

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 933**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/505** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/5377** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2014 PCT/US2014/059640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15054355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2014 E 14852240 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3054953**

54 Título: **Inhibidores de la HDAC en combinación con los inhibidores de la pi3k, para el tratamiento del linfoma no Hodgkin**

30 Prioridad:

**10.10.2013 US 201361889207 P**

**03.12.2013 US 201361911097 P**

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

**14.04.2021**

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 S.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 818 933 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

Inhibidores de la HDAC en combinación con los inhibidores de la pi3k, para el tratamiento del linfoma no Hodgkin

5 Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud provisional de los EE.UU. núm. de Serie 61/889,207, presentada el 10 de octubre de 2013, y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. de Serie 61/911,097, presentada el 3 de diciembre de 2013.

10

Antecedentes

El documento núm. WO 2011/091213 se refiere a los compuestos de amida inversa como los inhibidores de la proteína desacetilasa y los métodos para usarlos.

15

Las enzimas histonas desacetilasa (HDAC) representan objetivos terapéuticos atractivos en el linfoma no Hodgkin (LNH), pero desafortunadamente los inhibidores de la HDAC no selectivos han dado lugar a toxicidades que limitan la dosis en los pacientes.

20

Las fosfatidilinositol-3-quinazas (PI 3-quinazas, PI3K, PI(3)K, PI-3K, fosfatidilinositol-3-quinazas o fosfoinositida 3-quinazas) son una familia de las enzimas que participan en las funciones celulares, como el crecimiento, la proliferación celular, diferenciación, motilidad, supervivencia y el tráfico intracelular, que a su vez están implicados en el cáncer. Las PI3K son una familia de las enzimas transductoras de las señales intracelulares relacionadas, capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol.

25

Debido a las toxicidades limitantes de la dosis de los inhibidores de la HDAC no selectivos, existe una necesidad continua en la técnica de las composiciones y los métodos más eficaces y menos tóxicos para el tratamiento del linfoma no Hodgkin. Para satisfacer estas necesidades, en la presente se proporcionan inhibidores de la HDAC, las combinaciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), y los métodos para el tratamiento del linfoma no Hodgkin. Los compuestos, las combinaciones y los métodos de la invención son bien tolerados y no presentan las toxicidades limitantes de la dosis de las terapias anteriores.

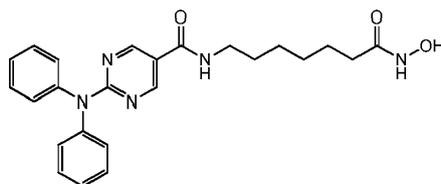
30

Resumen de la invención

35

En el primer aspecto de la invención, se proporciona una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), en donde, el inhibidor específico de la HDAC6 es:

40



45

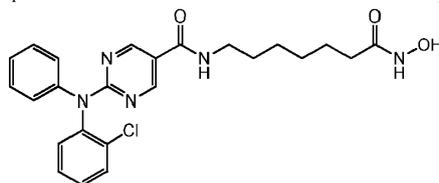
o una sal farmacéuticamente aceptable de este;

y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), en donde, el inhibidor de la PI3K es el GDC-0941 o GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

50

En el segundo aspecto de la invención, se proporciona una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), en donde, el inhibidor específico de la HDAC6 es:

55



60

o una sal farmacéuticamente aceptable de este;

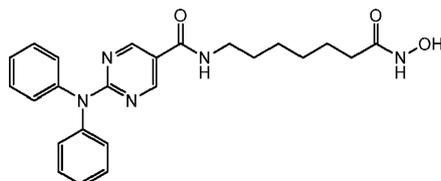
y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), en donde, el inhibidor de la PI3K es el GDC-0941 o GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

65

En la presente se proporciona las combinaciones farmacéuticas para el tratamiento del linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita. La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier tema incluido en la presente y que esté fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

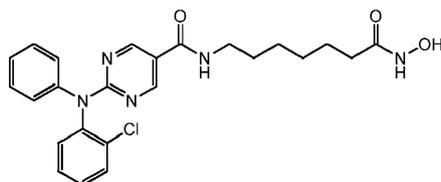
En algunas modalidades, las combinaciones disminuyen la viabilidad celular, la proliferación celular y aumentan sinérgicamente la apoptosis de las células.

En modalidades específicas, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Aún en otras modalidades, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

El inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), es GDC-0941 o GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En algunas modalidades, el inhibidor de la HDAC se administra con un portador farmacéuticamente aceptable. En otras modalidades, la combinación del inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administra con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administran en formas de dosificación separadas. En otras modalidades, el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administran en una única forma de dosificación.

En algunas modalidades, el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administran en diferentes tiempos. En otras modalidades, el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administran sustancialmente al mismo tiempo.

En algunas modalidades, la combinación del inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) logra un efecto sinérgico en el tratamiento del individuo que lo necesita. En algunas modalidades, la combinación del inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) logra un efecto sinérgico en el tratamiento del individuo que lo necesita, en donde, la combinación se administra en dosis que no serían efectivas cuando uno o ambos de los compuestos se administran solos, pero dichas cantidades son eficaces en combinación.

Se proporciona un método para disminuir la viabilidad celular de las células cancerosas mediante la administración de un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), o una combinación que comprende un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

Se proporciona un método para aumentar sinérgicamente la apoptosis de las células cancerosas mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

Se proporciona un método para disminuir la proliferación celular de las células cancerosas mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

Se proporciona un método para reducir el crecimiento tumoral mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

5 Se proporciona un método para suprimir la expresión de Myc mediante la administración de una combinación que comprende un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

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

#### Breve descripción de las figuras

15 Las Figuras 1A-F muestran la representación del sinergismo  $F_A/CI$  después del tratamiento de las líneas celulares de linfoma humano con GDC-0941 (pictilisib) y el Compuesto A, Compuesto B, o Compuesto C. Para el linfoma de células del manto (MCL) se utilizaron las células Mino, Jeko1 y Granta-519, mientras que las células U2932 y SUDHL16 representaban los subtipos de las células B activadas (ABC) y del centro germinal (GC) del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Los puntos de los datos con valores de índice de combinación (CI) < 1 indican las combinaciones del tratamiento que dan como resultado disminuciones sinérgicas en la viabilidad celular.

20 Las Figuras 2A-F muestran la representación del sinergismo  $F_A/CI$  después del tratamiento de las líneas celulares de linfoma humano con CAL-101 (GS-1101, idelalisib, Zydelig) y el Compuesto A, Compuesto B o el Compuesto C. Para el linfoma de células del manto (MCL) se utilizaron las células Mino, Jeko1 y Granta-519, mientras que las células U2932 y SUDHL16 representaban los subtipos de las células B activadas (ABC) y del centro germinal (GC) del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Los puntos de los datos con valores de índice de combinación (CI) < 1 indican las combinaciones del tratamiento que dan como resultado disminuciones sinérgicas en la viabilidad celular.

30 Las Figuras 3A-C son gráficos que muestran los efectos del tratamiento de las células del linfoma de células del manto (Jeko1 - Figura 3A, Mino - Figura 3B, y Granta-519 - Figura 3C) con DMSO, Compuesto A o B (2  $\mu$ M), GDC-0941 (0,075-0,5  $\mu$ M), o la combinación del Compuesto A o B (2  $\mu$ M) con GDC-0941 (0,075-0,5  $\mu$ M) sobre la inhibición del ciclo celular. Como alternativa, las células se trataron con DMSO, Compuesto A o B (2  $\mu$ M), CAL-101 (1-2  $\mu$ M) o la combinación del Compuesto A o B (2  $\mu$ M) con CAL-101 (1-2  $\mu$ M) antes de medir los efectos sobre la inhibición del ciclo celular. El tratamiento de la combinación con cualquiera de los inhibidores de la PI3K dio como resultado reducciones adicionales en la progresión del ciclo celular consistente con una proliferación disminuida.

35 Las Figuras 4A-C son gráficos que muestran los efectos del tratamiento de Jeko1 (Figuras 4A y 4B) y Mino (Figura 4C) células del linfoma de células del manto con DMSO, Compuesto A o B (2-3  $\mu$ M), GDC-0941 (0,075-2  $\mu$ M), o la combinación del Compuesto A o B (2-3  $\mu$ M) con GDC-0941 (0,075-2  $\mu$ M) en la inducción de la apoptosis. Como alternativa, las células se trataron con DMSO, Compuesto A o B (2  $\mu$ M), CAL-101 (2  $\mu$ M) o la combinación del Compuesto A o B (2  $\mu$ M) con CAL-101 (2  $\mu$ M) antes de medir la inducción de la apoptosis. El tratamiento combinado con cualquiera de los inhibidores de la PI3K dio como resultado aumentos sinérgicos en la apoptosis celular.

40 La Figura 5 es un gráfico que muestra los efectos del tratamiento de los ratones CB-17 SCID con Vehículo, GDC-0941 solo (100 mg/kg PO QD) o GDC-0941 (100 mg/kg PO QD) más el Compuesto A (30 mg/kg IP QD) en peso corporal. Todos los tratamientos se toleraron bien sin evidencia evidente de la toxicidad, y la pérdida del peso corporal de bajo nivel se recuperó al final del período del tratamiento.

45 La Figura 6 es un gráfico que muestra un crecimiento tumoral significativamente reducido tras el tratamiento de los ratones que portan los xenoinjertos del tumor Granta-519 con la combinación del Compuesto A (100 mg/kg PO BID) y GDC-0941 (75 mg/kg PO QD) en relación con el tratamiento con cualquiera de los agentes únicos.

50 Las Figuras 7A-B muestran imágenes de inmunotransferencias de Mino (Figura 7A) y células Granta-519 (Figura 7B) que muestran que la combinación del Compuesto A y tanto el GDC-0941 o CAL-101 conduce a una supresión adicional de la expresión de Myc, un regulador transcripcional clave en el cáncer, en relación con cualquiera de los agentes únicos.

#### Descripción detallada

55 La presente solicitud está dirigida, generalmente, a las combinaciones que comprenden un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la PI3K como se define en las reivindicaciones, para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

#### Definiciones

60 Más abajo se mencionan las definiciones de los diversos términos usados para describir esta invención. Estas definiciones se aplican a los términos a medida que se usan a lo largo de esta descripción y las reivindicaciones, a menos que se limite de cualquier otra manera en casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más grande.

El término "aproximadamente" generalmente indica una posible variación de no más del 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 las porciones hidrocarbonadas saturadas de cadena lineal o ramificada que contienen, en determinadas modalidades, entre uno y seis, o uno y ocho átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de porciones C<sub>1-6</sub>-alquilo incluyen porciones metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, *terc*-butilo, neopentilo, n-hexilo; y los ejemplos de porciones C<sub>1-8</sub>-alquilo incluyen porciones metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, neopentilo, n-hexilo, heptilo y octilo.

El número de los átomos de carbono en un sustituyente alquilo puede indicarse con el prefijo "C<sub>x-y</sub>", "donde x es el mínimo e, y es el número máximo de los átomos de carbono en el sustituyente. Del mismo modo, una cadena C<sub>x</sub> significa una cadena de alquilo que contiene x átomos de carbono.

El término "alcoxi" se refiere a una porción -O-alquilo.

Los términos "cicloalquilo" o "cicloalquileno" indican un grupo monovalente derivado de un compuesto de anillo carbocíclico saturado o parcialmente insaturado monocíclico o policíclico. Ejemplos de C<sub>3-8</sub>-cicloalquilo incluyen al ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo; y ejemplos de C<sub>3-12</sub>-cicloalquilo incluyen al ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, biciclo [2,2,1] heptilo y biciclo [2,2,2] octilo. Se contemplan además los grupos monovalentes que se derivan 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 al ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y ciclooctenilo.

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 al fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo e idenilo. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen 6 átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen de seis a diez átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen de seis a dieciséis átomos de carbono.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo o porción (*por ejemplo*, bi-, o tricíclico o más) condensado o no condensado mono o policíclico 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 modalidades, el grupo heteroarilo tiene de aproximadamente uno a seis átomos de carbono y, en otras modalidades adicionales, de uno a quince átomos de carbono. En algunas modalidades, el grupo heteroarilo contiene de cinco a dieciséis átomos en el anillo, de los cuales un átomo del anillo se selecciona del oxígeno, azufre y nitrógeno; cero, uno, dos o tres átomos del anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente del oxígeno, azufre y nitrógeno; y los átomos restantes del anillo son carbono. El heteroarilo incluye al piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, indolilo, quinolinilo, isoquinololinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo y acridinilo.

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

El término "combinación", se refiere a dos o más agentes terapéuticos para tratar 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" abarca además 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 de combinación", se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descritos en la presente descripción. Tal administración comprende la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, como en una única cápsula que tiene una relación fija de los principios activos o en envases múltiples, separados (*por ejemplo*, cápsulas) para cada principio activo. Además, dicha administración abarca además el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial, ya sea aproximadamente al mismo tiempo o a diferentes tiempos. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de las afecciones o los trastornos descritos en la presente descripción.

El término "la HDAC" se refiere a la histona desacetilasas, que son las 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 histonas desacetilasas conocidas, que se clasifican en cuatro grupos. Las HDAC de clase I, que incluyen la HDAC1, HDAC2, HDAC3 y la HDAC8, se relacionan con el gen de la levadura RPD3. Las HDAC de clase II, que incluyen la HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y la HDAC10, se relacionan con el gen de la levadura Hda1. Las HDAC de clase III, que se conocen además como sirtuinas, se relacionan con el gen Sir2 e incluyen al SIRT1-7. Las HDAC de clase IV, que solo contienen la HDAC11, tienen características de la HDAC de clase I y II. El término "la HDAC" se refiere a una cualquiera o más de las 18 histonas desacetilasas conocidas, a menos que se especifique lo contrario.

El término "específico de la HDAC6" significa que el compuesto se une a la HDAC6 en un grado sustancialmente mayor, como 5X, 10X, 15X, 20X o más, que, a cualquier otro tipo de enzima de la HDAC, como la HDAC1 o la HDAC2. Es decir, el compuesto es selectivo para la HDAC6 sobre cualquier otro tipo de la enzima de la HDAC. Por ejemplo, un compuesto que se une a la HDAC6 con un IC<sub>50</sub> de 10 nM y a la HDAC1 con un IC<sub>50</sub> de 50 nM es específico de la HDAC6. Por otro lado, un compuesto que se une a la HDAC6 con un IC<sub>50</sub> de 50 nM y a la HDAC 1 con un IC<sub>50</sub> de 60 nM no es específico de la HDAC6

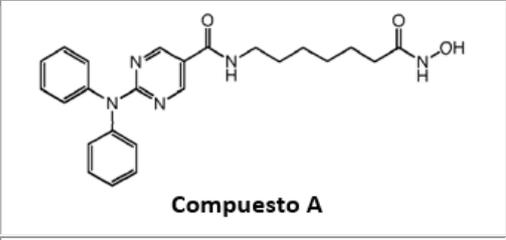
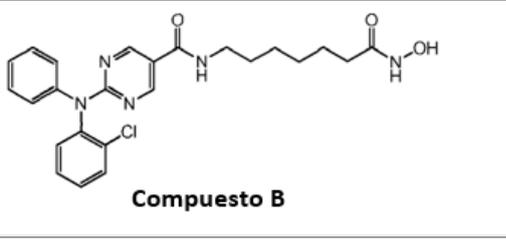
El término "inhibidor" es sinónimo del término antagonista.

Inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC)

En la presente se proporcionan las combinaciones farmacéuticas para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita.

Las combinaciones de la invención para usar comprenden un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC). El inhibidor de la HDAC es un inhibidor específico de la HDAC6.

El inhibidor específico de la HDAC6 se selecciona de:

 <p><b>Compuesto A</b></p>	 <p><b>Compuesto B</b></p>
2-(difenilamino)-N-(7-hidroxi-amino)-7-oxoheptilpirimidina-5-carboxamida	2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-hidroxi-amino)-7-oxoheptilpirimidina-5-carboxamida
IC <sub>50</sub> (nM) HDAC6 = 10 HDAC3 = 84	IC <sub>50</sub> (nM) HDAC6 = 4 HDAC3 = 76

o sales farmacéuticamente aceptables de estos.

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

En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente no están solvatados. En otras modalidades, uno o más de los compuestos están en forma solvatada. Como se conoce en la técnica, el solvato puede ser cualquier disolvente farmacéuticamente aceptable, como el agua y el etanol.

Inhibidores de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)

Las combinaciones para usar en la invención comprenden un inhibidor de la PI3K que se selecciona del GDC-0941 y el GS-1101.

Un inhibidor de la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) puede ser cualquier compuesto o compuestos capaces de reducir la actividad catalítica de cualquiera de las isoformas de la PI3K y la posterior señalización mediada por la PI3K. Particularmente, los inhibidores de la PI3K pueden ser macromoléculas biológicas o pueden ser pequeños compuestos orgánicos o inorgánicos. Preferentemente, los inhibidores de la PI3K son pequeños compuestos orgánicos y preferentemente compuestos sintéticos.

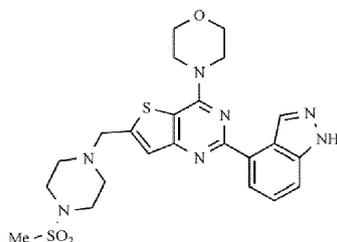
Por "señalización mediada por la PI3K" se entiende cualquiera de las actividades biológicas que dependen, directa o indirectamente, de la actividad de la PI3 quinasa. Los ejemplos de la señalización mediada por la PI3K son señales que conducen a la proliferación y la supervivencia de las células que expresan la PI3K, y la estimulación de una o más vías de señalización de la PI3K dentro de las células que expresan la PI3K.

Una "vía de señalización" o "vía de transducción de las señales" de la PI3K significa al menos una reacción bioquímica, o un grupo de reacciones bioquímicas, que resultan de la actividad de la PI3K, y que generan una señal que, cuando se transmite a través de la vía de la señal, conduce a la activación de una o más moléculas corriente abajo en la cascada de señalización. Las vías de transducción de señales involucran una serie de moléculas de transducción de señales que conducen a la transmisión de una señal desde la superficie celular a través de la membrana plasmática de una célula, y a través de una o más en una serie de moléculas de transducción de las señales, a través del citoplasma de la célula, y en algunos casos, en el núcleo de la célula. De particular interés para la presente invención son las vías de transducción

de las señales de la PI3K que en última instancia regulan (mejoran o inhiben) la activación del NF-κB a través de la vía de señalización de NF-κB (ver Hussain y otros, PLoS One. 2012;7(6):e39945).

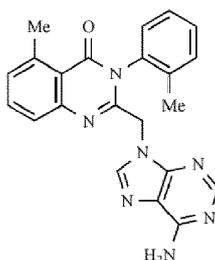
Los inhibidores de la PI3K incluyen al CAL-101 y al GDC-0941

La estructura química del GDC-0941 es:



Ver Yao y otros, "Suppression of Her2/Her3-mediated growth of breast cancer cells with combinations of GDC-0941 PI3K inhibitor, trastuzumab, and pertuzumab", Clin. Cancer Res., volumen. 15 (12), páginas 4147-56 (2009); Junttila y otros, "Ligand-independent Her2/Her3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941", Cancer Cell., volumen. 15 (5), páginas 429-440 (2009); y Folkes y otros, "The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thienol[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer", J. Med. Chem., volumen. 51(18), páginas 5522-32 (2008).

La estructura química del GS-1101/CAL-101 es:



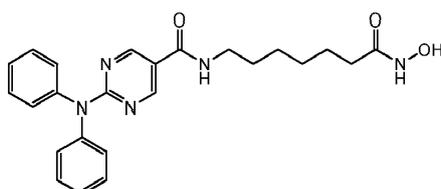
Ver las patentes de los EE.UU. números: 6800620; 6949535; 8138195; 8492389; 8637533; RE44599; y RE44638.

En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente no están solvatados. En otras modalidades, uno o más de los compuestos están en forma solvatada. Como se conoce en la técnica, el solvato puede ser cualquier disolvente farmacéuticamente aceptable, como el agua, el etanol y similares.

Composiciones, combinaciones y las composiciones y combinaciones farmacéuticas

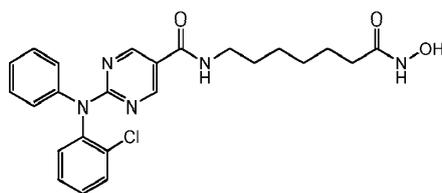
En la presente se proporcionan las combinaciones para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita. Se proporcionan las combinaciones que comprenden un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) como se define en las reivindicaciones, para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita.

El inhibidor de la HDAC es un inhibidor específico de la HDAC6. En modalidades específicas, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Aún en otras modalidades, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



5

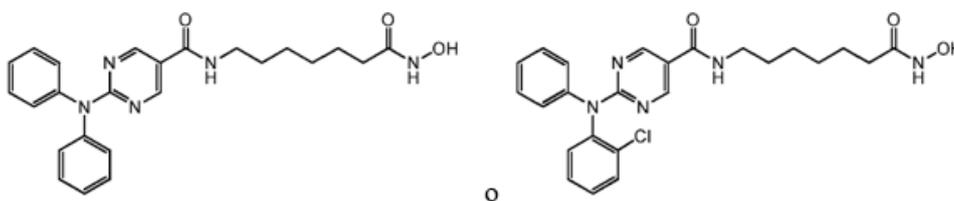
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10

El inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) es el GDC-0941 o GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

15

En una modalidad, en la presente se proporciona una terapia de combinación que comprende un inhibidor específico de la HDAC6 y un inhibidor de fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), en donde, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



20

25

o las sales farmacéuticamente aceptables de estos; y el inhibidor de la PI3K es el GDC-0941 el GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

30

Aunque los inhibidores específicos de la HDAC6 se describen en sus formas neutras, en algunas modalidades, estos compuestos se usan en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. "Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a los derivados de los compuestos descritos en donde, el compuesto precursor se modifica convirtiendo una porción ácido o base existente en su forma de sal. Los ejemplos de las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de los ácidos orgánicos o minerales de los residuos básicos tales como las aminas; sales alcalinas u orgánicas de los residuos ácidos tales como los ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de los ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene una porción básica o ácida mediante los métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse al hacer reaccionar las formas ácidas o bases libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren los medios no acuosos como el éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de las sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> sup, editora Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1985, página. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977).

35

40

#### Dosis/Administración

45

En algunas modalidades, el inhibidor de la HDAC se administra simultáneamente con el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K). La administración simultánea normalmente significa que ambos compuestos ingresan al paciente exactamente al mismo tiempo. Sin embargo, la administración simultánea incluye además la posibilidad de que el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) ingresen al paciente en diferentes tiempos, pero la diferencia de tiempo es lo suficientemente minúscula como para que el primer compuesto administrado no tenga el tiempo para hacer efecto en el paciente antes de la entrada del segundo compuesto administrado. Estos tiempos de retraso corresponden típicamente a menos de 1 minuto y, más típicamente, a menos de 30 segundos. En un ejemplo, en donde los compuestos están en solución, puede lograrse la administración simultánea mediante la administración de una solución que contenga la combinación de los compuestos. En otro ejemplo, puede emplearse la administración simultánea de las soluciones separadas, una de las cuales contiene el inhibidor de la HDAC y la otra contiene el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K). En un ejemplo, en donde los compuestos están en forma sólida, puede lograrse la administración simultánea mediante la administración de una composición que contiene la combinación de los compuestos. Como alternativa, la administración simultánea puede lograrse administrando dos composiciones separadas, una que comprende el inhibidor de la HDAC y la otra que comprende el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

55

60

En otras modalidades, el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) no se administran simultáneamente. En algunas modalidades, el inhibidor de la HDAC se administra antes que el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K). En otras modalidades, el inhibidor de fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administra antes que el inhibidor de la HDAC. La diferencia en los tiempos de las administraciones no simultáneas puede ser superior a 1 minuto, cinco minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, dos horas, tres horas, seis horas, nueve horas, 12 horas, etc. En otras modalidades, se proporciona tiempo al primer compuesto administrado para que

65

surta efecto en el paciente antes de que se administre el segundo compuesto administrado. Generalmente, la diferencia del 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 completa o sustancialmente en el paciente.

5

En algunas modalidades, uno o ambos de los inhibidores de la HDAC y el inhibidor de fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administran en una cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad del inhibidor específico de la HDAC6 o un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) que, cuando se administra a un paciente por sí mismo, trata eficazmente el linfoma no Hodgkin. Una cantidad que demuestra ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" en un caso dado, para un individuo en particular, puede no ser eficaz para el 100 % de los individuos tratados de manera similar por la enfermedad o la afección en consideración, incluso aunque dicha dosis se considere una "cantidad terapéuticamente eficaz" por profesionales expertos. La cantidad del compuesto que corresponde a una cantidad terapéuticamente eficaz depende en gran medida del tipo de cáncer, la etapa del cáncer, la edad del paciente que se está tratando y otros hechos. Generalmente, las cantidades terapéuticamente eficaces de estos compuestos son bien conocidas en la técnica, tal como se proporciona en las referencias de apoyo citadas anteriormente.

10

15

En otras modalidades, uno o ambos de los inhibidores de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) se administran en una cantidad o dosificación subterapéuticamente eficaz. Una cantidad subterapéuticamente eficaz es una cantidad del inhibidor de la HDAC o un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) que, cuando se administra a un paciente por sí mismo, no inhibe completamente en el tiempo de la actividad biológica del objetivo pretendido.

20

Ya sea que se administre en cantidades terapéuticas o subterapéuticas, la combinación del inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) debería ser eficaces en el tratamiento del linfoma no Hodgkin. Por ejemplo, una cantidad subterapéutica del inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) puede ser una cantidad eficaz si, cuando se combina con un inhibidor específico de la HDAC6, la combinación es eficaz en el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

25

En algunas modalidades, la combinación de los compuestos exhibe un efecto sinérgico (*es decir*, mayor que el efecto aditivo) en el tratamiento del linfoma no Hodgkin. El término "efecto sinérgico" se refiere a la acción de dos agentes, tales como, por ejemplo, un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), produciendo un efecto, por ejemplo, retardando de la progresión sintomática del cáncer o los síntomas de este, que es mayor que la simple adición de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. Puede calcularse un efecto sinérgico, por ejemplo, mediante el uso de los métodos adecuados como la ecuación Sigmoid-Emax (Holford, N. H. G. and Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación del efecto mediano (Chou, T. C. y Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación mencionada anteriormente puede aplicarse a los datos experimentales para generar un gráfico correspondiente que ayude a evaluar los efectos de la combinación de los fármacos. Los gráficos correspondientes asociados con las ecuaciones referidas anteriormente son la curva de efecto de la concentración, curva de isoblograma y curva índice de combinación, respectivamente.

30

35

40

En diferentes modalidades, en dependencia de la combinación y las cantidades efectivas usadas, la combinación de los compuestos puede inhibir el crecimiento del cáncer, lograr la estasis del cáncer o incluso lograr una regresión sustancial o completa del cáncer.

45

Si bien las cantidades de un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) deberían dar como resultado el tratamiento eficaz del linfoma no Hodgkin, las cantidades, cuando se combinan, preferentemente no son excesivamente tóxicas para el paciente (*es decir*, las cantidades están preferentemente dentro de los límites de la toxicidad establecidos por las guías médicas). En algunas modalidades, ya sea para prevenir una toxicidad excesiva y/o proporcionar un tratamiento más eficaz del linfoma no Hodgkin, se proporciona una limitación en la dosis total administrada. Típicamente, las cantidades consideradas en la presente son por día; sin embargo, los ciclos de medio día y de dos o tres días se consideran además en la presente.

50

Pueden usarse diferentes regímenes de dosificación para tratar el linfoma no Hodgkin. En algunas modalidades, una dosis diaria, como cualquiera de las dosis ejemplares descritas anteriormente, se administra una, dos, tres o cuatro veces al día durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días. En dependencia del estado y la gravedad del linfoma no Hodgkin, un tiempo de tratamiento más corto (*por ejemplo*, hasta cinco días) puede emplearse solo con una dosis alta o puede emplearse un tiempo de tratamiento más prolongado (*por ejemplo*, diez o más días, o semanas, o un mes, o más) solo con una dosis baja. En algunas modalidades, se administra una dosis de una o dos veces al día en días alternos.

55

60

En algunas modalidades, cada dosis contiene tanto un inhibidor de la HDAC como un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) para administrarse como una dosis única, mientras que, en otras modalidades, cada dosis contiene un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) que se administrará en dosis separadas.

65

Los inhibidores específicos de la HDAC6, o sus sales o formas solvatos farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, pueden administrarse mediante cualquiera de los modos de administración aceptados o agentes conocidos en la técnica. Los compuestos pueden administrarse, 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 sólido, semisólido, liofilizado o formas de dosificación líquidas, como, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas de gelatina blanda elástica o dura, polvos, soluciones, suspensiones, supositorios, aerosoles, o similares, preferentemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración simple de dosis precisas. Una vía de administración particular es la oral, particularmente una en la que puede ajustarse un régimen de dosificación diario conveniente de acuerdo con el grado de gravedad de la enfermedad a tratar.

Como se discutió anteriormente, el inhibidor de la HDAC y el inhibidor de la PI3K de la combinación farmacéutica pueden administrarse en una sola dosis unitaria o en formas de dosificación separadas. Como consecuencia, 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 vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables descritos a lo largo de la solicitud pueden combinarse con un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la PI3K en una sola dosis unitaria, así como combinarse individualmente con un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la PI3K cuando estos compuestos se administran por separado.

Los agentes auxiliares y adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, agentes conservantes, humectantes, de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, perfumes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de los microorganismos generalmente la proporcionan diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como los parabenos, clorobutanol, fenol y el ácido sórbico. Pueden incluirse además los agentes isotónicos, como los azúcares y el cloruro de sodio. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de los agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio y la gelatina. Los agentes auxiliares pueden incluir además los agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH y antioxidantes, tales como, por ejemplo, el ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina e hidroxitolueno butilado.

Las formas de dosificación sólidas pueden prepararse con revestimientos y cubiertas, tales como los revestimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes pacificadores y pueden ser de tal composición que liberen el compuesto o compuestos activos en una determinada parte del tracto intestinal de manera retardada. Los ejemplos de composiciones embebidas que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos pueden estar además en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Dichas formas de dosificación se preparan, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., los inhibidores de la HDAC o los inhibidores de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) descritos en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, y los adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, el agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol y etanol; los agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, el alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida; los aceites, particularmente, el 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 los ésteres de los ácidos grasos de sorbitán; o las mezclas de estas sustancias, para formar así una solución o suspensión.

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

Los métodos actuales para preparar esas formas de dosificación se conocen, o resultarán evidentes, para los expertos en esta técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va edición, (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990).

Se proporcionan los métodos para tratar el linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una combinación farmacéutica de la invención. De este modo, en la presente se proporcionan los métodos para tratar el linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una combinación que comprende un inhibidor de la HDAC y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K).

El individuo considerado en la presente es típicamente un ser humano. Sin embargo, el individuo puede ser cualquier mamífero para el que se desee un tratamiento. De este modo, los métodos descritos en la presente pueden aplicarse tanto a las aplicaciones humanas como las 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 velocidad del crecimiento celular en un paciente, o prevenir el crecimiento continuo o la diseminación del linfoma no Hodgkin, o incluso reducir el alcance general del linfoma no Hodgkin. La inhibición del

crecimiento celular anormal puede ocurrir por una variedad de mecanismos que incluyen la muerte celular, apoptosis, detención de la mitosis, inhibición de la división celular, transcripción, traducción, transducción, etc.

Estuches

5

Se proporcionan además los estuches. En algunas modalidades, los estuches comprenden un inhibidor de la HDAC o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10

La frase "paquete" significa cualquier recipiente que contiene los compuestos o las composiciones en la presente presentados. En algunas modalidades, el paquete puede ser una caja o un envoltorio. 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 los materiales de envasado farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, envases tipo burbuja, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una composición seleccionada y el modo deseado de administración y el tratamiento.

15

El estuche puede contener además los elementos que no están contenidos en el paquete, pero que están adheridos al exterior del paquete, por ejemplo, pipetas.

20

Los estuches pueden contener además instrucciones para administrar los compuestos o las composiciones de la invención a un paciente. Los estuches pueden comprender además las instrucciones para los usos aprobados de los compuestos en la presente por agencias reguladoras, tales como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. Los estuches pueden contener además las etiquetas o las inserciones de los productos para los compuestos. El (los) paquete (s) y/o cualquier prospecto del producto pueden aprobarse por las agencias reguladoras. Los estuches pueden incluir los compuestos en fase sólida o en fase líquida (como los tampones proporcionados) en un paquete. Los estuches pueden incluir además los tampones para preparar las soluciones para realizar los métodos y las pipetas para transferir los líquidos de un envase a otro.

25

### EJEMPLOS

30

A continuación, se exponen los ejemplos con el propósito de ilustrar y describir ciertas modalidades específicas de la invención. Sin embargo, el alcance de las reivindicaciones no debe limitarse de ninguna manera por los ejemplos expuestos en la presente.

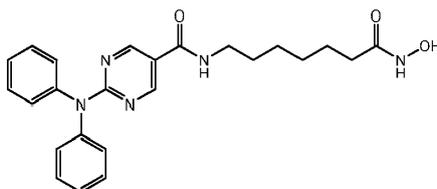
35

La síntesis de los compuestos de fórmula I (por ejemplo, los compuestos A y B) se proporciona en el documento PCT/US2011/021982. La síntesis de los compuestos de fórmula II (por ejemplo, los compuestos C y D) se proporciona en el documento PCT/US2011/060791.

40

Ejemplo 1: Síntesis del 2-(difenilamino)-N-(7-hidroxi-amino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto A)

45



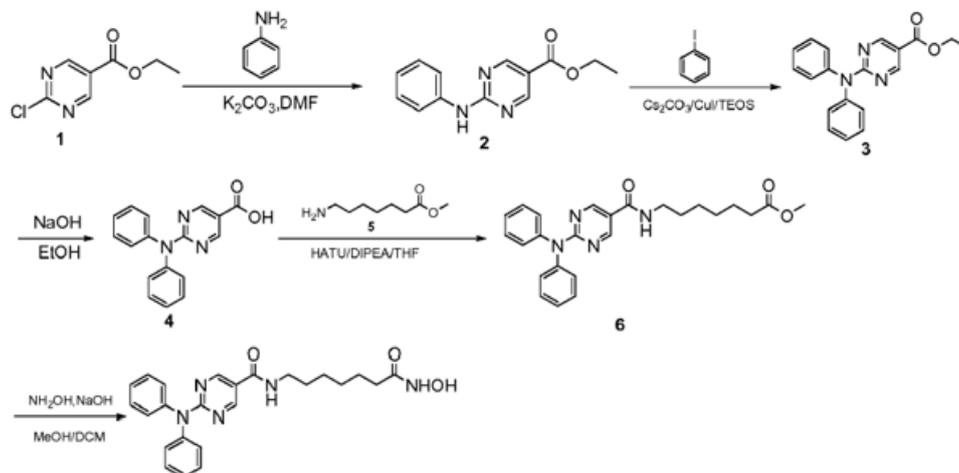
50

55

60

65

## Esquema de Reacción



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Síntesis del compuesto intermedio 2:** Una mezcla de anilina (3,7 g, 40 mmol), compuesto 1 (7,5 g, 40 mmol) y  $K_2CO_3$  (11 g, 80 mmol) 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), luego se lavó con salmuera saturada (200 mL x 3). Las capas orgánicas se separaron y se secaron sobre  $Na_2SO_4$ , se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 10/1) para dar el producto deseado en forma de un sólido blanco (6,2 g, 64 %).

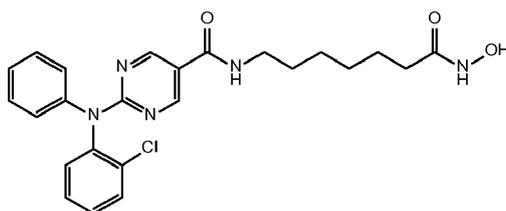
**Síntesis del compuesto intermedio 3:** Una mezcla del compuesto 2 (6,2 g, 25 mmol), yodobenceno (6,12 g, 30 mmol), CuI (955 mg, 5,0 mmol),  $Cs_2CO_3$  (16,3 g, 50 mmol) en TEOS (200 mL) se desgasificó y se purgó con nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 140 °C durante 14 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el residuo se diluyó con EtOAc (200 mL). EtOH al 95 % (200 mL) y  $NH_4FH_2O$  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 horas. Los materiales solidificados se filtraron y lavaron con EtOAc. El filtrado se evaporó hasta secarse y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 10/1) para dar un sólido amarillo (3 g, 38 %).

**Síntesis del compuesto intermedio 4:** Se añadió NaOH 2 N (200 mL) a una solución del compuesto 3 (3,0 g, 9,4 mmol) en EtOH (200 mL). La mezcla se agitó a 60 °C durante 30 min. Después de la evaporación del disolvente, la solución se neutralizó con HCl 2 N para dar un precipitado blanco. La suspensión se extrajo con EtOAc (2 x 200 mL) y las capas orgánicas se separaron, se lavaron con agua (2 x 100 mL), salmuera (2 x 100 mL) y se secaron sobre  $Na_2SO_4$ . La eliminación del disolvente dio un sólido marrón (2,5 g, 92 %).

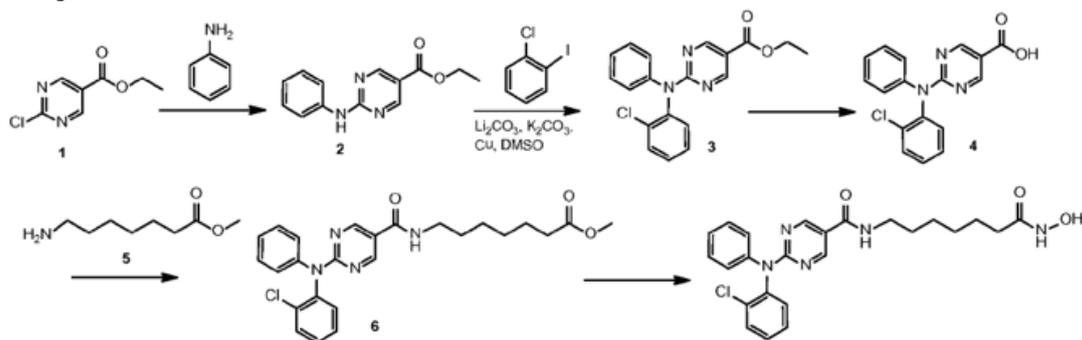
**Síntesis del compuesto intermedio 6:** Una mezcla del compuesto 4 (2,5 g, 8,58 mmol), compuesto 5 (2,52 g, 12,87 mmol), HATU (3,91 g, 10,30 mmol) y DIPEA (4,43 g, 34,32 mmol) se agitaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de filtrar la mezcla de reacción, el filtrado se evaporó hasta secarse y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 2/1) para dar un sólido marrón (2 g, 54 %).

**Síntesis del 2-(difenilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto A):** Una mezcla del compuesto 6 (2,0 g, 4,6 mmol), hidróxido de sodio (2 N, 20 mL) en MeOH (50 mL) y DCM (25 mL) se agitó a 0 °C durante 10 min. Se enfrió la hidroxilamina (50 %) (10 mL) a 0 °C y se añadió a la mezcla. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Después de eliminar el disolvente, la mezcla se neutralizó con HCl 1 M para dar un precipitado blanco. El producto bruto se filtró y se purificó mediante pre-HPLC para dar un sólido blanco (950 mg, 48 %).

**Ejemplo 2: Síntesis del 2-(2-clorofenil)fenilamino)-N-(7-hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto B)**



Esquema de Reacción



Síntesis del compuesto intermedio 2: Ver la síntesis del compuesto intermedio 2 en el Ejemplo 1.

Síntesis del compuesto intermedio 3: Una mezcla del compuesto 2 (69,2 g, 1 equiv.), 1-cloro-2-yodobenceno (135,7 g, 2 equiv.),  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (42,04 g, 2 equiv.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (39,32 g, 1 equiv.), Cu (1 equiv. 45  $\mu\text{m}$ ) en DMSO (690 ml) se desgasificó y se purgó con nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 140 °C. El tratamiento de la reacción dio el compuesto 3 con un rendimiento del 93 %.

Síntesis del compuesto intermedio 4: Ver la síntesis del compuesto intermedio 4 en el Ejemplo 1.

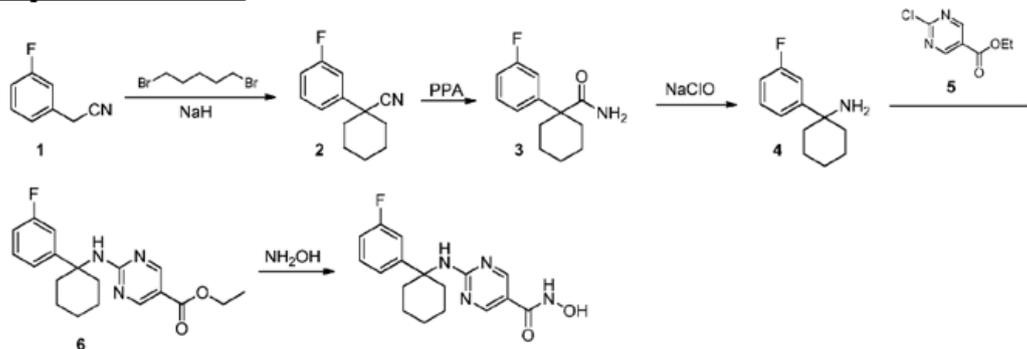
Síntesis del compuesto intermedio 6: Ver la síntesis del compuesto intermedio 6 en el Ejemplo 1.

Síntesis del 2-((1-(3-clorofenil)fenil)amino)-N-(7-hidroxi-amino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida (**Compuesto B**): Ver síntesis del Compuesto A en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3\*: Síntesis del 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidina-5-carboxamida (Compuesto C)

\*Este ejemplo está fuera del alcance de la invención actualmente reivindicada

Esquema de Reacción



Síntesis del compuesto intermedio 2: A una solución del compuesto 1 (100 g, 0,74 mol) en DMF seca (1000 mL) se le añadió 1,5-dibromopentano (170 g, 0,74 mol). Se añadió NaH gota a gota (65 g, 2,2 equiv.) mientras la reacción se enfrió en un baño de hielo. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante la noche a 50 °C. La suspensión se inactivó cuidadosamente con agua helada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 mL). Las capas orgánicas combinadas se concentraron para producir el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para dar el compuesto 2 como un sólido pálido (100 g, 67 %).

**Síntesis del compuesto intermedio 3:** Una solución del compuesto **2** (100 g, 0,49 mol) en PPA (500 mL) se calentó a 110 °C durante aproximadamente 5-6 horas. Una vez completada, la mezcla resultante se ajustó cuidadosamente a un pH de aproximadamente 8-9 con solución NaHCO<sub>3</sub> saturada. El precipitado resultante se recogió y se lavó con agua (1000 mL) para producir el compuesto **3** como un sólido blanco (95 g, 87 %).

**Síntesis del compuesto intermedio 4:** A una solución del compuesto **3** (95 g, 0,43 mol) en n-BuOH (800 mL) se añadió NaClO (260 ml, 1,4 equiv.). Después se añadió NaOH 3 N (400 mL, 2,8 equiv.) a 0 °C y la reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se extrajo con EA (2 x 500 mL), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera. El disolvente se eliminó al vacío para proporcionar el producto bruto que se purificó adicionalmente mediante tratamiento con sal de HCl para producir el compuesto **4** como un polvo blanco (72 g, 73 %).

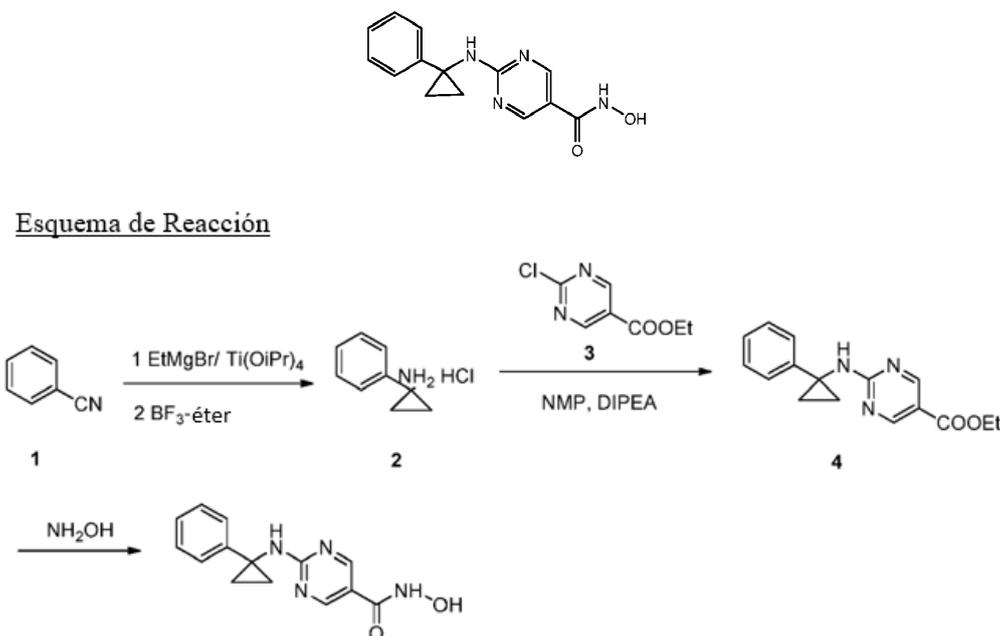
**Síntesis del compuesto intermedio 6:** A una solución del compuesto **4** (2,29 g 10 mmol) en dioxano (50 mL) se añadió el compuesto **5** (1,87 g, 1,0 equiv.) Y DIPEA (2,58 g, 2,0 equiv.). La mezcla se calentó durante toda la noche a 110-120 °C. La mezcla resultante se purificó directamente en columna de gel de sílice para proporcionar el producto acoplado, compuesto **6**, como un sólido blanco (1,37 g, 40 %).

**Síntesis del 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidina-5-carboxamida (Compuesto C):**

A una solución del compuesto **6** (100 mg, 0,29 mmol) en MeOH/DCM (10 mL, 1:1) se añadió NH al 50 %<sub>2</sub>OH en agua (2 mL, exceso). Saturado. Después se añadió NaOH en MeOH (2 mL, exceso) a 0 °C y la reacción se agitó durante 3-4 horas. Una vez completada, la mezcla resultante se concentró y se acidificó con HCl 2 N para alcanzar un pH de 4-5. El precipitado se recogió y se lavó con agua (10 mL) para eliminar el exceso de NH<sub>2</sub>OH. El secado del precipitado proporcionó 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidin-5-carboxamida como un polvo blanco (70 mg, 73 %).

**Ejemplo 4\*:** Síntesis del N-hidroxi-2-((1-fenilciclopropil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto D)

\*Este ejemplo está fuera del alcance de la invención actualmente reivindicada



**Síntesis del compuesto intermedio 2:** Una solución del compuesto 1, benzonitrilo (250 g, 1,0 equiv.) y Ti (OiPr)<sub>4</sub> (1330 mL, 1,5 equiv.) en MBTE (3750 mL) se enfrió a aproximadamente -10 a -5 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota EtMgBr (1610 mL, 3,0 M, 2,3 equiv.) durante un período de 60 min, durante el cual la temperatura interna de la reacción se mantuvo por debajo de 5 °C. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a 15-20 °C durante 1 hora. BF<sub>3</sub>-Éter (1300 mL, 2,0 equiv.) se añadió gota a gota durante un período de 60 min, mientras que la temperatura interna se mantuvo por debajo de 15 °C. La mezcla de reacción se agitó a 15-20 °C durante 1-2 horas y se detuvo cuando quedó un nivel bajo de benzonitrilo. Se añadió gota a gota HCl 1 N (2500 mL) mientras que la temperatura interna se mantuvo por debajo de 30 °C se añadió gota a gota NaOH (20 %, 3000 mL) para llevar el pH a aproximadamente 9,0, mientras que la temperatura interna se mantuvo por debajo de 30 °C. La mezcla de reacción se extrajo con MTBE (3 L x 2) y EtOAc (3 L x 2), y las capas orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a presión reducida (por debajo de 45 °C) para producir un aceite rojo. Se añadió MTBE (2500 mL) al aceite para dar una solución transparente y, tras burbujear con gas HCl seco, precipitó un sólido. Este sólido se filtró y se secó al vacío produciendo 143 g de compuesto **2**.

5 Síntesis del compuesto intermedio 4: Compuesto **2** (620 g, 1,0 equiv.) Y DIPEA (1080 g, 2,2 equiv. donde se disolvieron en NMP (3100 mL) y se agitaron durante 20 min. Compuesto **3** (680 g, 1,02 equiv.) y la mezcla de reacción se calentó a aproximadamente 85-95 °C durante 4 horas. Se dejó que la solución se enfriara lentamente a temperatura ambiente. Esta solución se vertió sobre H<sub>2</sub>O (20 L) y gran parte del sólido se precipitó de la solución con fuerte agitación. La mezcla se filtró y la torta se secó a presión reducida a 50 °C durante 24 horas, produciendo 896 g de compuesto **4** (sólido, 86,8 %).

10 Síntesis del N-hidroxi-2-((1-fenilciclopropil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto D): Se enfrió una solución de MeOH (1000 mL) a aproximadamente 0-5 °C con agitación. Se añadió NH<sub>2</sub>OH HCl (1107 g, 10 equiv.), a continuación de una cuidadosa adición de NaOCH<sub>3</sub> (1000 g, 12,0 equiv.) La mezcla resultante se agitó a 0-5 °C durante una hora, y se filtró para eliminar el sólido. El compuesto **4** (450 g, 1,0 equiv.) se añadió a la mezcla de reacción en una porción, y se agitó a 10 °C durante dos horas hasta que el compuesto **4** se consumió. La mezcla de reacción se ajustó a un pH de aproximadamente 8,5-9 mediante la adición de HCl (6 N), dando como resultado la precipitación. La mezcla se concentró a presión reducida. Se añadió agua (3000 mL) 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 del 79 %).

#### Ejemplo 5: Ensayos de la enzima de la HDAC

20 Los compuestos para el ensayo se diluyeron en DMSO a 50 veces la concentración final y se preparó una serie de diluciones en base a diez, tres veces. 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 de la HDAC (adquiridas de BPS Biosciences) se diluyeron a 1,5 veces su concentración final en tampón de ensayo. El sustrato tripéptido 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 la enzima usadas en estos ensayos fueron 3,3 ng/mL (la HDAC1), 0,2 ng/mL (la HDAC2), 0,08 ng/mL (la HDAC3) y 2 ng/mL (HDAC6). Las concentraciones finales del sustrato usadas fueron 16 µM (la HDAC1), 10 µM (la HDAC2), 17 µM (la HDAC3) y 14 µM (HDAC6). Se añadieron cinco µL del compuesto y 20 µL de la enzima a los pocillos de una placa negra opaca de 384 pocillos por duplicado. La enzima y el compuesto se incubaron juntos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron cinco µL 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 controló el desarrollo de la fluorescencia durante 60 min y se calculó la velocidad lineal de la reacción. La IC<sub>50</sub> se determinó mediante el uso del Graph Pad Prism mediante un ajuste de curva de cuatro parámetros.

35 Ejemplo 6: Inhibición de la HDAC6 en una colección de líneas celulares NHL, tanto como agente único como en combinación

Este ejemplo describe el potencial terapéutico de inhibir la HDAC6 en una colección de líneas celulares NHL, tanto como agente único como en combinación con estos nuevos agentes dirigidos. El tratamiento de las células del linfoma de una variedad de subtipos moleculares con inhibidores selectivos de la HDAC6, que incluyen al Compuesto A, Compuesto B, y el altamente selectivo Compuesto C\*, en combinación con un inhibidor de la PI3K dio como resultado disminuciones sinérgicas en la viabilidad de las células del linfoma.

45 Se seleccionaron las líneas celulares del linfoma humano que representaban los subtipos más comunes de NHL. Para el linfoma de células del manto (MCL) se utilizaron células Mino, Jeko1 y Granta-519, mientras que las células U2932 y SUDHL16 representaron los subtipos de linfocitos B activados (ABC) y del centro germinal (GC) del linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), respectivamente. Brevemente, las células se sembraron en placas de 384 pocillos y se trataron por cuadruplicado en un formato de matriz de dosis con un inhibidor de la HDAC6 (Compuesto A, Compuesto B, o Compuesto C\*) en combinación con un inhibidor de PI3K (GDC-0941 o GS-1101/CAL-101). Después de incubar estas células durante 48 horas, se evaluó la viabilidad celular total mediante un ensayo MTS (Aqueous One, Promega). Posteriormente se determinó la fracción afectada (Fa) para cada combinación de dosis y se evaluó el índice de combinación (CI) mediante el método de Chou-Talay. Los valores de CI menores de uno representan un efecto sinérgico, los valores iguales a uno sugieren un efecto aditivo y los valores mayores de dos indican un efecto antagónico. Como puede verse en los gráficos Fa-CI en las Figuras 1A-F y Figuras 2A-2F, en las cinco líneas celulares del linfoma, los inhibidores de la HDAC6 mostraron una fuerte evidencia de sinergia con ambos inhibidores de la PI3K probados. Esto se evidencia por la gran cantidad de puntos de datos (que representan las combinaciones de dosis individuales) en el gráfico Fa-CI que caen por debajo del límite muy estricto de 0,7. Juntos, estos resultados proporcionan una fuerte evidencia de que la inhibición de la HDAC6 en combinación con la inhibición de la PI3K da como resultado la muerte celular sinérgica y sugiere además que las combinaciones de los fármacos dirigidos tanto a la HDAC6 como a la PI3K pueden proporcionar un beneficio clínico significativo para los pacientes con LNH.

60 \*Fuera del alcance de la invención actualmente reivindicada

Ejemplo 7: La combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K afecta la proliferación celular y la progresión del ciclo celular

65 Este ejemplo proporciona evidencia de cómo la combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K afecta la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. El tratamiento de las células de linfoma con el Compuesto A, el

Compuesto B, y/o el inhibidor de la PI3K dio como resultado una disminución de la progresión del ciclo celular, lo que indica una disminución de la proliferación.

5 Las células del linfoma Jeko1 (Figura 3A), Mino (Figura 3B) o Granta-519 (Figura 3C) se expusieron al fármaco durante 4 días y se evaluó la distribución del ciclo celular mediante citometría de flujo mediante la incorporación de EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) y la tinción con yoduro de propidio. Después se estimó la fracción relativa de las células en cada etapa del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M), así como la fracción de las células muertas (Sub G1). Las células se trataron con DMSO, Compuesto A o B (2  $\mu$ M), GDC-0941 (0,075-0,5  $\mu$ M) o la combinación del Compuesto A o B (2  $\mu$ M) con GDC-0941 (0,075-0,5  $\mu$ M) para la inhibición del ciclo celular. Como alternativa, las células se trataron con DMSO, Compuesto A o B (2  $\mu$ M), CAL-101 (1-2  $\mu$ M) o la combinación del Compuesto A o B (2  $\mu$ M) con CAL-101 (1-2  $\mu$ M) antes de medir los efectos sobre la inhibición del ciclo celular.

15 En todas las células, el tratamiento de combinación dio como resultado una disminución significativa en el porcentaje de las células que proliferaban activamente en la fase S del ciclo celular, de acuerdo con una proliferación reducida en estas células. El tratamiento de combinación dio como resultado además un aumento en la población Sub G1 en ambas líneas celulares, consistente con un aumento de la muerte celular como resultado del tratamiento de combinación con un HDAC6i y un PI3Ki.

20 Ejemplo 8: La combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K induce la apoptosis en las células del linfoma

Este ejemplo proporciona evidencias de cómo la combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K induce la apoptosis en las células del linfoma. El tratamiento de las células del linfoma con el Compuesto A o B más un PI3Ki resultó en aumentos sinérgicos en la apoptosis celular.

25 Las células del linfoma Jeko1 (Figura 4A y Figura 4B) o Mino (Figura 4C) se expusieron al fármaco durante 4 días y se evaluó la apoptosis mediante citometría de flujo midiendo la unión de la Anexina V y la permeabilidad celular al yoduro de propidio. Después, se estimó la fracción relativa de las células que estaban vivas, en la apoptosis temprana, en la apoptosis tardía o muertas. Las células se trataron con DMSO, Compuesto A o B (2-3  $\mu$ M), GDC-0941 (0,075-2  $\mu$ M) o la combinación del Compuesto A o B (2-3  $\mu$ M) con GDC-0941 (0,075-2  $\mu$ M) en la inducción de la apoptosis. Como alternativa, las células se trataron con DMSO, Compuesto A o B (2  $\mu$ M), CAL-101 (2  $\mu$ M) o la combinación del Compuesto A o B (2  $\mu$ M) con CAL-101 (2  $\mu$ M) antes de medir la inducción de la apoptosis.

35 El tratamiento con el Compuesto A o B dio como resultado un pequeño aumento de la apoptosis en relación con las células de control, mientras que el tratamiento con el GDC-0941 o el CAL-101 no dio como resultado un aumento de la muerte celular. Sin embargo, la combinación del Compuesto A o B con el GDC-0941 o el CAL-101 dio como resultado aumentos sinérgicos en el porcentaje de las células apoptóticas.

40 Ejemplo 9: La combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K se tolera bien

Este ejemplo muestra que la combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K en los ratones se toleran bien.

45 Los ratones CB-17 SCID se trataron con Vehículo, GDC-0941 solo (100 mg/kg PO QD) o GDC-0941 (100 mg/kg PO QD) más el Compuesto A (30 mg/kg IP QD). Se determinó el cambio porcentual del peso corporal en relación con el inicio de la dosificación, y se representó el cambio medio  $\pm$  DE. Todos los tratamientos se administraron cinco días a la semana durante 3 ciclos. Todos los tratamientos se toleraron bien sin evidencia de la toxicidad y la recuperación completa después de una mínima pérdida del peso corporal. Ver la Figura 5.

50 Ejemplo 10: La combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K reduce el crecimiento tumoral

Este ejemplo muestra que la combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K reduce el crecimiento tumoral en los ratones.

55 Los ratones que portaban xenoinjertos del tumor Granta-519 se trataron con Vehículo, Compuesto A solo (100 mg/kg PO BID), GDC-0941 solo (75 mg/kg PO QD) o GDC-0941 (75 mg/kg PO QD) más el Compuesto A (100 mg/kg PO BID). El volumen del tumor (mm<sup>3</sup>) se determinó en relación con el inicio de la dosificación y se representó gráficamente el volumen medio  $\pm$  DE. La combinación del Compuesto A y el GDC-0941 mostraron un crecimiento tumoral significativamente reducido en relación con cualquiera de los agentes individuales. Ver la Figura 6.

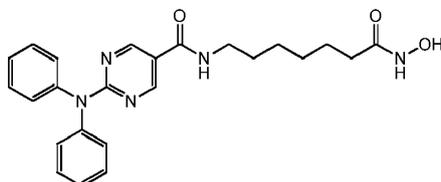
60 Ejemplo 11: La combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K conduce a una mayor supresión de la expresión de Myc

65 Este ejemplo muestra que la combinación de un inhibidor de la HDAC6 y un inhibidor de la PI3K conduce a una mayor supresión de Myc.

Las Figuras 7A-B muestran las imágenes de las inmunotransferencias de las células Mino (Figura 7A) y Granta-519 (Figura 7B) que muestran que la combinación del Compuesto A y ya sea el GDC-0941 o el CAL-101 conduce a una supresión adicional de la expresión de Myc, un regulador transcripcional clave en el cáncer, en relación con cualquiera de los agentes individuales.

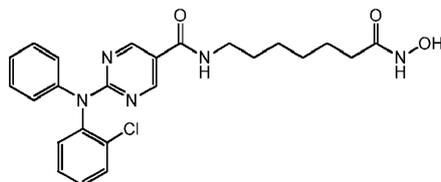
## REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), en donde, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este;  
y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), en donde, el inhibidor de la PI3K es el GDC-0941 o GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

2. Una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento del linfoma no Hodgkin que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), en donde, el inhibidor específico de la HDAC6 es:



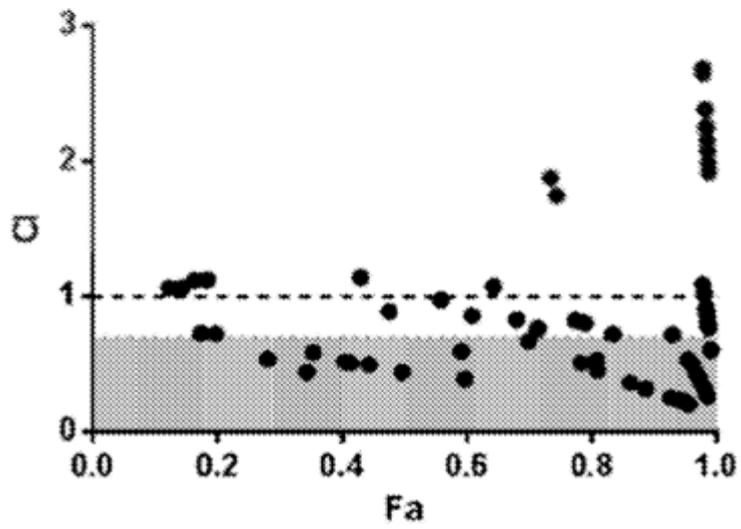
o una sal farmacéuticamente aceptable de este;  
y un inhibidor de la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), en donde, el inhibidor de la PI3K es el GDC-0941 o GS-1101, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

3. La combinación farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, el inhibidor de la PI3K es el GDC-0941 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
4. La combinación farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, el inhibidor de la PI3K es el GS-1101 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
5. La combinación farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, la combinación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
6. La combinación farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, el inhibidor específico de la HDAC6 se administra a una dosis subterapéutica.

Figura 1A

# Mino

Compuesto A + GDC-0941



Compuesto C + GDC-0941

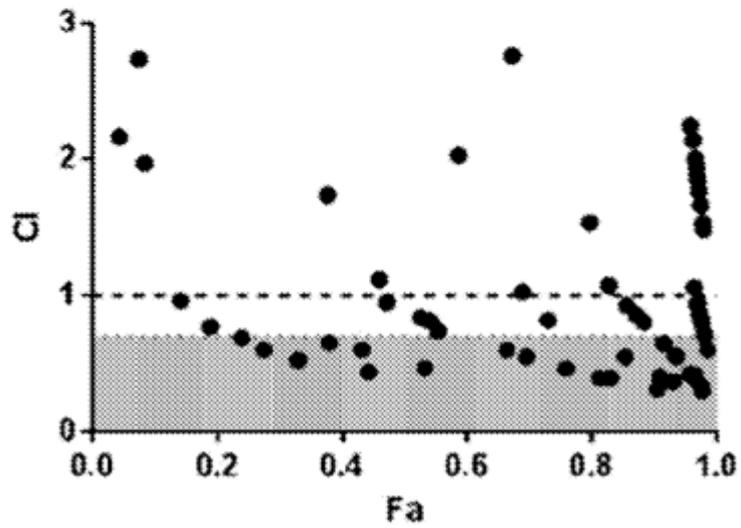
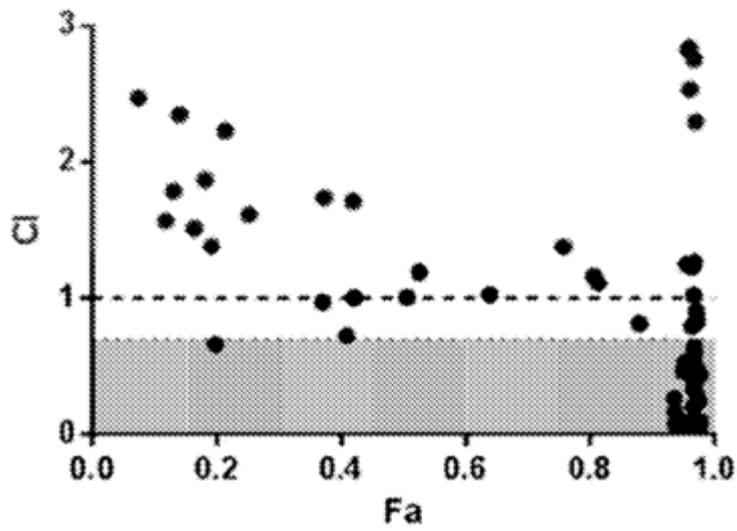


Figura 1B

# Jeko1

Compuesto A + GDC-0941



Compuesto C + GDC-0941

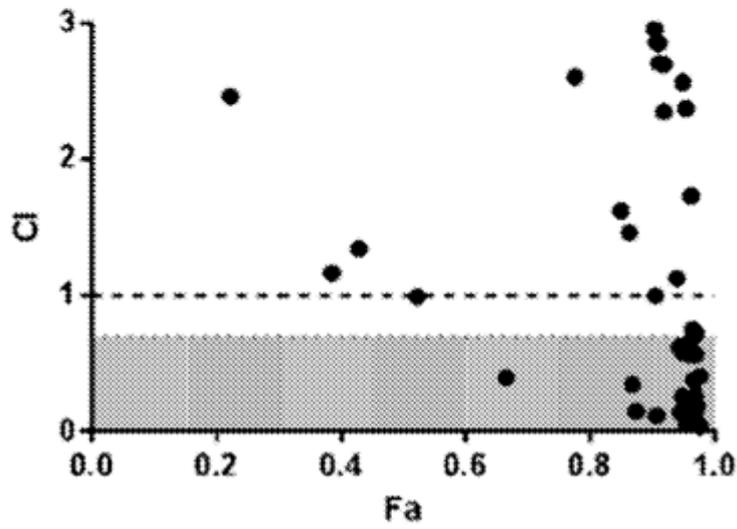
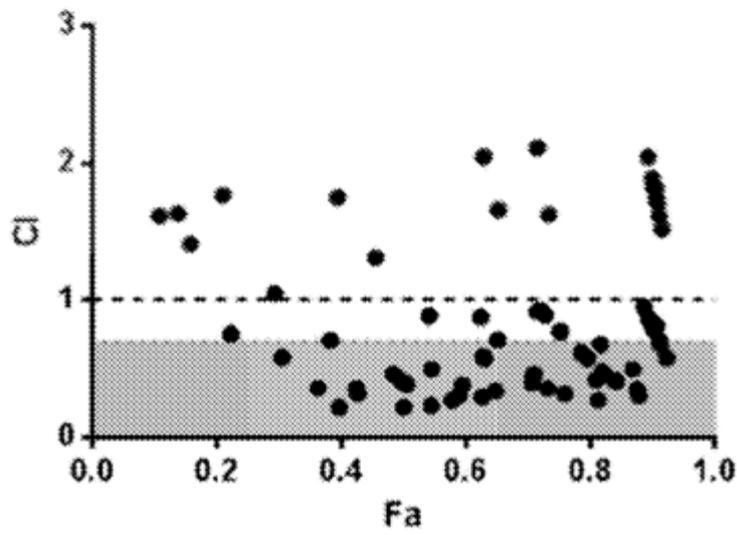


Figura 1C

# Granta-519

Compuesto A + GDC-0941



Compuesto C + GDC-0941

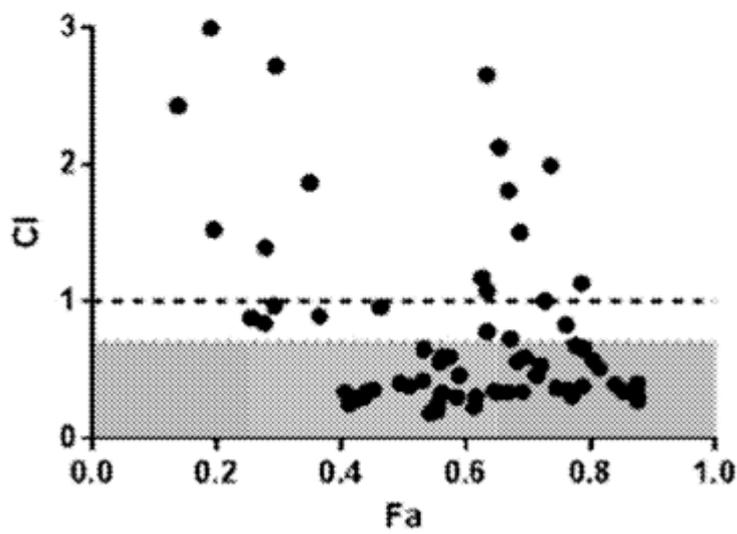
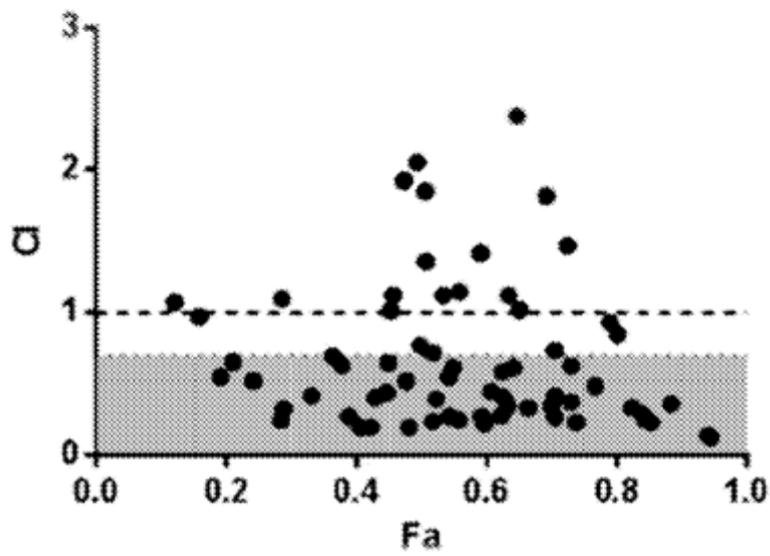


Figura 1D

U2932

Compuesto A + GDC-0941



Compuesto C + GDC-0941

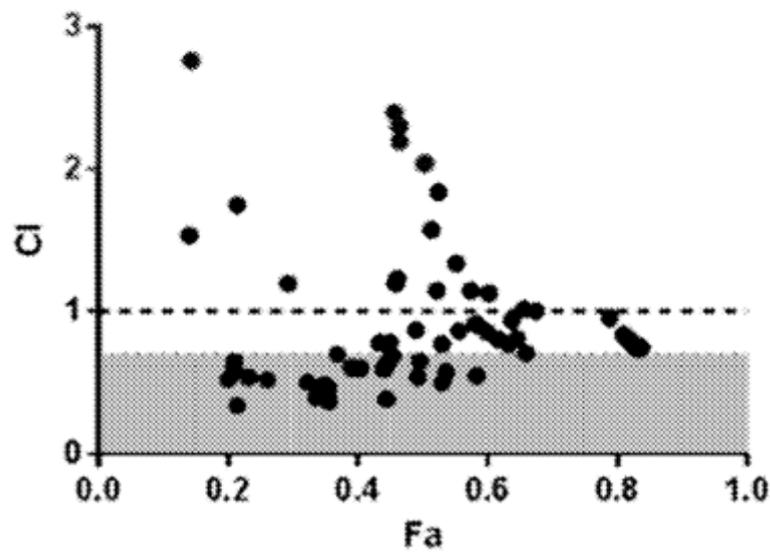
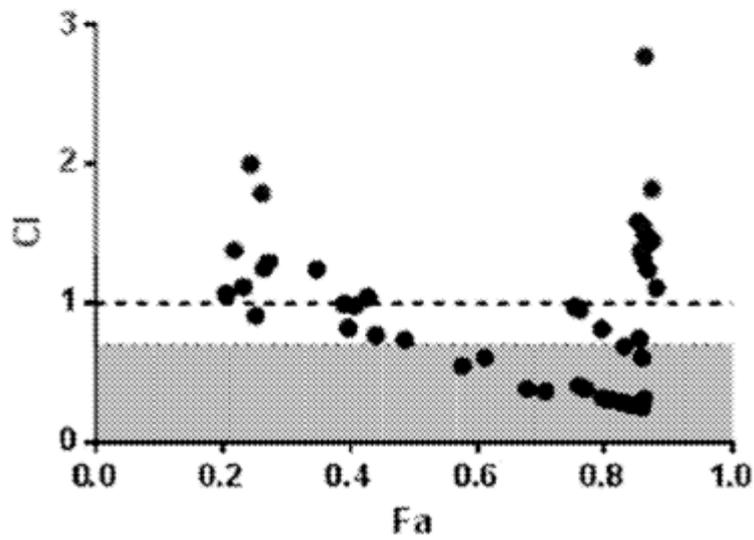


Figura 1E

# SUDHL16

Compuesto A + GDC-0941



Compuesto C + GDC-0941

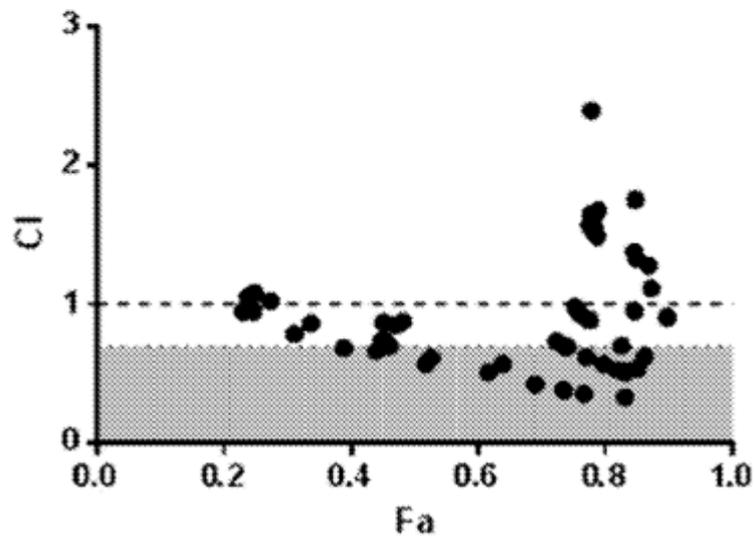


Figura 1F

# Jeko1

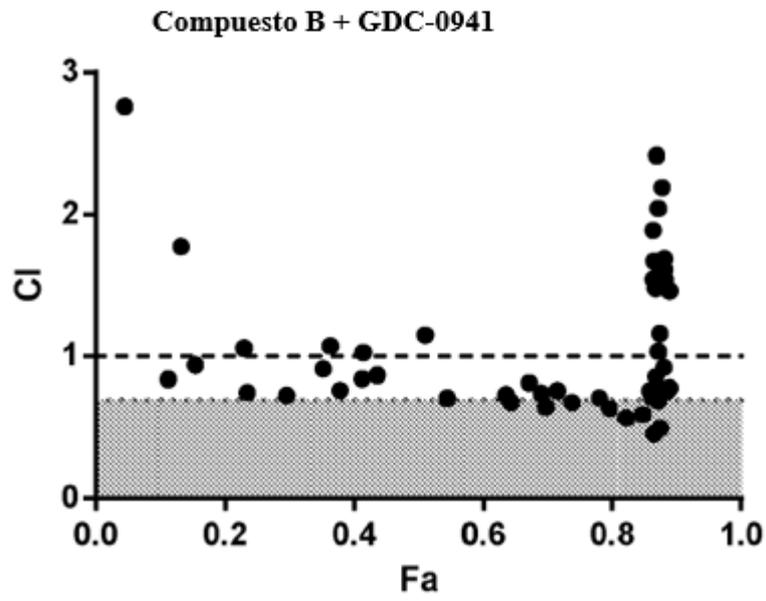


Figura 2A

# Mino

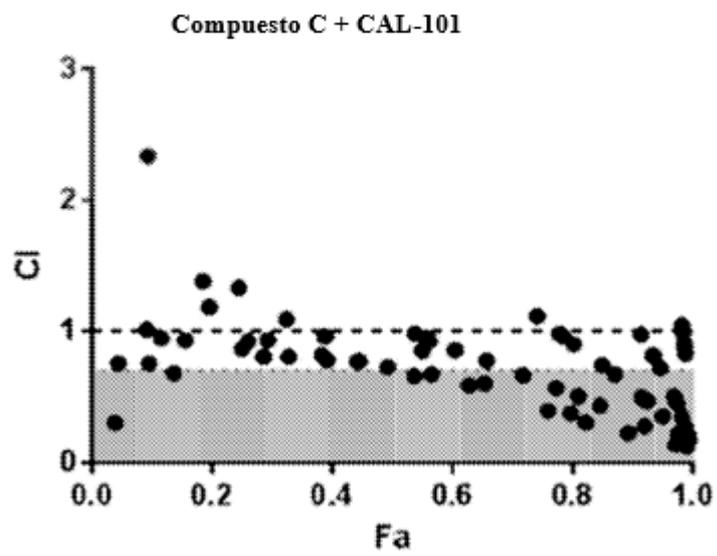
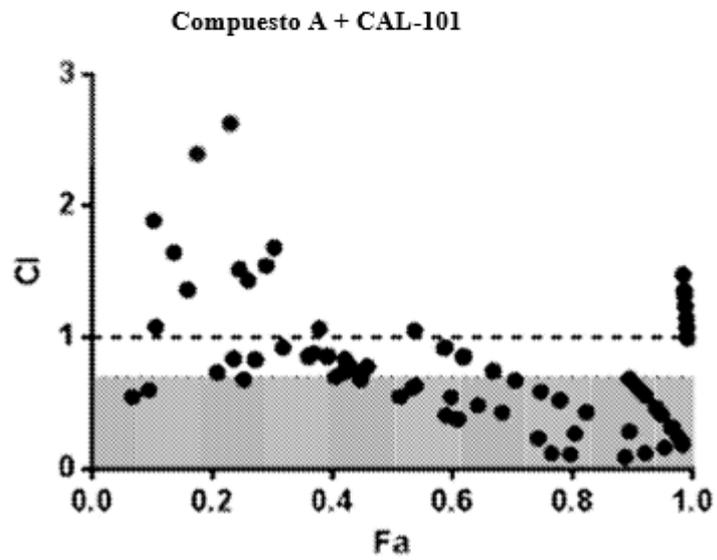
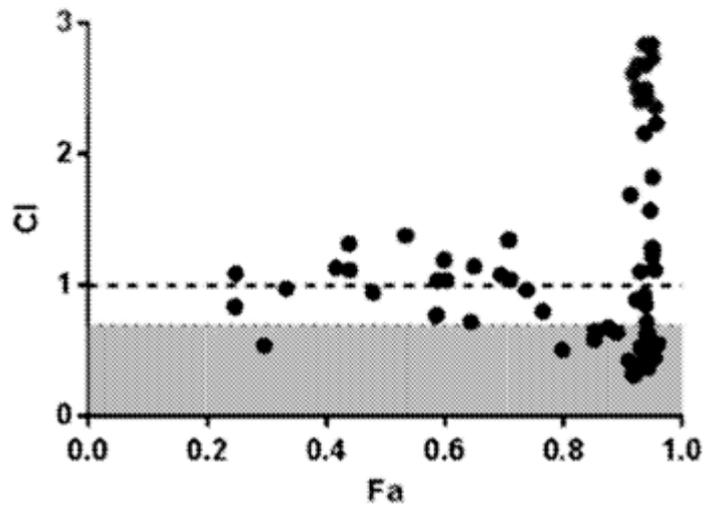


Figura 2B

# Jeko1

Compuesto A + CAL-101



Compuesto C + CAL-101

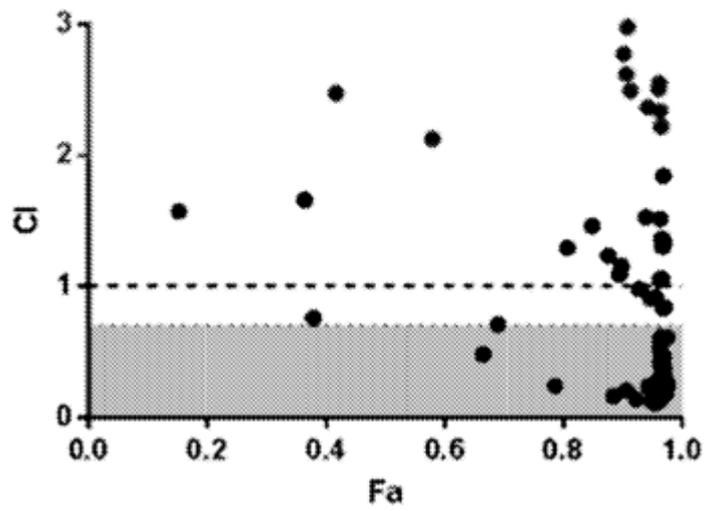
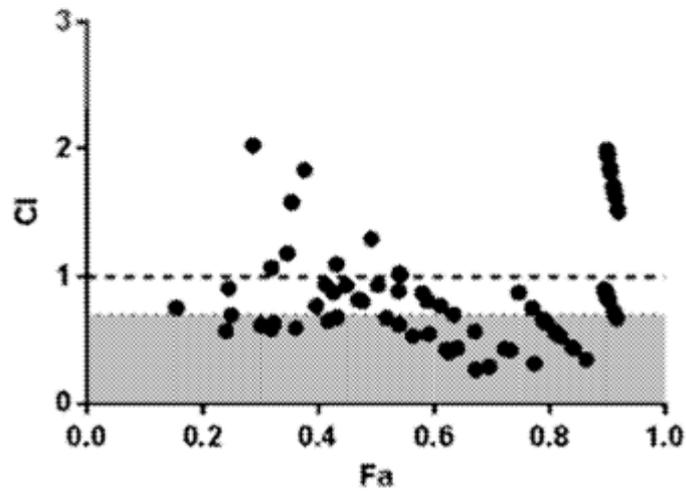


Figura 2C

# Granta-519

Compuesto A + CAL-101



Compuesto C + CAL-101

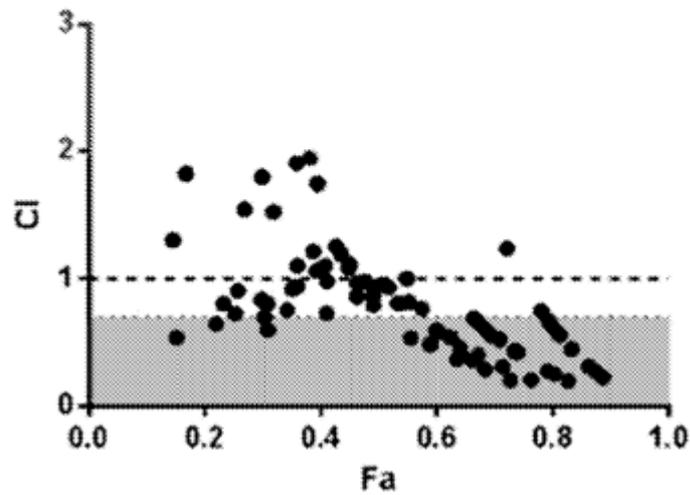


Figura 2D

U2932

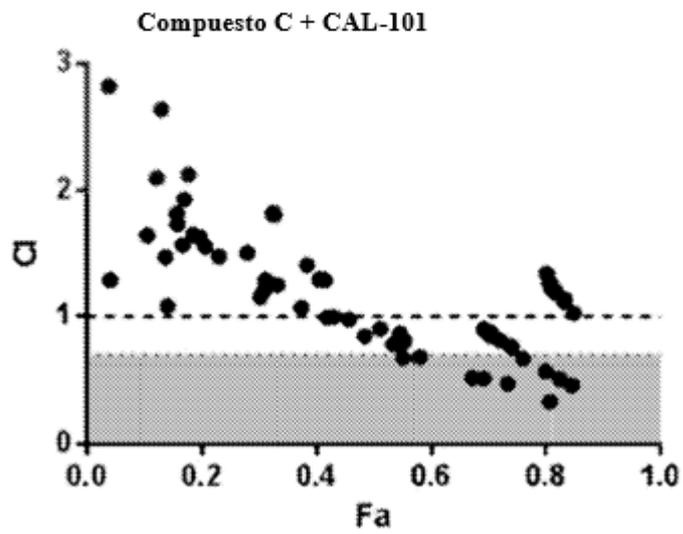
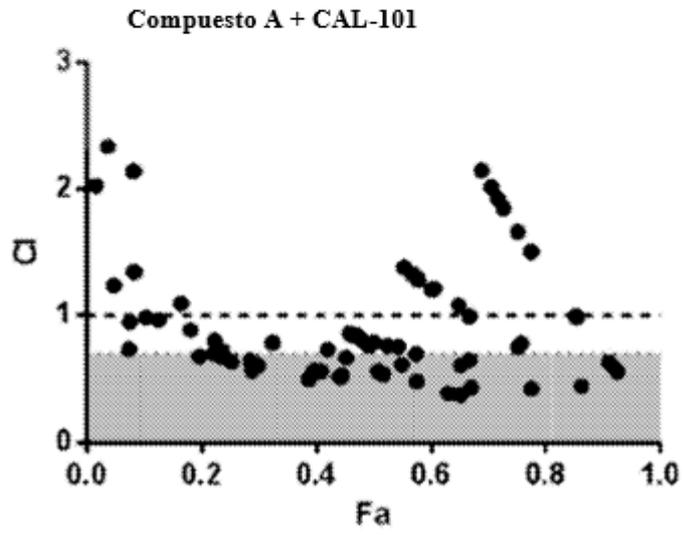
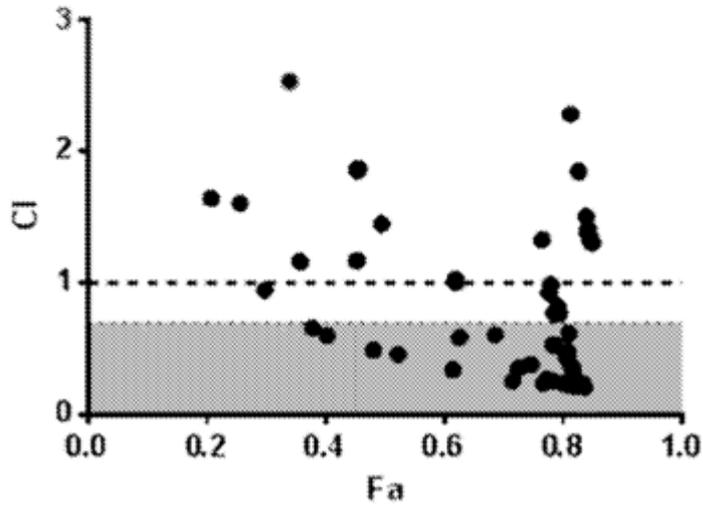


Figura 2E

# SUDHL16

Compuesto A + CAL-101



Compuesto C + CAL-101

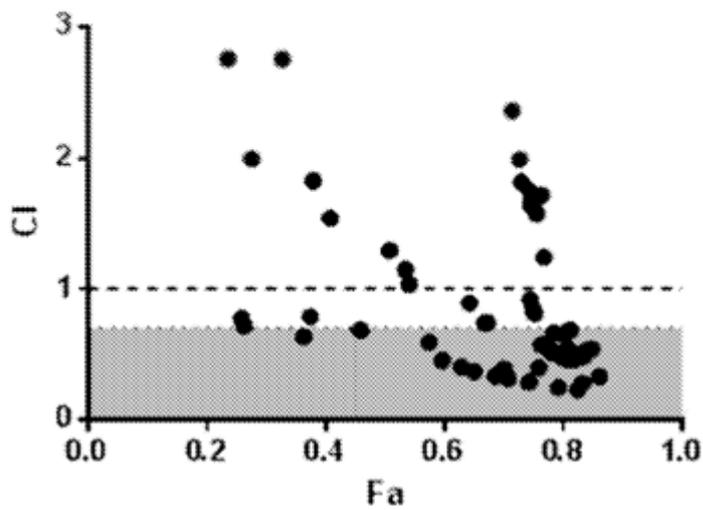
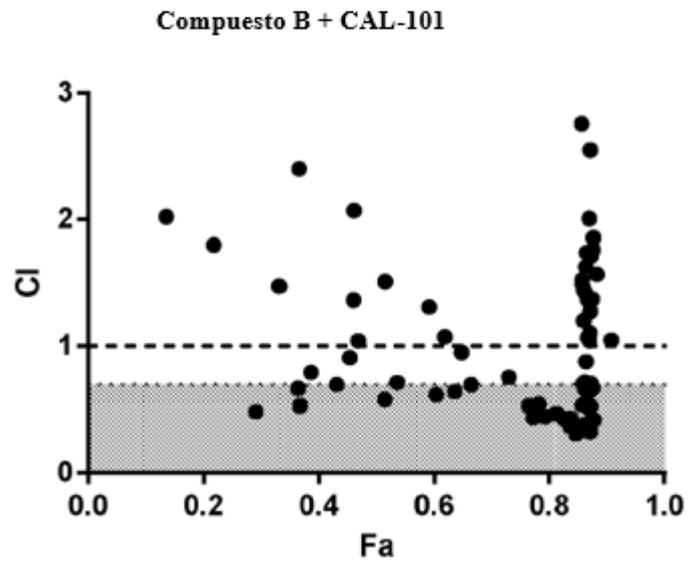


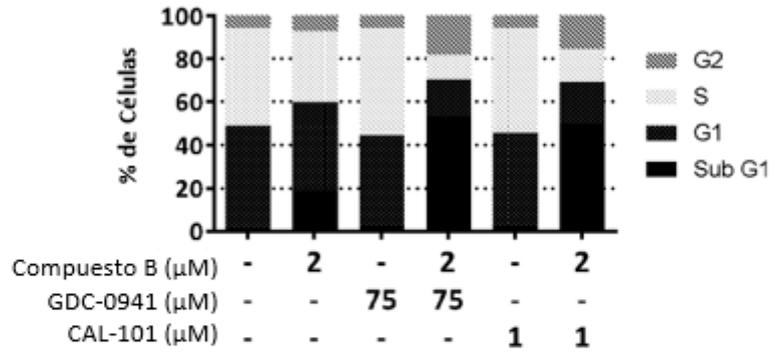
Figura 2F

# Jeko1

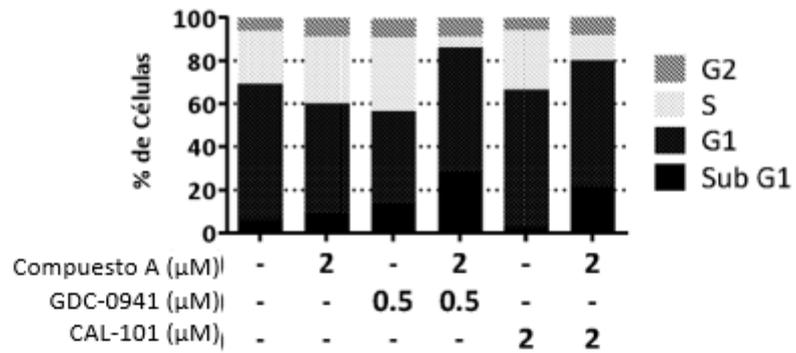


**Figura 3**

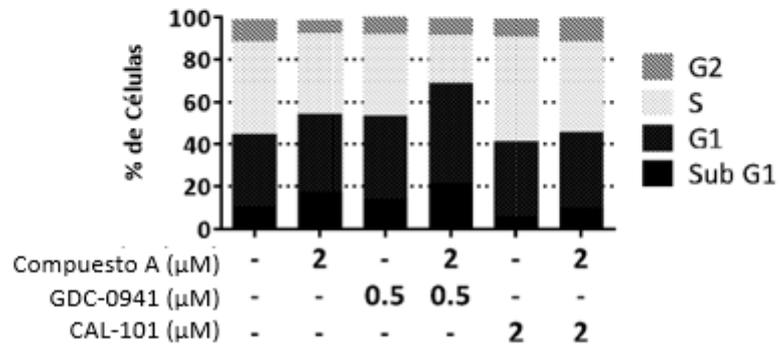
**A**



**B**

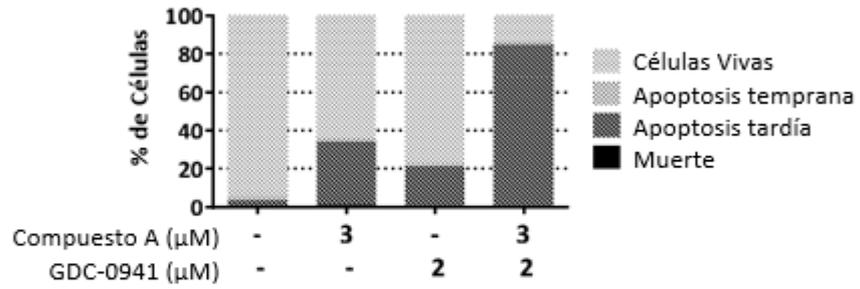


**C**

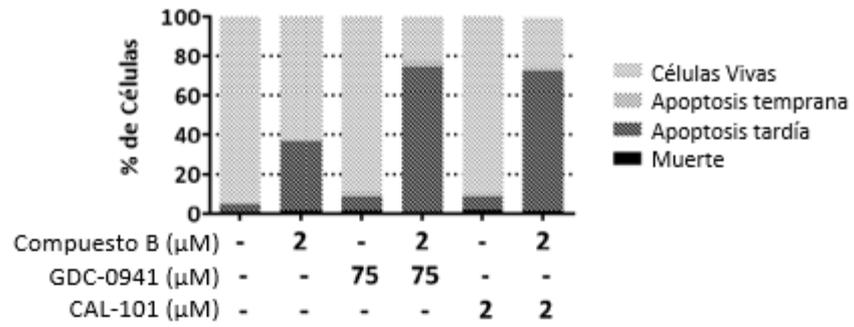


**Figura 4**

**A**



**B**



**C**

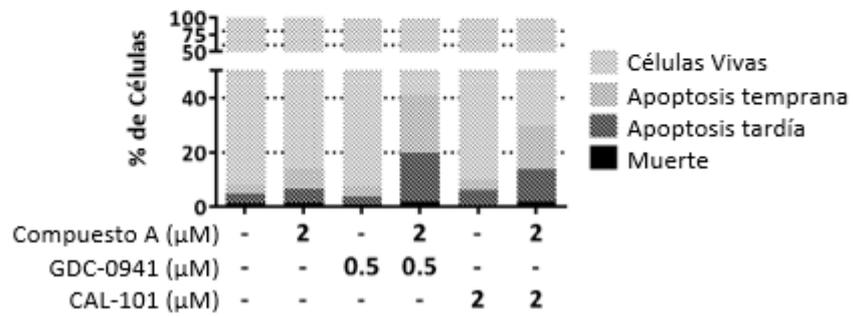


Figura 5

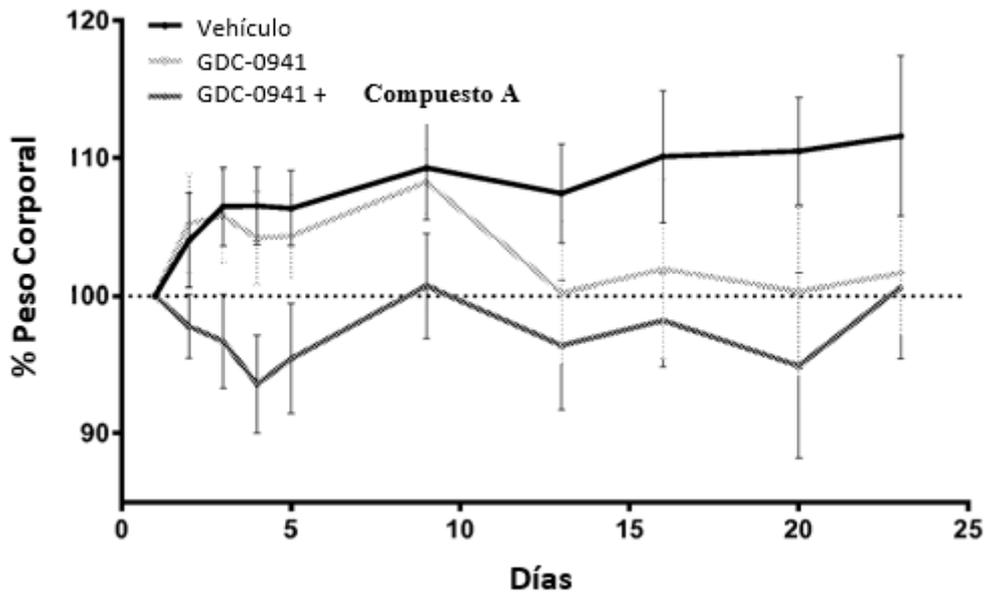


Figura 6

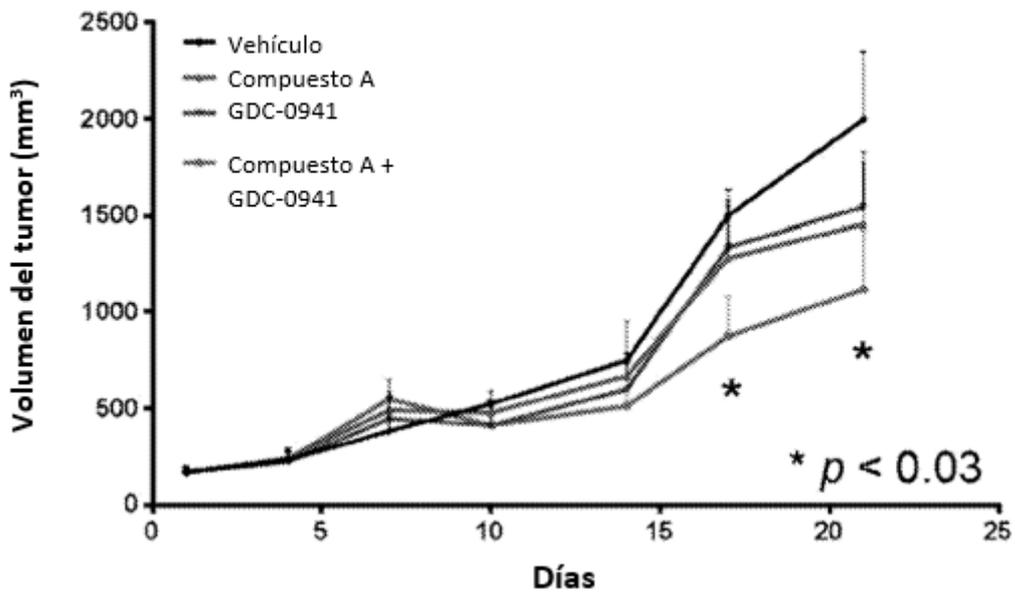
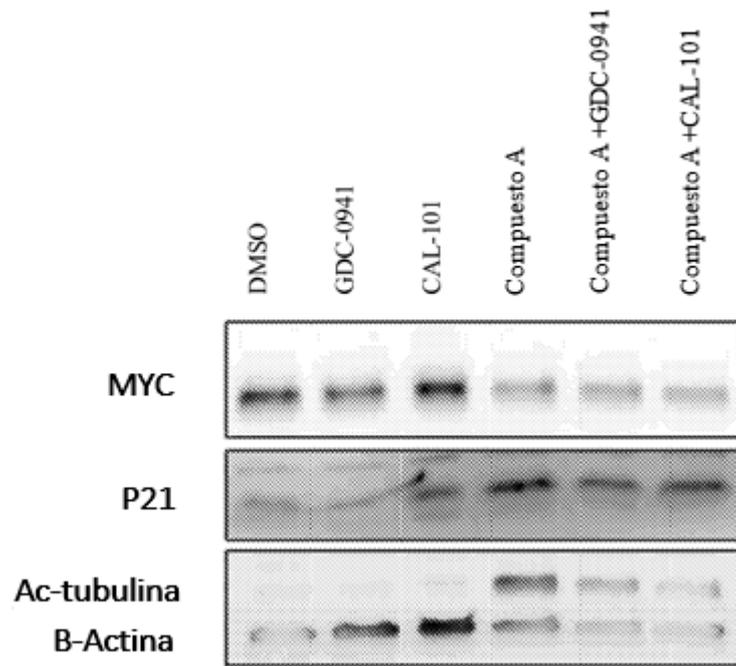


Figura 7

A



B

