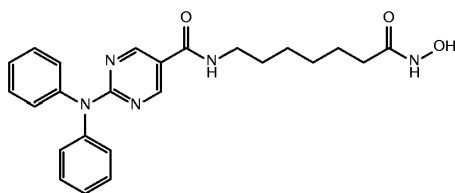
Los kits pueden contener adicionalmente instrucciones para administrar compuestos o composiciones de la invención a un paciente. Los kits también pueden comprender instrucciones para usos aprobados de los compuestos de la presente memoria por agencias reguladoras, tales como la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos. Los kits también pueden contener etiquetas o prospectos de productos para los compuestos. El envase o los envases y/o cualquier prospecto del producto pueden ser aprobados a su vez por las agencias reguladoras. Los kits pueden incluir compuestos en fase sólida o en fase líquida (tales como los tampones proporcionados) en un envase. Los kits también pueden incluir tampones para preparar soluciones para llevar a cabo los métodos y pipetas para transferir líquidos de un recipiente a otro.

40 **Ejemplos**

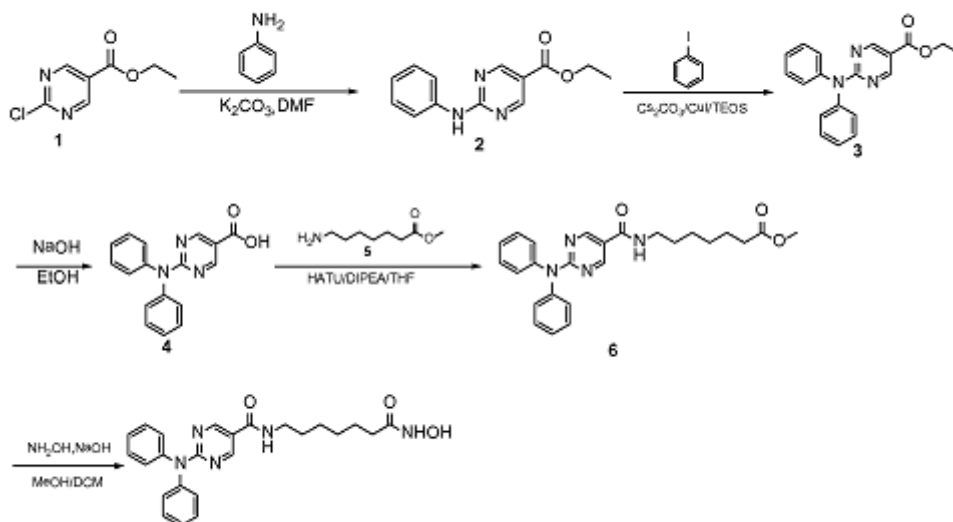
A continuación, se exponen ejemplos con fines ilustrativos y para describir ciertas realizaciones específicas de la invención. Sin embargo, el alcance de las reivindicaciones no está limitado de ninguna manera por los ejemplos expuestos en la presente memoria. Serán evidentes para los expertos en la técnica diversos cambios y modificaciones a las realizaciones descritas, y tales cambios y modificaciones que incluyen, sin limitación, aquellos relacionados con las estructuras químicas, substitutos, derivados y/o formulaciones de la invención pueden realizarse sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las definiciones de las variables en las estructuras de los esquemas de este documento son proporcionales a las de las posiciones correspondientes en las fórmulas presentadas en la presente memoria.

La síntesis de los compuestos de Fórmula I se proporciona en el documento PCT/US2011/021982. La síntesis de los compuestos de Fórmula III se proporciona en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.635.517; 6.281.230; 6.335.349; y 6.476.052; y en la Solicitud de Patente Internacional Núm. PCT/US97/013375.

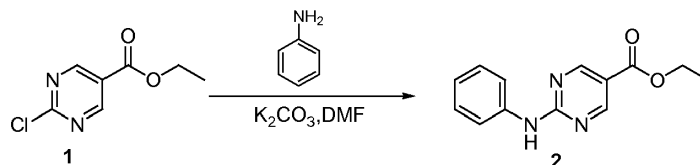
55 **Ejemplo 1: Síntesis de 2-(difenilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidino-5-carboxamida (Compuesto A)**



Esquema de Reacción

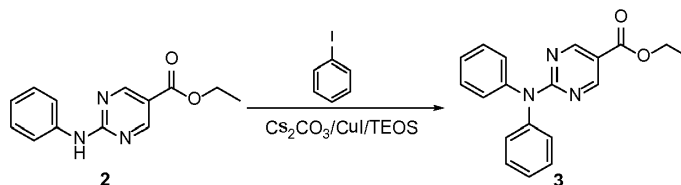


5 Síntesis del Intermedio 2



Una mezcla de anilina (3,7 g, 40 mmoles), 2-cloropirimidino-5-carboxilato de etilo 1 (7,5 g, 40 mmoles), K_2CO_3 (11 g, 80 mmoles) en DMF (100 ml) se desgasificó y se agitó a 120°C bajo N_2 durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc (200 ml), después se lavó con salmuera saturada (200 ml x 3). La capa orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 , se evaporó hasta sequedad y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 10/1) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (6,2 g, 64%).

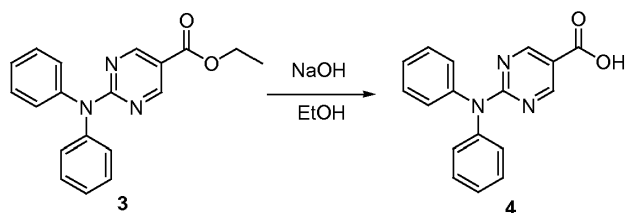
15 Síntesis del Intermedio 3



Una mezcla del compuesto 2 (6,2 g, 25 mmoles), yodobenceno (6,12 g, 30 mmoles), CuI (955 mg, 5,0 mmoles), Cs_2CO_3 (16,3 g, 50 mmoles) en TEOS (200 ml) se desgasificó y se purgó con nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 140°C durante 14 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el residuo se diluyó con EtOAc (200 ml) y EtOH al 95% (200 ml), $NH_4F \cdot H_2O$ en gel de sílice [50 g, preparado previamente mediante la adición de NH_4F (100 g) en agua (1500 ml) a gel de sílice (500 g, malla 100-200)], y la mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h, los materiales solidificados se filtraron y se lavaron con EtOAc. El producto filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 10/1) para

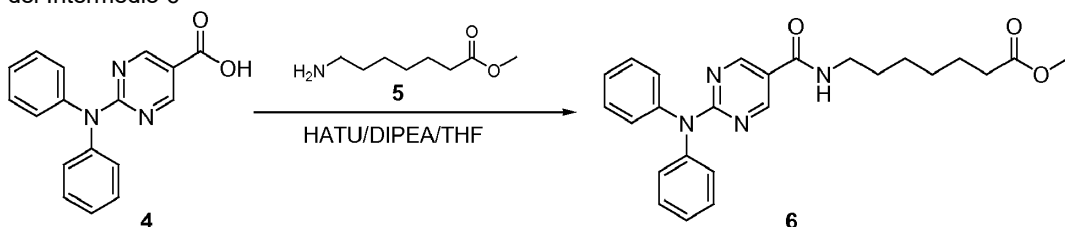
proporcionar un sólido de color amarillo (3 g, 38%).

Síntesis del Intermedio 4



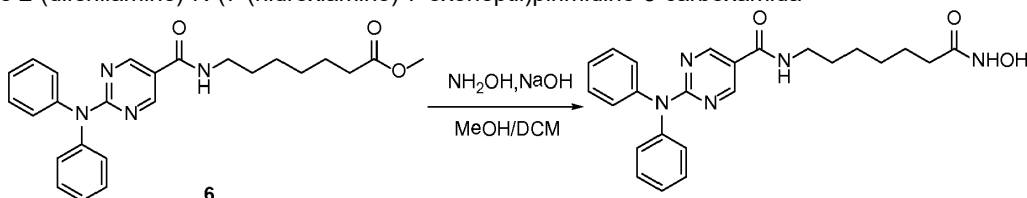
Se añadió NaOH 2 N (200 ml) a una solución del compuesto **3** (3.0 g, 9.4 mmoles) en EtOH (200 ml). La mezcla se agitó a 60°C durante 30 minutos. Después de la evaporación del disolvente, la solución se neutralizó con HCl 2 N para proporcionar un precipitado de color blanco. La suspensión se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml), y la capa orgánica se separó, se lavó con agua (2 x 100 ml), salmuera (2 x 100 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente proporcionó un sólido de color marrón (2.5 g, 92%).

Síntesis del Intermedio 6



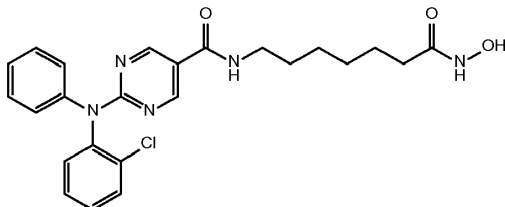
Una mezcla de compuesto **4** (2.5 g, 8.58 mmoles), aminoheptanoato **5** (2.52 g, 12.87 mmoles), HATU (3.91 g, 10.30 mmoles), DIPEA (4.43 g, 34.32 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de filtrar la mezcla de reacción, el filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 2/1) para proporcionar un sólido de color marrón (2 g, 54%).

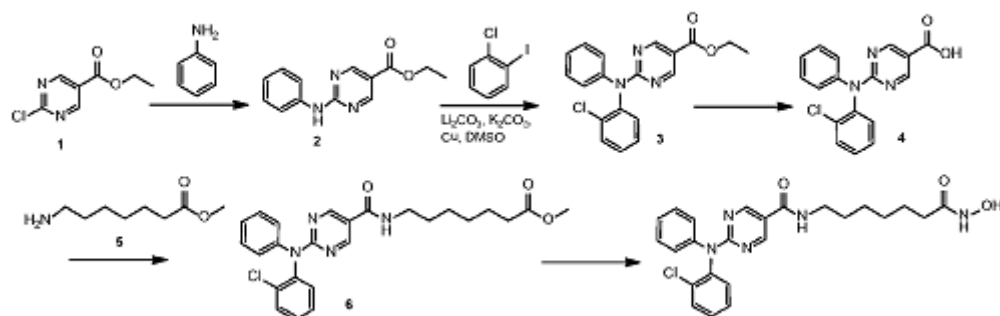
Síntesis de 2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidino-5-carboxamida



Una mezcla del compuesto **6** (2.0 g, 4.6 mmoles), hidróxido de sodio (2 N, 20 mL) en MeOH (50 ml) y DCM (25 ml) se agitó a 0°C durante 10 minutos. La hidroxilamina (50%) (10 ml) se enfrió a 0°C y se añadió a la mezcla. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de eliminar el disolvente, la mezcla se neutralizó con HCl 1 M para proporcionar un precipitado de color blanco. El producto bruto se filtró y se purificó por pre-HPLC para proporcionar un sólido de color blanco (950 mg, 48%).

Ejemplo 2: Síntesis de 2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidino-5-carboxamida (Compuesto B)



Esquema de Reacción

Síntesis de Intermedio 2: Véase la síntesis del Intermedio 2 en el Ejemplo 1.

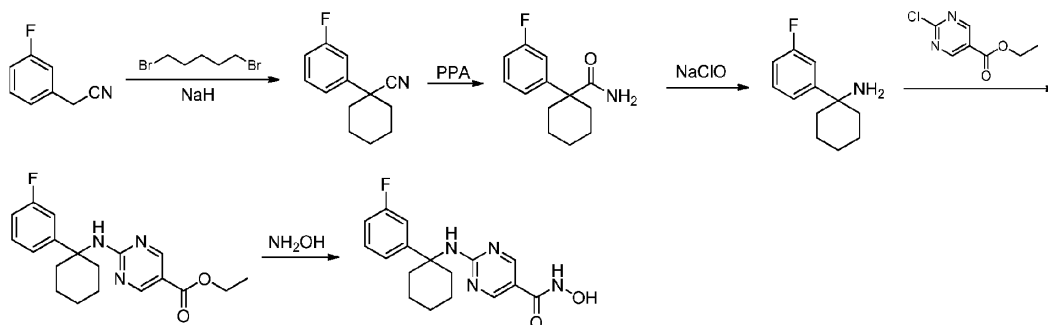
Síntesis del Intermedio 3: Una mezcla de compuesto 2 (69,2 g, 1 equiv.), 1-cloro-2-yodobenceno (135,7 g, 2 equiv.), Li_2CO_3 (42,04 g, 2 equiv.), K_2CO_3 (39,32 g, 1 equiv.), Cu (1 equiv. 45 μm) en DMSO (690 ml) se desgasificó y se purgó con nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 140°C. El tratamiento de la reacción proporcionó el compuesto 3 con un rendimiento del 93%.

Síntesis del Intermedio 4: Véase la síntesis del intermedio 4 en el Ejemplo 1.

Síntesis del Intermedio 6: Véase la síntesis del intermedio 6 en el Ejemplo 1.

Síntesis de 2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida (**Compuesto B**): Véase la síntesis del **Compuesto A** en el Ejemplo 1.

*** Ejemplo 3: Síntesis de 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidino-5-carboxamida (Compuesto C)**



* No está dentro del alcance del inhibidor específico de HDAC6 de la combinación para el uso de la invención actualmente reivindicada

Síntesis de 1-(3-fluorofenil)ciclohexanocarbonitrilo:

A una solución de 2-(3-fluorofenil)acetonitrilo (100 g, 0,74 moles) en DMF seco (1000 ml) se le añadió 1,5-dibromopentano (170 g, 0,74 moles), NaH (65 g, 2,2 eq) gota a gota en el baño de hielo. Después de la adición, la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante la noche a 50°C. La suspensión se enfrió cuidadosamente con agua con hielo, se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). La solución orgánica combinada se concentró para proporcionar el crudo que se purificó en una columna instantánea para proporcionar 1-(3-fluorofenil)-ciclohexanocarbonitrilo como un sólido de color pálido (100 g, 67%).

Síntesis de 1-(3-fluorofenil)ciclohexanocarboxamida:

Una solución de 1-(3-fluorofenil)ciclohexanocarbonitrilo (100 g, 0,49 moles) en PPA (500 ml) se calentó a 110°C durante aproximadamente 5-6 horas. Una vez completada, la mezcla resultante se alcalinizó cuidadosamente con una solución saturada de NaHCO_3 hasta pH = 8-9. El producto precipitado se recogió y se lavó con agua (1000 ml) para proporcionar 1-(3-fluorofenil)ciclohexanocarboxamida en forma de un sólido de color blanco (95 g, 87%).

Síntesis de 1-(3-fluorofenil)ciclohexanamina:

A una solución de 1-(3-fluorofenil)ciclohexanocarboxamida (95 g, 0,43 moles) en n-BuOH (800 ml) se le añadió NaClO (260 ml, 1,4 eq), después se añadió NaOH 3N (400 ml, 2,8 eq) a 0°C y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se extrajo con EA (2 x 500 ml), la solución orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó para proporcionar el crudo que se purificó adicionalmente al tratar con sal HCl en forma de un polvo de color blanco (72 g, 73%).

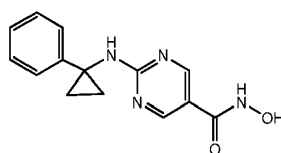
Síntesis de 2-(1-(3-fluorofenil)ciclohexilamino)pirimidino-5-carboxilato de etilo:

A una solución de hidrocloreuro de 1-(3-fluorofenil)ciclohexanamina (2,29 g 10 mmoles) en dioxano (50 ml) se le añadió 2-cloropirimidino-5-carboxilato de etilo (1,87 g, 1,0 eq) y DIPEA (2,58 g, 2,0 eq). La mezcla se calentó durante la noche a 110-120°C. La mezcla resultante se purificó directamente sobre una columna de gel de sílice para proporcionar el producto acoplado en forma de un sólido de color blanco (1,37 g, 40%).

Síntesis de 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidino-5-carboxamida:

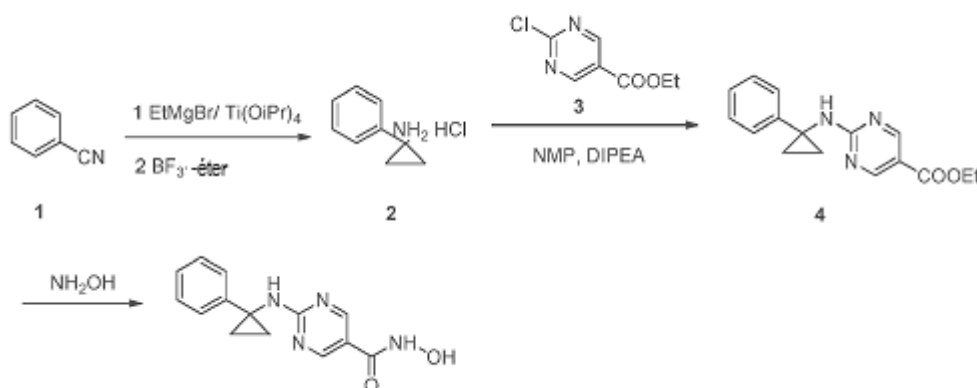
A una solución de 2-(1-(3-fluorofenil)ciclohexilamino)pirimidino-5-carboxilato de etilo (100 mg, 0,29 mmoles) en MeOH/DCM (10 ml, 1:1) se le añadió NH₂OH en agua al 50% (2 ml, exceso), después se saturó. Se añadió NaOH en MeOH (2 ml, exceso) a 0°C y la reacción se agitó durante 3-4 horas. Después de completarse, la mezcla resultante se concentró y se aciduló con HCl 2 N hasta un pH = 4-5. El precipitado se recogió y se lavó con agua (10 ml) para eliminar el NH₂OH y se secó para proporcionar 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidino-5-carboxamida en forma de un polvo de color blanco (70 mg, 73%).

*** Ejemplo 4: Síntesis de N-hidroxi-2-((1-fenilciclopropil)amino)pirimidino-5-carboxamida (Compuesto D)**



* No está dentro del alcance del inhibidor específico de HDAC6 de la combinación para el uso de la invención actualmente reivindicada

Esquema de Reacción



se añadió al residuo con agitación intensa y el precipitado se recogió por filtración. El producto se secó en un horno a 45°C durante la noche (340 g, rendimiento 79%).

Ejemplo 5: Ensayos de enzimas HDAC

Los compuestos para la prueba se diluyeron en DMSO a 50 veces la concentración final y se realizó una serie de diluciones con un factor de dilución 1:3 y de diez puntos. Los compuestos se diluyeron en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 100 mM, Tween-20 al 0,001%, BSA al 0,05%, TCEP 20 µM) hasta 6 veces su concentración final. Las enzimas HDAC (adquiridas de BPS Biosciences) se diluyeron a 1,5 veces su concentración final en tampón de ensayo. El tripéptido sustrato y la tripsina a una concentración final de 0,05 µM se diluyeron en tampón de ensayo a 6 veces su concentración final. Las concentraciones finales de enzimas utilizadas en estos

ensayos fueron 3,3 ng/ml (HDAC1), 0,2 ng/ml (HDAC2), 0,08 ng/ml (HDAC3) y 2 ng/ml (HDAC6). Las concentraciones finales de sustrato utilizadas fueron 16 μ M (HDAC1), 10 μ M (HDAC2), 17 μ M (HDAC3) y 14 μ M (HDAC6). Se añadieron cinco μ l de compuesto y 20 μ l de enzima a los pocillos de una placa de color negro opaca de 384 pocillos por duplicado. La enzima y el compuesto se incubaron juntos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron cinco μ l de sustrato a cada pocillo, la placa se agitó durante 60 segundos y se colocó en un lector de placas de microtitulación Victor 2. Se hizo un seguimiento del desarrollo de fluorescencia durante 60 minutos y se calculó la velocidad lineal de la reacción. La CI50 se determinó utilizando Graph Pad Prism mediante un ajuste de curva de cuatro parámetros. No todos los inhibidores de HDAC mencionados en este ejemplo son parte de la invención.

Ejemplo 6: Los inhibidores de HDAC6 presentan sinergia con los IMiD en la eliminación de células de linfoma

En este experimento, se demuestra que la combinación de un inhibidor de HDAC6 (**Compuesto A**, **Compuesto B**) con cualquiera de lenalidomida (**Compuesto E**) o pomalidomida (**Compuesto F**) conduce a disminuciones sinérgicas en la viabilidad de las células de linfoma de células del manto (MCL) Mino y Jeko1 *in vitro*. La relevancia de la inhibición de HDAC6 para este efecto sinérgico se validó demostrando interacciones sinérgicas de cualquiera de las moléculas IMiD (lenalidomida o pomalidomida) con el **Compuesto C***, que es 300 veces más selectivo para HDAC6 sobre las HDAC de clase I.

Brevemente, para los ensayos de viabilidad, las células se sembraron en placas de 384 pocillos y se trataron por cuadruplicado en un formato de dosis-matriz con un inhibidor de HDAC6 (**Compuesto A**, **Compuesto B**, o **Compuesto C***) combinados con lenalidomida o pomalidomida. Después de incubar estas células durante 72 horas, se evaluó la viabilidad celular total mediante un ensayo MTS (Aqueous One, Promega). La fracción afectada (Fa) se determinó posteriormente para cada dosis añadida al residuo con agitación intensa y el precipitado se recogió por filtración. El producto se secó en un horno a 45°C durante la noche (340 g, rendimiento 79%).

* No está dentro del alcance del inhibidor específico de HDAC6 de la combinación para el uso de la invención actualmente reivindicada.

Ejemplo 5: Ensayos de enzimas HDAC

Los compuestos para la prueba se diluyeron en DMSO a 50 veces la concentración final y se realizó una serie de diluciones con un factor de dilución 1:3 y de diez puntos. Los compuestos se diluyeron en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 100 mM, Tween-20 al 0,001%, BSA al 0,05%, TCEP 20 μ M) hasta 6 veces su concentración final. Las enzimas HDAC (adquiridas de BPS Biosciences) se diluyeron a 1,5 veces su concentración final en tampón de ensayo. El tripéptido sustrato y la tripsina a una concentración final de 0,05 μ M se diluyeron en tampón de ensayo a 6 veces su concentración final. Las concentraciones finales de enzimas utilizadas en estos ensayos fueron 3,3 ng/ml (HDAC1), 0,2 ng/ml (HDAC2), 0,08 ng/ml (HDAC3) y 2 ng/ml (HDAC6). Las concentraciones finales de sustrato utilizadas fueron 16 μ M (HDAC1), 10 μ M (HDAC2), 17 μ M (HDAC3) y 14 μ M (HDAC6). Se añadieron cinco μ l de compuesto y 20 μ l de enzima a los pocillos de una placa de color negro opaca de 384 pocillos por duplicado. La enzima y el compuesto se incubaron juntos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron cinco μ l de sustrato a cada pocillo, la placa se agitó durante 60 segundos y se colocó en un lector de placas de microtitulación Victor 2. Se hizo un seguimiento del desarrollo de fluorescencia durante 60 minutos y se calculó la velocidad lineal de la reacción. La CI50 se determinó utilizando Graph Pad Prism mediante un ajuste de curva de cuatro parámetros.

Ejemplo 6: Los inhibidores de HDAC6 presentan sinergia con los IMiD en la eliminación de células de linfoma

En este experimento, se demuestra que la combinación de un inhibidor de HDAC6 (**Compuesto A**, **Compuesto B**) con cualquiera de lenalidomida (**Compuesto E**) o pomalidomida (**Compuesto F**) conduce a disminuciones sinérgicas en la viabilidad de las células de linfoma de células del manto (MCL) Mino y Jeko1 *in vitro*. La relevancia de la inhibición de HDAC6 para este efecto sinérgico se validó demostrando interacciones sinérgicas de cualquiera de las moléculas IMiD (lenalidomida o pomalidomida) con el **Compuesto C***, que es 300 veces más selectivo para HDAC6 sobre las HDAC de clase I.

Brevemente, para los ensayos de viabilidad, las células se sembraron en placas de 384 pocillos y se trataron por cuadruplicado en un formato de dosis-matriz con un inhibidor de HDAC6 (**Compuesto A**, **Compuesto B**, o **Compuesto C***) combinados con lenalidomida o pomalidomida. Después de incubar estas células durante 72 horas, se evaluó la viabilidad celular total mediante un ensayo MTS (Aqueous One, Promega). La fracción afectada (Fa) se determinó posteriormente para cada combinación de dosis y se evaluó el índice de combinación (CI) utilizando el método de Chou-Talalay. Los valores de CI menores de uno representan un efecto sinérgico, los valores iguales a uno sugieren un efecto aditivo, y los valores mayores que dos indican un efecto antagónico. Como se puede observar a partir de los gráficos Fa-CI en las **Figuras 1A-F**, todos los inhibidores de HDCA6 mostraron una fuerte

evidencia de sinergia con los IMiD sometidos a prueba en una amplia gama de Fa. Esto se evidencia por el gran número de datos puntuales (que representan combinaciones de dosis individuales) en el gráfico Fa-CI que caen por debajo del punto de corte altamente restrictivo de 0,7.

5 Ejemplo 7: Los inhibidores de HDAC actúan sinérgicamente para promover la apoptosis combinados con fármacos inmunomoduladores (IMiD) en células de linfoma de células del manto (MCL)

10 Los inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) han demostrado un beneficio clínico significativo como agentes únicos en los linfomas de células T cutáneas y periféricas, y han recibido la aprobación de la FDA para estas indicaciones. El Ricolinostat (**Compuesto A**) es el primer inhibidor selectivo oral de HDAC6 disponible en su clase (aproximadamente 11 veces más selectivo que los HDAC de clase I). En la presente memoria se describe una evaluación de la actividad potencial de ricolinostat en líneas celulares de MCL combinado con IMiD.

15 Las **Figuras 2A-C** muestran que el tratamiento de las células de linfoma del manto con **Compuesto A** o **Compuesto B** y/o IMiD dieron como resultado una disminución de la progresión del ciclo celular. La **Figura 2A** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Jeko1 durante 4 días con DMSO, **Compuesto B** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto B** con IMiD sobre la inhibición del ciclo celular. La **Figura 2B** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Mino durante 4 días con DMSO, **Compuesto A** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto A** con IMiD sobre la inhibición del ciclo celular. La **Figura 2C** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Mino durante 4 días con DMSO, **Compuesto B** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto B** con IMiD sobre la inhibición del ciclo celular.

25 Las **Figuras 3A-B** mostrar que el tratamiento de las células de linfoma de células del manto con **Compuesto A** o **Compuesto B** e IMiD produjo aumentos sinérgicos en la apoptosis celular. La **Figura 3A** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Jeko1 durante 4 días con DMSO, **Compuesto A** (2 μ M), Lenalidomida (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto A** con cualquier IMiD sobre la inducción de la apoptosis. La **Figura 3B** muestra el efecto del tratamiento de células de linfoma de células del manto Jeko1 durante 4 días con DMSO, **Compuesto B** (2 μ M), Pomalidomida (1 μ M) o combinaciones de **Compuesto B** con pomalidomida sobre la inducción de la apoptosis.

35 **Figura 4** es una imagen de una inmunotransferencia de células de linfoma de células del manto Jeko1 que muestra que la combinación de **Compuesto A** y pomalidomida condujo a una mayor supresión de la expresión de MYC, IRF4 e IKZF3, todos los cuales son reguladores transcripcionales clave en el cáncer. Los marcadores de apoptosis (PARP escindido) también se incrementaron mediante el tratamiento combinado.

40 El tratamiento combinado de líneas MCL con **Compuestos A y B** y lenalidomida o pomalidomida en un formato de dosis-matriz dio como resultado disminuciones sinérgicas en la viabilidad celular *in vitro*. El crecimiento celular reducido estuvo acompañado por un aumento de la apoptosis después del tratamiento combinado, así como una reducción de la expresión de los factores de transcripción oncogénicos críticos MYC e IRF4. En general, estos datos respaldan la evaluación continua de la actividad de los **Compuestos A y B** en linfoma de células del manto combinados con cualquiera de los IMiD.

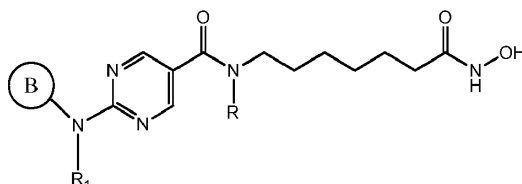
45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado comúnmente conocido por un experto en la técnica.

Equivalentes

50 Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Tales equivalentes, pero solo en la medida en que están cubiertos por las siguientes reivindicaciones, están abarcados por la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del linfoma que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de histona desacetilasa 6 (HDAC6) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un fármaco inmunomodulador (IMiD) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el inhibidor específico de HDAC6 es un compuesto de Fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde,

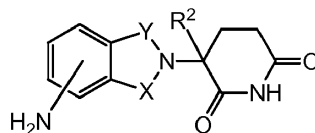
el anillo B es arilo o heteroarilo;

R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁-C₆;

y

R es H o alquilo C₁-C₆; y

en donde el fármaco inmunomodulador es un compuesto de Fórmula III:



(III)

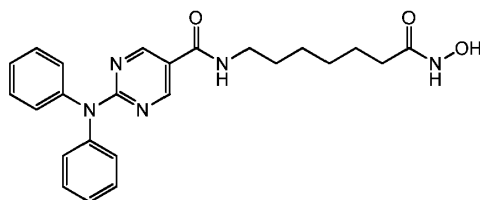
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde,

uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es CH₂ o C=O; y

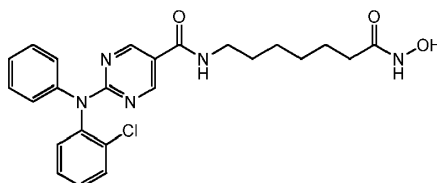
R² es H o alquilo C₁-C₆.

2. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula I es:



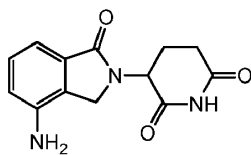
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula I es:



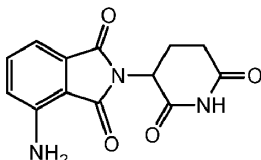
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula III es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 5. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula III es:

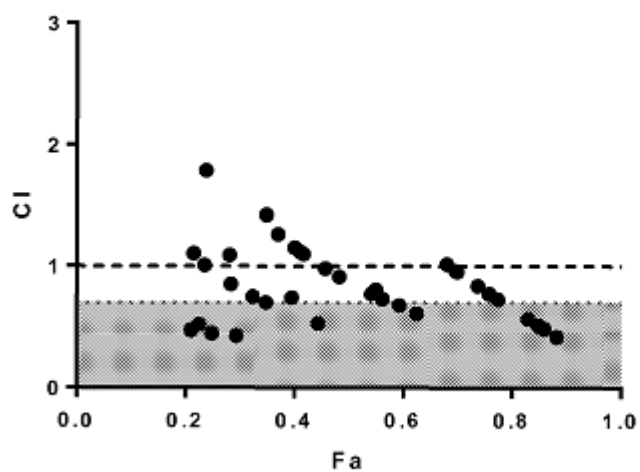


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 6. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en formas de dosificación separadas.
- 15 7. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en una única forma de dosificación.
8. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran en diferentes momentos.
- 20 9. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de HDAC y el fármaco inmunomodulador se administran sustancialmente al mismo tiempo.

Figura 1A

Compuesto A + lenalidomida



Compuesto A + pomalidomida

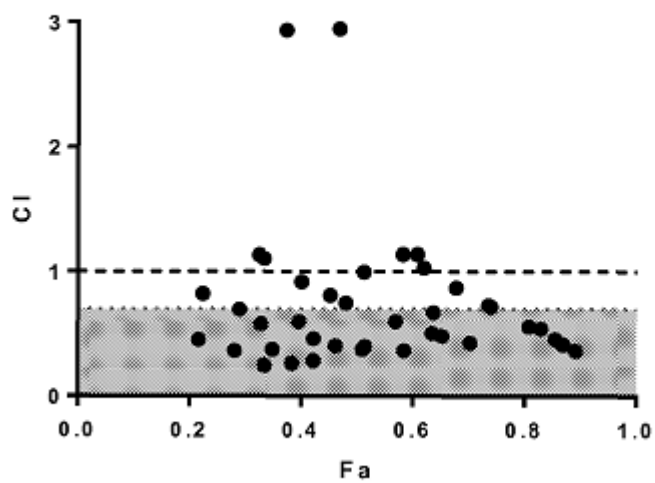


Figura 1B

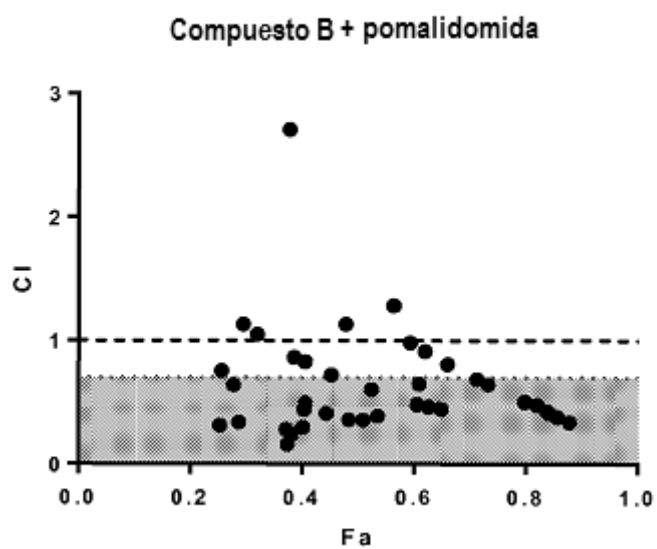
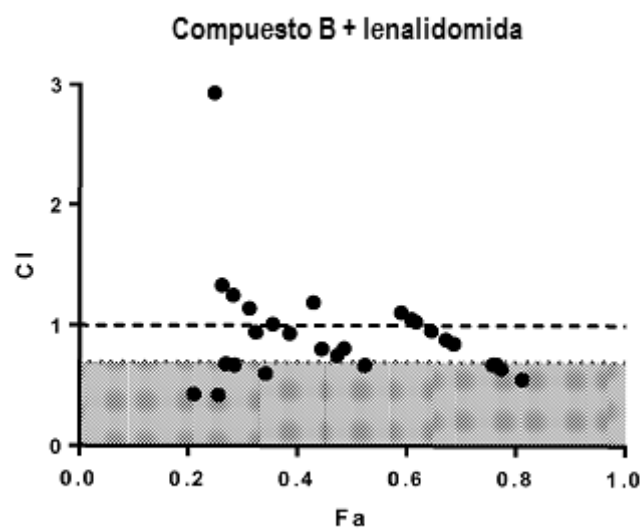
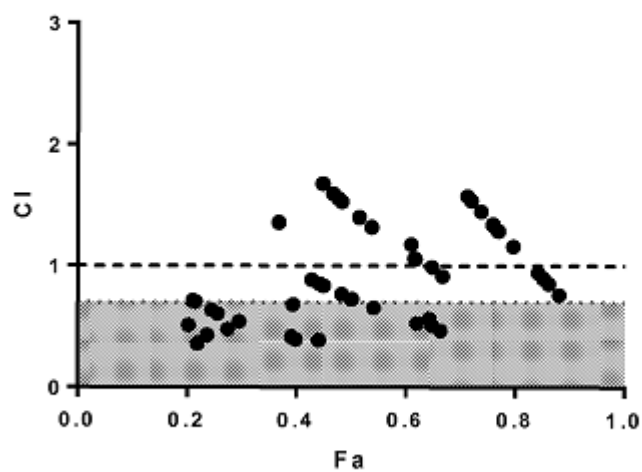


Figura 1C

Compuesto C + lenalidomida



Compuesto C + pomalidomida

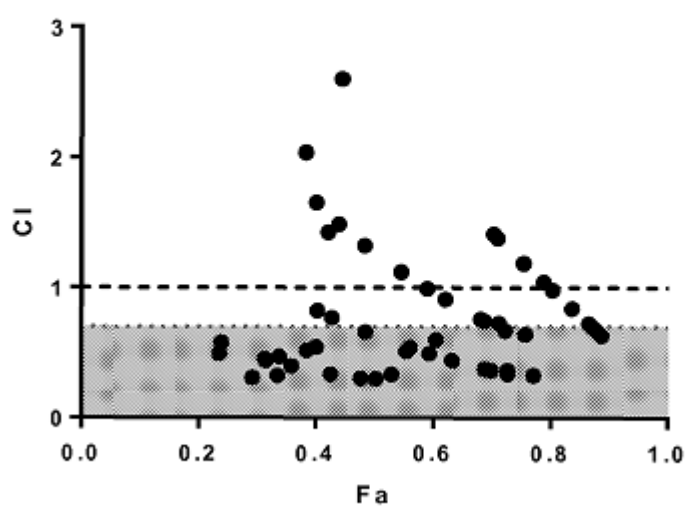


Figura 1D

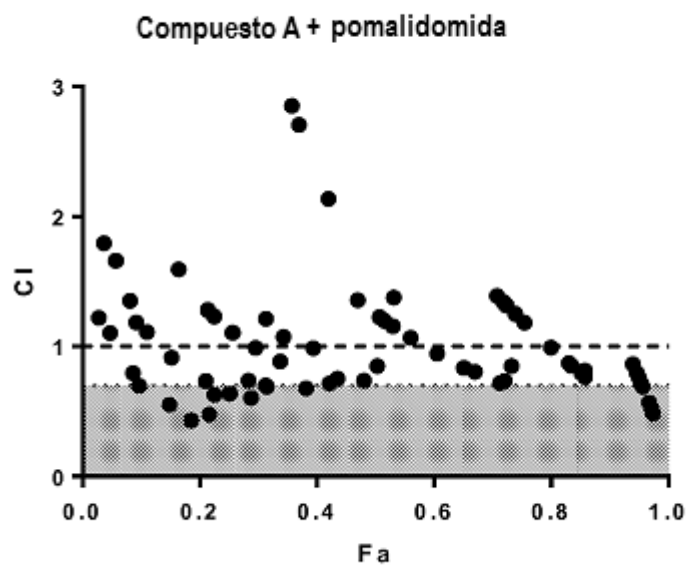


Figura 1E

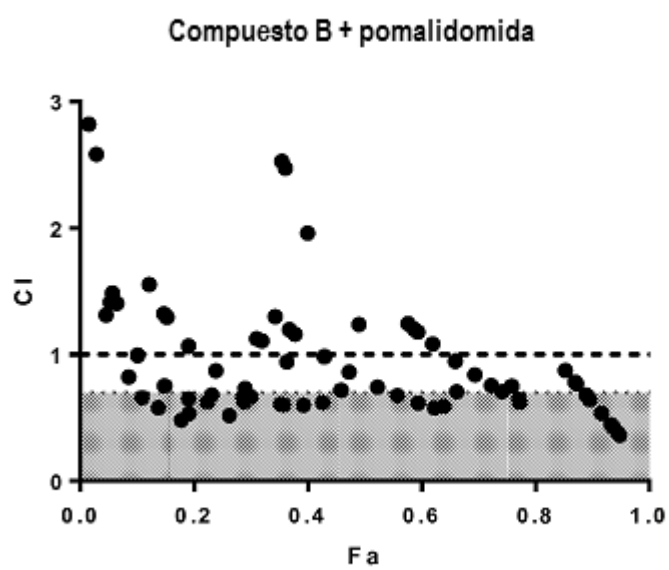
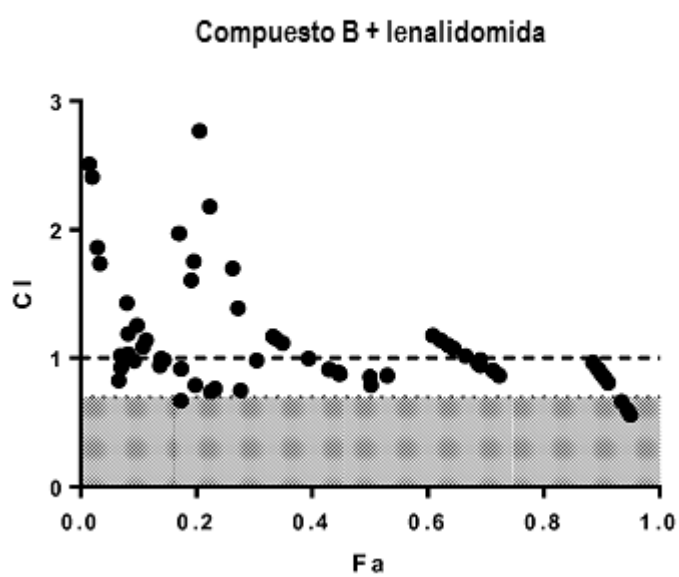
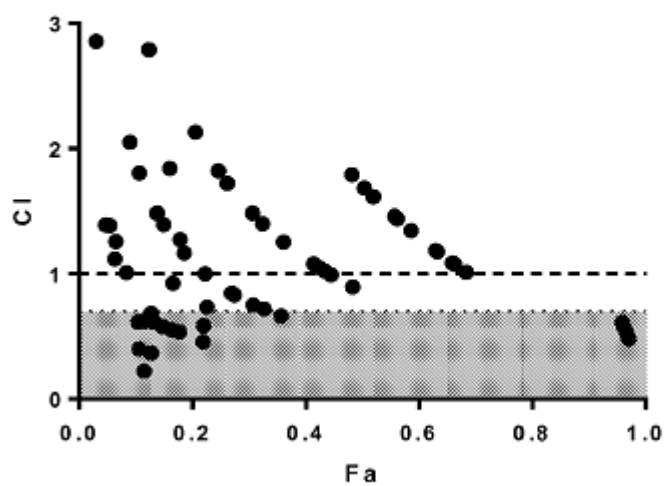


Figura 1F

Compuesto C + lenalidomida



Compuesto C + pomalidomida

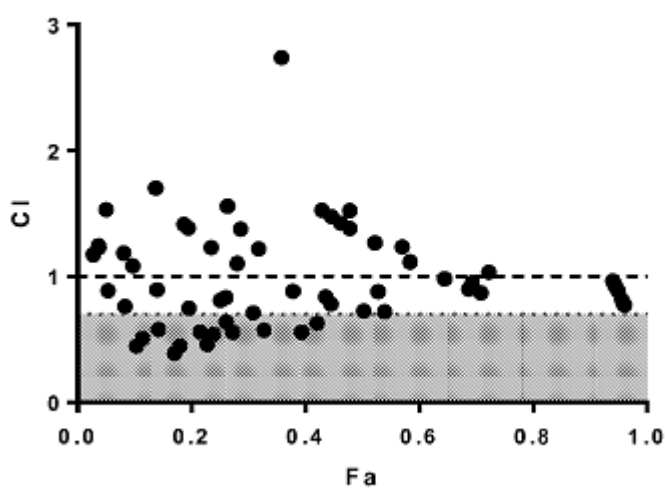
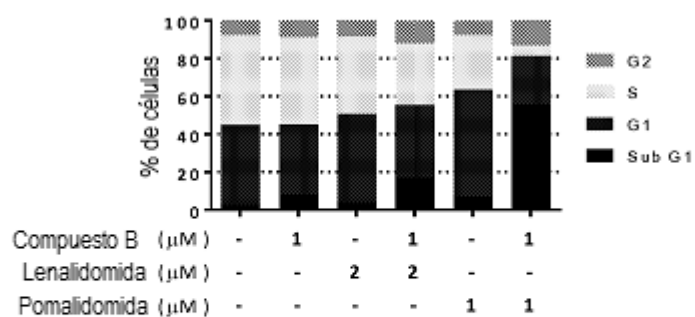
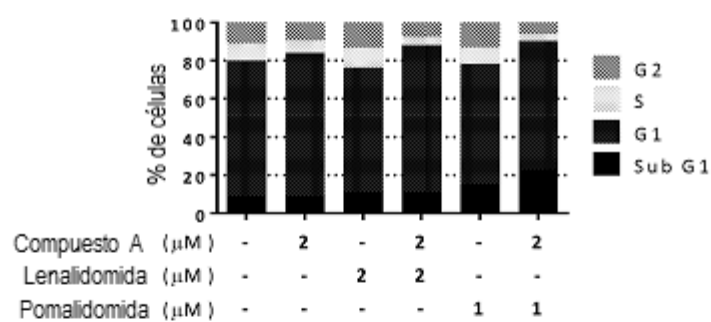


Figura 2

A



B



C

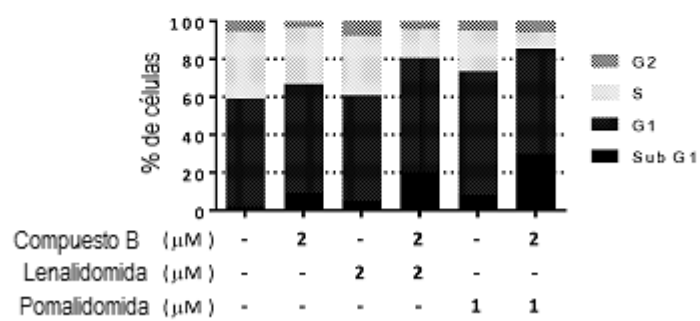
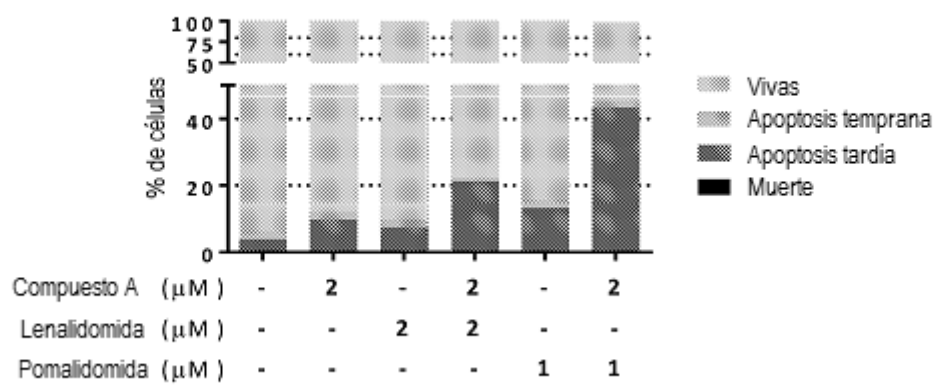


Figura 3

A



B

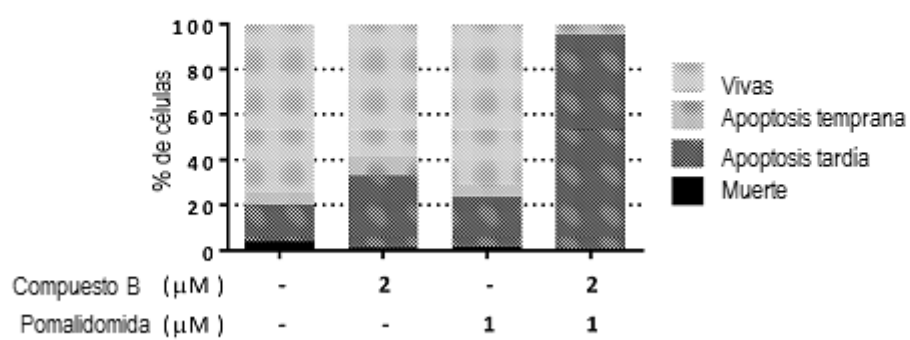


Figura 4

