

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 333**

51 Int. Cl.:
C07C 243/38 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09712743 .5**
96 Fecha de presentación: **17.02.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2242738**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2010**

54 Título: **Inhibidores de SGK1 para la profilaxis y/o terapia de enfermedades virales y/o carcinomas**

30 Prioridad:
18.02.2008 DE 102008010361

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**Merck Patent GmbH
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt**

72 Inventor/es:
**FUCHSS, Thomas;
GERICKE, Rolf;
BEIER, Norbert;
LANG, Florian;
LANG, Philipp y
LANG, Karl**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 383 333 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 SGK1 para la profilaxis y/o terapia de enfermedades virales y/o carcinomas.

La presente invención hace referencia a compuestos que inhiben SGK1 (*serum and glucocorticoid dependent kinase 1*) para el tratamiento terapéutico de enfermedades virales y/o carcinomas.

5 La quinasa -1 dependiente de suero y de glucocorticoide (SGK1, *serum and glucocorticoid dependent kinase 1*) es una proteína que siempre está presente en células eucariotas. La SGK1 se encuentra en tal caso bajo el control de estrés celular, como por ejemplo encogimiento celular, y hormonas, como por ejemplo gluco- y mineralocorticoides. SGK1 se activa por insulina y factores de crecimiento a través de 3-quinasa fosfatidilinositol y PDK1 (3-Fosfoinositide dependent kinase-1).

10 La SGK1 se clonó originalmente a partir de células de carcinoma de mama de ratas (Webster MK, Goya L, Firestone GL. J. Biol. Chem. 268 (16): 11482-11485, 1993; Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Mol. Cell. Biol. 13 (4): 2031-2040, 1993). La quinasa humana hSGK se clonó como gen regulado en volumen celular a partir de células hepáticas (Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4440-4445, 1997). Se mostró que la quinasa de ratas (Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2514-2519, 1999; Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. J. Biol. Chem. 274: 16973-16978, 1999) estimula el canal Na⁺ epitelial (ENaC). Además, se mostró que una actividad incrementada del ENaC se asocia con hipertensión (Warnock DG. Kidney Int. 53 (1): 1824, 1998).

20 La hSGK también se expresa en el cerebro (Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4440-4445, 1997), donde regula los canales de K⁺ Kv1.3 dependientes de voltaje. Se mostró que estos canales K⁺ del tipo Kv1.3 están involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal (Pongs O. Physiol. Rev. 72: 69-88, 1992), la regulación de la proliferación celular (Cahalan MD y Chandy KG. Cur. Opin. Biotech. 8 (6): 749-756, 1997) así como la regulación de la muerte celular apoptótica (Szabo I, Gulbin E, Apfel H, Zhan X, Barth P, Busch AE, Schlottmann K, Pongs O, Lang F. J. Biol. Chem. 271: 20465-20469, 1999; Lang F, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Siemen D, Gulbins E. News Physiol. Sci. 14: 194-200, 1999). Kv1.3 es además importante en la regulación de la proliferación y función de linfocitos (Cahalan MD y Chandy KG, Cur. Opin. Biotech. 8 (6): 749-756, 1997). Se clonaron otros dos miembros de la familia SGK, la SGK2 y la SGK3 (Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P. Biochem. J. 344: 189-197, 1999). Además se mostró que las SGK forman una familia de quinasa de proteína serina-treonina, las cuales pueden regularse de modo transcripcional o post-transcripcional. Tal como la SGK1, también se activan la SGK2 y la SGK3, mediante, por ejemplo, insulina e IGF1 a través de la vía quinasa PI3. Sin embargo, hasta ahora no ha tenido lugar una caracterización completa de la familia de proteína SGK.

Entre tanto, la SGK1 también se conoce como diana para diversas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

35 En la DE 197 08 173 pudo mostrarse, por ejemplo, que la hSGK1 posee un potencial diagnóstico significativo en muchas enfermedades que se ven influenciadas de modo pato-fisiológico por un cambio en el volumen de las células, como por ejemplo hipernatremia, hiponatremia, diabetes mellitus, insuficiencia renal, hipercatabolismo, encefalopatía hepática e infecciones microbianas y virales.

En la DE 199 17 990 se han descrito sustancias inhibitoras de la quinasa, como por ejemplo estaurosporina, queleritrina o quinasa inhibidora transdominante, las cuales pueden emplearse en la terapia de enfermedades dependientes del volumen celular.

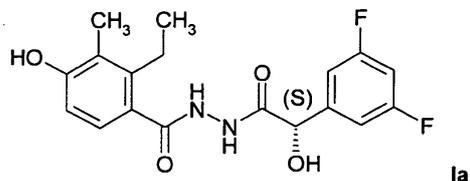
40 Además, de la WO 2004/079003 A1 se conoce el uso de SGK1 como diana diagnóstica y terapéutica para coagulopatías, angiopatías, hipertensión pulmonar y aterosclerosis.

Por el contrario, el rol de la SGK1 en la aparición de tumores se discute en la literatura especializada de manera muy controvertida y contradictoria.

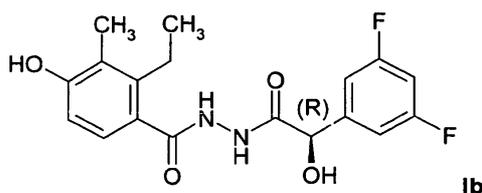
45 La invención tiene como objetivo proporcionar otros campos de aplicación terapéuticos y diagnósticos usando SGK1 como molécula objetivo (diana).

También son objeto de la invención las formas ópticamente activas (estereoisómeros), los enantiómeros, los racematos, los diaestereómeros así como los hidratos y solvatos de los compuestos de las fórmulas Ia y Ib. Por solvatos de los compuestos se entienden adiciones de moléculas de disolventes inertes a los compuestos, las cuales se forman debido a su fuerza de atracción mutua. Los solvatos son, por ejemplo, mono- o dihidratos o alcoholatos.

Son objeto de la invención los compuestos de los enantiómeros de la fórmula Ia (configuración S) y de la fórmula Ib (configuración R):



y



5

y sus tautómeros, sales, estereoisómeros y los enantiómeros utilizables en farmacia, incluidas sus mezclas en todas las proporciones.

El compuesto representado en las fórmulas Ia y Ib es ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluor-fenil)-2-hidroxiacetil]-hidrazida. Estos compuestos se usan preferentemente como medicamentos. Particularmente, se prefiere emplear los compuestos representados por las fórmulas Ia y Ib para la profilaxis y/o el tratamiento de hepatitis viral. De manera sorprendente, pudo establecerse de manera precisa que los compuestos de las fórmulas Ia y Ib son inhibidores de SGK1. Además, pudo demostrarse que dichos compuestos son adecuados para la terapia de enfermedades virales y enfermedades carcinomatosas.

10

Respecto de otras propiedades y características, así como de la producción de representantes de esta clase de compuestos, se hace referencia a la WO 2007/093264 A1 de la solicitante, cuyo contenido de divulgación se incorpora completamente al contenido de la presente invención mediante referencia expresa.

15

Las enfermedades virales son seleccionadas preferentemente del grupo de coriomeningitis linfocítica, hepatitis viral, miocarditis viral, sida, herpes, papiloma y neumonía viral. En el contexto de la presente invención, por herpes y papiloma deben entenderse infecciones o enfermedades infecciosas que se ocasionan por el virus de herpes o de papiloma.

20

Los carcinomas se seleccionan, de manera preferente, del grupo de carcinoma de colon, carcinoma de mama, carcinoma de estómago y carcinoma de pulmones.

Además, los compuestos según las fórmulas Ia y Ib están presentes en forma de formulaciones farmacéuticas. Formulaciones farmacéuticas de este tipo pueden adecuarse para la administración por una vía adecuada cualquiera, por ejemplo por vía oral, rectal, nasal, tópica, vaginal o parenteral. Formulaciones de este tipo pueden prepararse con ayuda de métodos conocidos en el campo farmacéutico juntando, por ejemplo, dichos compuestos con el o los materiales vehículos o excipientes.

25

Respecto de otras características y particularidades sobre las posibilidades de formulación farmacéuticas de los compuestos según la fórmula II también se hace referencia a la patente WO 2007/093264 A1.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención depende de una cantidad de factores, incluyendo por ejemplo la edad y el peso de la persona o del animal, del estado patológico exacto, de la necesidad de tratamiento, así como del grado de severidad, de la naturaleza de la formulación y de la vía de administración y se ajusta en última instancia por parte del médico, o del veterinario, tratante. Sin embargo, una cantidad, efectiva para tratamiento, de un compuesto de la invención se encuentra en general en el rango de 0,1 a 1000 mg/kg de peso corporal del receptor (mamífero) por día, en el rango en particular de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal por día, y de manera particularmente típica en el rango de 1 a 10 mg/kg de peso corporal por día. De esta manera, para un mamífero adulto de 70 kg de peso la cantidad real por día estaría habitualmente entre 70 y 700 mg, en cuyo caso esta cantidad puede darse como dosis única por día o, más usualmente, en una serie de dosis parciales (como por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco o seis) por día, de tal modo que la dosis total diaria sea igual. Una cantidad efectiva de una sal o de un solvato, o de un derivado fisiológicamente funcional del mismo, puede determinarse per se como fracción de la cantidad efectiva del compuesto de la invención. Puede suponerse que

40

dosificaciones similares son adecuadas para el tratamiento de los otros estados patológicos mencionados con anterioridad.

5 La presente invención también hace referencia al uso de compuestos según las fórmulas la y lb para la preparación de un medicamento, para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades virales y/o carcinomas. Respecto de otras características y particularidades se hace referencia a la descripción hecha hasta este punto.

10 Finalmente, la invención también hace referencia a un método para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades virales y/o carcinomas, el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de compuestos según las fórmulas la y lb. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa en este caso una cantidad de dichos compuestos, o de medicamentos o fármacos a base de los mismos, la cual, en comparación con un paciente correspondiente que no ha recibido esta cantidad, provoca lo siguiente: tratamiento curativo mejorado, curación, prevención o eliminación de una enfermedad, de un cuadro patológico, de un estado patológico, de un mal, de un desorden o de efectos secundarios, o también la disminución del progreso de una enfermedad, de un mal o de un desorden. Respecto de otras características y particularidades se hace referencia igualmente a la descripción precedente.

15 Además, la presente invención también hace referencia a los compuestos descritos en la WO 2006/105850 A1 de la solicitante y representados por las fórmulas la y lb para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades virales y/o carcinomas. Respecto de otras propiedades y características, así como de la preparación de estos compuestos se hace referencia a la WO 2006/105850 A1 de la solicitante, cuyo contenido de divulgación se incorpora completamente por referencia explícita al contenido de la presente descripción.

20 Las características existentes y adicionales de la invención resultan de la descripción a continuación de las modalidades preferidas en conexión con las reivindicaciones independientes y las figuras. Aquí, las características individuales pueden realizarse, respectivamente, una a una o en conjunto en combinación entre sí.

En las figuras se muestran:

25 Figura 1: una respuesta incrementada de células T CD8⁺ contra el virus de coriomeningitis linfocítico (LCMV) en ratones knockout-SGK1,

Figura 2: replicación viral de LCMV en diversos tejidos en ratones knockout-SGK1 y ratones hermanos de tipo silvestre SGK1,

Figura 3: el resultado de una investigación inmunohistoquímica en antígeno LCMV en ratones knockout-SGK1 y ratones hermanos de tipo silvestre,

30 Figura 4: la influencia de SGK1 en el desarrollo de hepatitis viral,

Figura 5: el efecto de un inhibidor SGK1 en el desarrollo de una hepatitis viral,

Figura 6: el desarrollo de carcinomas de colon en ratones knockout-SGK1 en comparación con ratones SGK1 de tipo silvestre,

Figura 7: la inhibición de carcinomas de colon por un inhibidor de SGK1,

35 Figura 8: un esquema de síntesis del inhibidor de SGK1 ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida I (EMD 638683)

Figura 9: un esquema de síntesis de los inhibidores de SGK1 enantioméricos ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[(S)-2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida (Ia) ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[(R)-2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida (Ib)

40 Ejemplos

I. Ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico -N'-[2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxiacetil]-hidrazida (EMD 638683)

45 Se suspenden 70.0 g de ácido 2-etil-4-metoxi-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida (A1) en 350 ml de diclorometano. Después se adicionan a gotas 105 ml de bromuro de boro. La mezcla de reacción se revuelve a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la solución obtenida se decanta cuidadosamente en un litro de agua helada. La fase acuosa se extrae dos veces con 500 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas unidas se extraen después una vez con 300 ml de agua, se secan sobre sulfato de sodio y se secan

a continuación. El filtrado se concentra al vacío. Después el residuo obtenido se recrystaliza a partir de 500 ml de acetonitrilo usando carbón activado. Se obtienen 32.2 g del compuesto del título como sólido incoloro con un punto de fusión de 187.4 °C (MS: 365 (MH⁺), TLC: Rf = 0.29 (ciclohexano/éter metil-ter-butilo 1:4, fracciones en volumen).

la. Ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[(S)-2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida

5 a) Separación cromatográfica de racematos (sin Fig.): 500 mg de ejemplo 1 (EMD 638683) se disuelven en 4 porciones cada una en 5 ml de 2-propanol y 5 ml de n-heptano al calor. A continuación las soluciones se sometieron a cromatografía (tiempo de retención: 6,11 min) en 2 columnas de cromatografía Chiralpak AD (5x20cm) seriales (empresa Daicel) con la mezcla de disolventes n-heptano/2-propanol (4:1, fracción en volumen; 0,8 ml/min). Las fracciones de producto unidas se concentran al vacío hasta secarse, en cuyo caso se obtienen 245 mg del compuesto del título, puro para análisis y en enantiómeros, como un sólido incoloro con un punto de fusión de 202,3°C. MS: 365 (M⁺H⁺), 382 (M⁺NH₄⁺); DC: Rf = 0,29 (ciclohexano/éter metil-ter-butilo 1:4, fracciones en volumen); [α]_D²⁰ = +30,4° (c = 0,0201 g/2 ml de metanol).

b) de A2:

15 el compuesto del título se prepara de manera análoga a partir de ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metilbenzoico -N'-[(S)-2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida (A2), tal como se describió para el compuesto 3.

lb. Ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[(R)-2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida

a) Separación cromatográfica de racemato (sin Fig.):

20 500 mg del ejemplo 1 (EMD 638683) se disuelven en 4 porciones cada una en 5 ml de 2-propanol y 5 ml de n-heptano al calor. A continuación las soluciones se someten a cromatografía (tiempo de retención 9,36 min) en dos columnas de cromatografía Chiralpak AD (5x20cm) seriales (empresa Daicel) con la mezcla de disolventes n-heptano/2-propanol (4:1, fracciones en volumen; 0,8 ml/min). Las fracciones de producto unidas se concentran al vacío hasta secarse, en cuyo caso se obtienen 250 mg del compuesto del título como un sólido incoloro con un punto de fusión de 203,7°C. MS: 365 (M⁺H⁺); DC: Rf = 0,29 (ciclohexano/éter metil-ter-butilo 1:4, fracciones en volumen); [α]_D²⁰ = -29,7° (c = 0,0184g/2 ml de metanol), exceso de enantiómeros 98,2 %.

25 b) de A3:

30 45 mg de ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico -N'-[(R)-2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida (A3) se disuelven en 100 ml de metanol. A continuación la solución de reacción se hidrogena en el H-Cube® (empresa ThalesNano) de 10% de Pd/C (cartucho de 55 x 4 mm) (flujo: 1 ml/min, modo: lleno H₂, 30°C, presión normal). A continuación la solución de reacción se concentra hasta secarse y se purifica mediante HPLC preparativa (Chromolith® prep RP18e 100-25 mm, empresa Merck; gradiente de disolvente: agua / 1-50 vol.% acetonitrilo), en cuyo caso después de liofilización se obtienen 10 mg del compuesto del título como un liofilizado amorfo, incoloro; MS: 751,2 (2M⁺Na⁺); DC: Rf = 0,31 (ciclohexano/éter metil-ter-butilo 1:4, fracciones en volumen), exceso de enantiómeros >50 %.

Compuestos intermedios

35 A1. Ácido 2-etil-4-metoxi-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluor-fenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida

40 Se disuelven 106.0 g de ácido 3,5-difluor-fenil-hidroxi-acético hidrazida (B2) en 820 ml de N,N-dimetilformamida. A continuación se adicionan 104.9 g de ácido 2-etil-4-metoxi-3-metil-benzoico (B1), 153.9 g de N-3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida hidrocioruro (DAPECI) y 42.8 g de hidroxibenzotriazol (HOBt). La mezcla de reacción se refrigera en un baño de hielo durante la adición de los compuestos listados previamente. Después la solución se revuelve a temperatura ambiente durante 2 horas. Para el procesamiento, la mezcla de reacción se diluye con 3,5 litros de agua. La suspensión obtenida se revuelve durante una hora, a continuación se filtra y se lava con agua adicional. La torta de filtro se recrystaliza a partir de 2,5 litros de etanol, en cuyo caso se obtienen 129.0 g del compuesto del título como un sólido incoloro con un punto de fusión de 197.1 °C (MS: 401 (MNa⁺)).

A2. Ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico-N'-[(S)-2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida

45 El compuesto del título se prepara de manera análoga usando (S)-metiloxazaborolidina [(S)-Me-CBS] tal como se describe para el producto intermedio A3.

A3. Ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico -N'-[(R)-2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida

302 mg de ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluorfenil)-2-oxo-acetil]-hidrazida (B3) se disuelven en 25 ml de tetrahidrofurano. Esta solución se adiciona a gotas durante 5 minutos a una solución de 49 µl de complejo de boranodimetilsulfuro y 55 µl de (R)-metiloxazaborolidina [(R)-Me-CBS, 1-1,5 M en tolueno) en 17 ml de tetrahidrofurano a una temperatura de (-)78°C. A continuación se retira el baño frío y la solución se revuelve durante 6 h, en cuyo caso la solución de reacción se calienta a temperatura ambiente. Después se adicionan 100 ml de agua y se extraen tres veces cada vez con 150 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas unidas se lavan cada vez con 40 ml de agua, 0,1 M de HCl y solución saturada de NaCl, se seca sobre NaSO₄, se filtra con succión y se concentra hasta secarse. El residuo se purifica por medio de HPLC preparativa (gradiente de disolvente: agua / 1-50 vol.% de acetonitrilo), en cuyo caso se obtienen 63 mg del compuesto del título como sólido incoloro, amorfo. MS: 932 (2M⁺Na⁺); DC: Rf = 0,56 (ciclohexano/éter metil-ter.-butilo 1:4, fracciones en volumen).

B1. Ácido 2-etil-4-metoxi-3-metil-benzoico

Se disuelven 20.0 g de ácido 4-metoxi-2,3-dimetil-benzoico (C1) en un litro de tetrahidrofurano en una atmósfera de nitrógeno seco y a continuación se enfría a -78°C. Después se adicionan a gotas 300 ml de sec.-butil-litio (1.4 M en ciclohexano) y se obtiene una solución roja. La solución roja se revuelve durante una hora más a -78°C. Después se adicionan 34.5 ml de yoduro de metilo y la suspensión obtenida se revuelve sin refrigerarse durante una hora. A continuación se adicionan 300 ml de agua y la solución se extrae dos veces usando acetato de etilo, cada una con 300 ml de acetato de etilo. A continuación se filtra la fase acuosa, el filtrado se refrigera en un baño de hielo, mediante adición de ácido clorhídrico (3.0 M) se ajusta a un pH de 1 y se revuelve por otros 30 minutos. Después la suspensión se filtra y se lava con agua. La torta de filtrado se seca al vacío a 110°C, en cuyo caso se obtienen 20.9 g del compuesto del título como sólido incoloro con un punto de fusión de 180 °C (MS: 195.2 (MH⁺)).

B2. Ácido 3,5-difluoro-fenil-hidroxi-acético hidrazida

Se disuelven 5.0 g de éster metílico de ácido 3,5-difluoro-fenil-hidroxi-acético (C2) en 45.0 ml de 2-propanol. Después se adicionan a gotas 1.32 ml de hidrato de hidrazina y la mezcla de reacción se mantiene durante 18 horas bajo reflujo. A continuación la solución se concentra hasta secarse y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía flash en gel de sílice (gradiente para elución: acetato de etilo / 0-20.0 % en volumen de metanol), en cuyo caso se obtienen 3.70 g del compuesto del título como sólido incoloro con un punto de fusión de 119.3 °C (MS: 202.8 (MH⁺)).

B3. Ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluorfenil)-2-oxo-acetil]-hidrazida

172 mg de ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida (C3) se disuelven en 0,9 ml de dimetilsulfóxido y 28 ml de diclorometano bajo una atmósfera de nitrógeno seco. A continuación se adicionan 185 mg de triacetoxi-periodinano (reactivo de Dess-Martin). La suspensión se revuelve durante 1 h a temperatura ambiente. Para el procesamiento se adicionan 100 ml de diclorometano y 30 ml de solución de 0,5M de Na₂S₂O₃. La fase orgánica se extrae a continuación con 50 ml de solución saturada de NaHCO₃, se seca sobre Na₂SO₄, se filtra mediante succión y se concentra hasta secar. El residuo se purifica por medio de cromatografía en columnas flash en gel de sílice (gradiente de disolvente: ciclohexano / 0-30 % en volumen de éter metil-ter.-butilo), en cuyo caso se obtienen 163 mg del compuesto del título como sólido amorfo; MS: 452,7 (2M⁺H⁺); DC: Rf = 0,37 (ciclohexano/acetato de etilo 2:1, fracciones en volumen).

C1. Ácido 4-metoxi-2,3-dimetilbenzoico

Se disuelven 60.0 g de 2,3-dimetil-4-metoxibenzaldehído (D1) en 1.20 l de dimetilsulfóxido. A continuación se adiciona a gotas una solución de 131.5 g de dihidrofosfato de sodio y 132.2 g de cloruro de sodio en 480 ml de agua, en cuyo caso la temperatura de la mezcla de reacción se mantiene por debajo de 40 °C. Después se revuelve durante 2 horas más la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Para procesar la suspensión se diluye con 2.0 l de agua y se revuelve durante una hora más. El precipitado obtenido se filtra, se lava con agua y se seca al vacío a 100 °C. Se obtienen 65.0 g del compuesto del título como sólido incoloro con un punto de fusión de 214 °C (MS: 181.2 (MH⁺)).

C2. Éster metílico de ácido 3,5-difluoro-fenil-hidroxi-acético

Se disolvieron 25.0 g de ácido 3,5-difluoro-fenil-hidroxi-acético (D2) en 325 ml de metanol. A continuación se adicionan 3,9 g de ácido bórico y la mezcla de reacción se revuelve durante 18 horas a temperatura ambiente. Después la solución obtenida se concentró hasta secarse. El residuo se extrae usando 100 ml de acetato de etilo y 100 ml de agua. La fase acuosa se extrae a continuación dos veces cada una con 50 ml de acetato de etilo.

Las fases orgánicas unidas se secan sobre sulfato de sodio y se filtra. El filtrado se concentra al vacío hasta secarse en cuyo caso se obtienen 25.5 g del compuesto del título como un producto crudo. De la recrystalización de 17 ml de

acetato de etilo y 170 ml de ciclohexano resultan 23.5 g del compuesto puro C2 con un punto de fusión de 61.8 °C (MS 201.9 (M⁺)).

C3. Ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluorfenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida

5 El compuesto C3 se sintetiza de manera análoga a la preparación descrita para A1 de ácido 4-benciloxi-2-etil-3-metil-benzoico y el producto intermedio B2.

D1. 2,3-Dimetil-4-metoxibenzaldehído

El compuesto D1 fue adquirido de ABCR GmbH & Co. KG.

D2. Ácido 3,5-difluoro-fenil-hidroxi-acético

El compuesto D2 se adquirió de Sigma-Aldrich Co.

10 Ensayo bioquímico

Los compuestos de la invención descritos en los ejemplos se probaron en el ensayo descrito a continuación, y se encontró que presentan un efecto inhibitor de quinasa. Otros ensayos son conocidos a partir de la bibliografía y pueden realizarse fácilmente por el experto en la materia (véase por ejemplo Dhanabal et al., Cancer Res. 59:189-197; Xin et al., J. Biol. Chem. 274:9116-9121; Sheu et al., Anticancer Res. 18:4435-4441; Ausprunk et al., Dev. Biol. 15 38:237-248; Gimbrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52:413-427; Nicosia et al., In Vitro 18:538- 549). La inhibición de la proteoquinasa SGK1 puede determinarse en el proceso de enlazamiento de filtro.

Datos bioquímicos

Compuesto No.	Inhibición de enzima SGK1
	IC ₅₀
I	> 300 nM
Ia	> 300 nM
Ib	< 300nM

Descripción de figuras

20 En la Figura 1 está representado un gráfico de puntos (*dotplot*) de linfocitos CD8⁺T virus-específicos (Tet-9P 33⁺) en la sangre de ratones *knockout* - SGK1 (SGK1^{-/-}, *dot-plot* derecho) y sus ratones hermanos de tipo silvestre (SGK1^{+/+}, *dot-plot* izquierdo). Para este propósito se infectaron ratones *knockout*-SGK1 y ratones hermanos de tipo silvestre respectivamente con 2x 10⁶ pfu (*plaque forming units*) de LCMV (virus de coriomeningitis). Al octavo día después de la infección se tinturó la sangre con ayuda de la técnica llamada tetramer para células T CD8⁺ virus-específicos y a
25 continuación se identificaron y se cuantificaron células T CD8⁺ virus-específicos con ayuda del análisis FACS (*fluorescence activated cell sorting*, citometría de flujo). Los *dot-plots* representados en la Figura 1 documentan una defensa inmune frente a LCMV en los ratones *knockout*-SGK1.

La Figura 2 reproduce gráficamente el número de unidades formadoras de placa de ratones *knockout* SGK1 infectados con LCMV (SGK1^{-/-}, cuadrados cerrados) y sus ratones hermanos de tipo silvestre (VVT, cuadrados abiertos) en diversos tejidos. Para esto se infectaron ratones *knockout*-SGK1 y ratones hermanos de tipo silvestre respectivamente con 2x 10⁶ pfu (*plaque forming units*) de LCMV. Al octavo día después de la infección se analizaron los títulos de virus con ayuda del llamado ensayo *plug* en los diferentes tejidos (tejidos de riñón, pulmones, bazo e hígado). En las ordenadas del gráfico representado en la figura 2 se ha puesto el logaritmo decimal del número de las unidades que forman placa (pfu, *plaque forming units*). Los gráficos representados en la figura 2 muestran que
35 en los ratones *knockout* SGK1 el número de unidades formadoras de placa de LCMV en los diversos tipos de tejidos es más pequeño que en los ratones hermanos de tipo silvestre.

La Figura 3 muestra el resultado de una investigación inmunohistoquímica de antígeno LCMV en ratones *knockout* SGK1 (SGK1^{-/-}, derecha) y ratones hermanos de tipo silvestre (izquierda). Para esto se infectaron ratones *knockout*-

SGK1 y ratones hermanos de tipo silvestre respectivamente con 2×10^6 pfu de LCMV. A continuación, al octavo día después de la infección, se investigó tejido hepático de ratones knockout-SGK1 y de ratones hermanos de tipo silvestre inmunohistoquímicamente para antígeno de LCMV.

5 La Figura 4 muestra la influencia de SGK1 sobre dos marcadores de hepatitis típicos, más precisamente la enzima hepática alanina-aminotransferasa (gráfico izquierdo) y bilirrubina (gráfico derecho). Ambos marcadores están presentes de manera multiplicada en el tejido hepático en el caso de una hepatitis.

10 En las ordenadas del gráfico izquierdo de la figura 4 se reproduce la concentración de alanina-aminotransferasa (ALT), expresada en unidades por litro de líquido de tejido (U/L). En las abscisas se reproduce el tiempo en días. En las ordenadas del gráfico derecho de la figura 4 se pone la concentración de bilirrubina expresada en μmol por litro de líquido de tejido. En las abscisas se reproduce igualmente el tiempo expresado en días.

15 Los gráficos representados en la figura 4 muestran que se ha reducido ostensiblemente la concentración de alanina-aminotransferasa y bilirrubina en ratones knockout-SGK1 ($\text{SGK1}^{-/-}$, cuadrados cerrados) en caso de una hepatitis inducida por LCMV, en proporción con los valores correspondientes en ratones hermanos de tipo silvestre (WT, cuadrados abiertos). Estos datos confirman que "apagar" o inhibir SGK1 actúa de manera favorable desde el punto de vista en el desarrollo de hepatitis viral. Los gráficos representados en el figura 4 muestran además que SGK3 no muestra un efecto que favorezca el desarrollo de una hepatitis viral (compárense para esto los círculos cerrados en los gráficos de la figura 4, los cuales reflejan los valores correspondientes de ratones knockout-SGK3 ($\text{SGK3}^{-/-}$)). En este caso, en total también se infectaron los ratones knockout-SGK1 y los ratones hermanos de tipo silvestre (así como los ratones knockout-SGK3) respectivamente con 2×10^6 pfu de LCMV.

20 La figura 5 muestra gráficamente la influencia del inhibidor SGK1 ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluor-fenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida en la concentración de alanina-aminotransferasa así como de bilirrubina. Los ratones de tipo silvestre SGK1 del tipo 10 C57BL/6 fueron alimentados con alimento placebo. Después de una semana, un grupo de animales de ensayo se trató con el inhibidor de SGK1. El inhibidor de SGK1 se mezcló con la comida en una proporción de mezcla de 4.46 mg/g de comida. Esto corresponde a una dosis aproximada de 600 mg/kg de peso corporal. Al otro grupo se siguió administrando solo la comida placebo. Después de una semana más se infectaron los ratones knockout-SGK1 respectivamente con 2×10^6 pfu de LCMV con el fin de inducir, de esta manera, una hepatitis viral. Los valores para la alanina-aminotransferasa se midieron 8 días después de la infección, y los valores correspondientes para la bilirrubina 10 días después de la infección. En las ordenadas del gráfico izquierdo de la figura 5 se reproduce la concentración de alanina-aminotransferasa (U/L, unidades de enzima por litro de líquido de tejido). En las abscisas se representa el lapso de tiempo de 8 días después de la infección con LCMV. En las ordenadas del gráfico derecho de la figura 5 se representa la concentración de bilirrubina ($\mu\text{mol/L}$). Las abscisas muestran el lapso de tiempo de 10 días después de la infección con LCMV.

35 Los resultados reproducidos en los gráficos de la figura 5 demuestran que se redujeron ostensiblemente las concentraciones de los marcadores de hepatitis alanina-aminotransferasa y bilirrubina en los animales de ensayo, los cuales se trataron antes de la infección con el inhibidor SGK1 (cuadrados abiertos), en comparación con los animales de ensayo que no se trataron con el inhibidor de SGK1 (cuadrados cerrados). Estos datos demuestran que el inhibidor de SGK1 presenta propiedades que favorecen el desarrollo de hepatitis viral y de esta manera pueden emplearse para la profilaxis o el tratamiento de hepatitis viral.

40 La Figura 6 muestra el desarrollo de carcinomas de colon en ratones *knockout* - SGK1- (ratones $\text{SGK1}^{-/-}$) en comparación con ratones SGK1 de tipo silvestre (ratones $\text{SGK}^{+/+}$). Para este propósito se indujeron químicamente tumores de colon en los animales de ensayo (Wang JG, Wang DF, Lv BJ, Si JM: A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimetilhidrazina and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2958-2962). Una parte de los animales de ensayo, en una edad de 8 semanas, se sometieron a tres ciclos de una génesis química de tumor. Para este propósito, los animales se trataron en el área intraperitoneal con 20 mg/kg de 1,2-dimetilhidrazina (DMH; Sigma-Aldrich Corporation. St. Louis. MO. USA). Comenzando una semana después, a los animales se administró, tres veces durante 7 días, agua destilada con 30 g/l de sulfato de dextrano sódico sintético (DSS; masa molar 5000; Wako Pure Chemical Industries Ltd. Japan) y agua destilada por 14 días más (duración total $3 \times (1 + 2 \text{ semanas}) = 9$ semanas en total). En lugar de eso, a otra parte de los animales de ensayo (animales de control) se suministraron en el área peritoneal, por inyección, 20 mg/kg de una solución de cloruro de sodio al 0,9 %. Todos los ratones a la edad de 22 semanas se anestesiaron con éter y se sacrificaron a continuación.

55 El resultado, representado gráficamente en la figura 6, de la génesis tumoral inducida químicamente muestra claramente que la sensibilidad de los ratones knockout-SGK1 (reproducida por las barras cerradas a la derecha) en contraste con los ratones SGK1 de tipo silvestre (reproducida por las barras abiertas a la izquierda) es significativamente reducida frente a los tumores de colon inducidos químicamente. Este resultado es tanto más sorprendente en cuanto la literatura especializada reporta una regulación decreciente de SGK1 en tejidos carcinomatosos, respecto de los diversos tipos de carcinoma (Rauhala HE, Porkka KP, Tolonen TT, Martikainen PM, Tammela TL, Visakorpi T: Dualspecificity fosfatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated

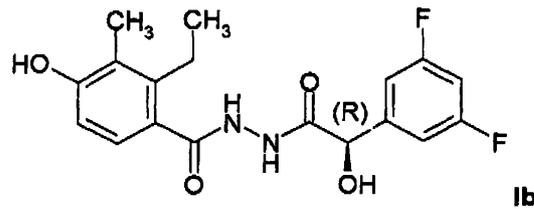
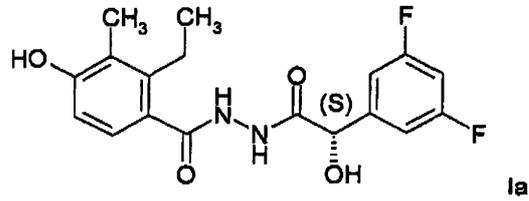
in prostate cancer. *Int J Cancer* 2005; Chu S, Rushdi S, Zumpfe ET, Mamers P, Healy DL, Jobling T, Burger HG, Fuller PJ: FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:426-433; Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, Kim MK: Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 2002; 14:382-387), por lo cual en realidad habría sido de esperar que una inhibición de SGK1 promoviera el crecimiento de tumor.

5
10
15

La figura 7 muestra gráficamente la acción del inhibidor de SGK1 ácido 2-etil-4-hidroxi-3-metil-benzoico-N'-[2-(3,5-difluor-fenil)-2-hidroxi-acetil]-hidrazida sobre la aparición de carcinomas de colon. Primero se realizó una génesis tumoral inducida químicamente, tal como se describe en la descripción de la figura 6. Una semana después del tratamiento se administró durante 20 días o bien un placebo o bien el inhibidor de SGK1. El inhibidor de SGK1 se había mezclado con la comida en una proporción de mezcla de 4.46 mg/g de comida. Esto corresponde a una dosis aproximada de 600 mg/kg de peso corporal. La gráfica representada en la figura 7 clarifica que en el caso de los animales de ensayo tratados con el inhibidor de SGK1, el crecimiento de tumores de colon (barras cerradas a la derecha) se inhibe de manera significativa en comparación con los animales de ensayo no tratados (barras abiertas a la izquierda).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de las fórmulas la y lb, principalmente para usar como medicamentos:



5 así como sus tautómeros, sales y los enantiómeros que pueden utilizarse en farmacia, incluidas sus mezclas en todas las proporciones.

2. Compuestos según la reivindicación 1 para el tratamiento de enfermedades virales caracterizados porque las enfermedades virales se seleccionan del grupo de coriomeningitis linfocítica, hepatitis viral, miocarditis viral, sida, herpes, papiloma y neumonía viral.

10 3. Compuestos según la reivindicación 1, para el tratamiento de carcinomas, caracterizados porque los carcinomas se seleccionan del grupo de carcinoma de colon, carcinoma de mama, carcinoma de estómago y carcinoma de pulmón.

4. Uso de compuestos según una de las reivindicaciones precedentes para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades virales y/o carcinomas.

15

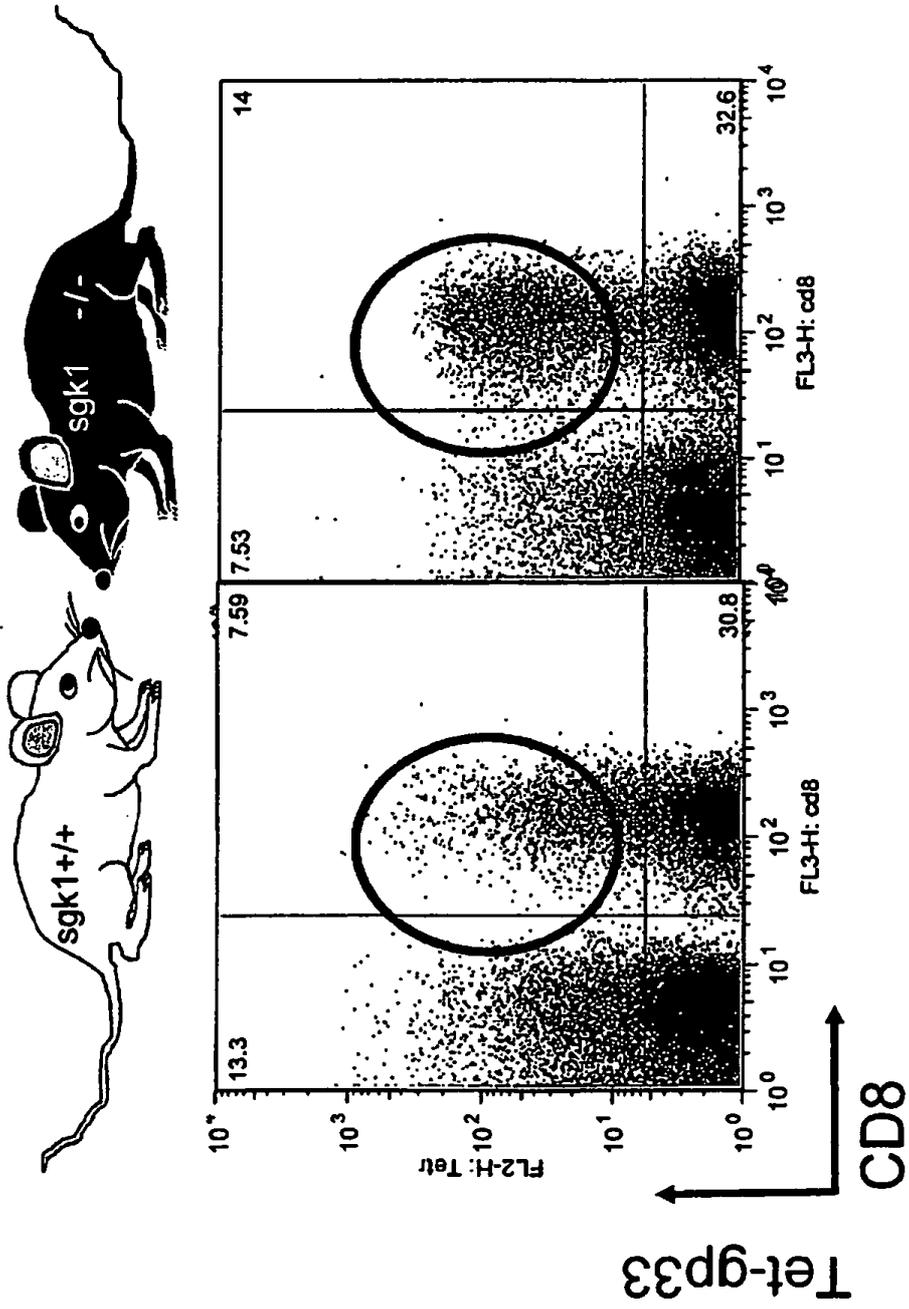


Fig. 1

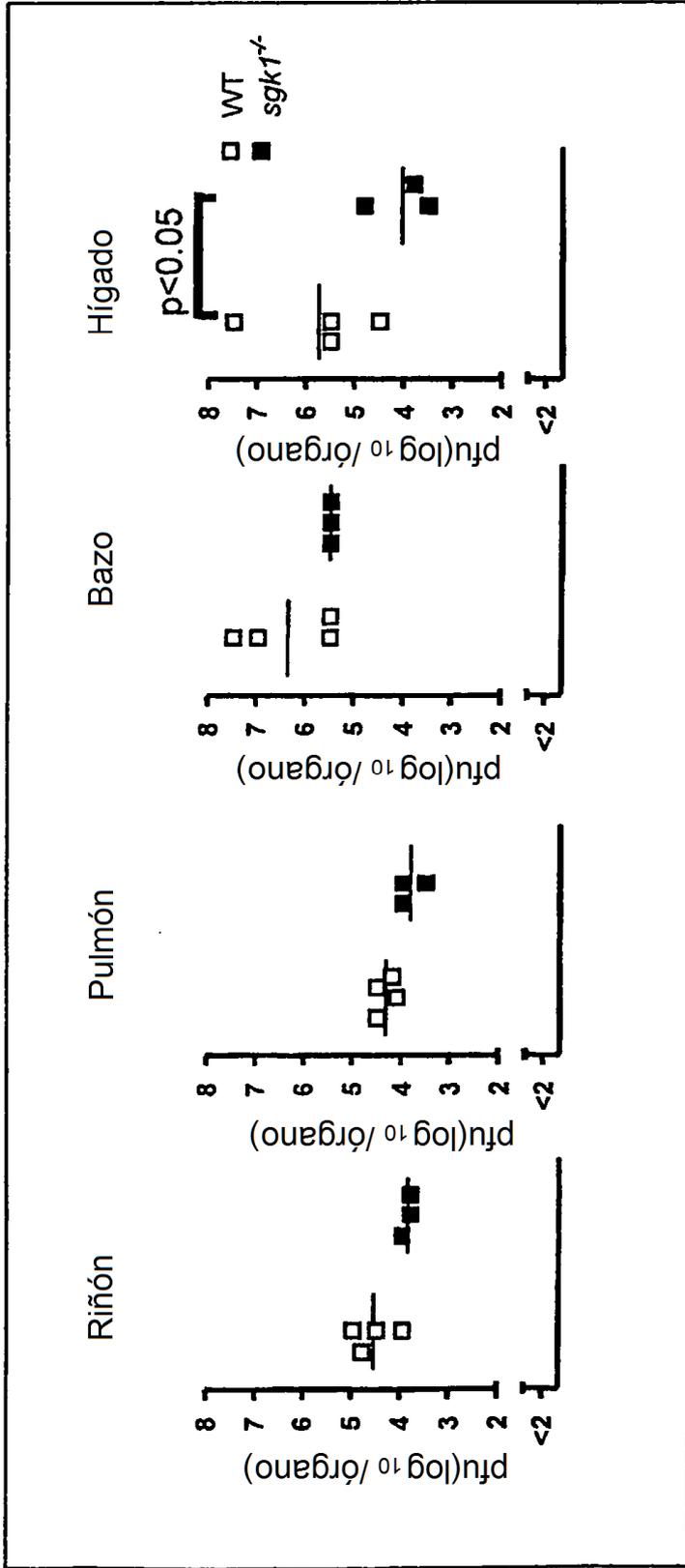


Fig. 2

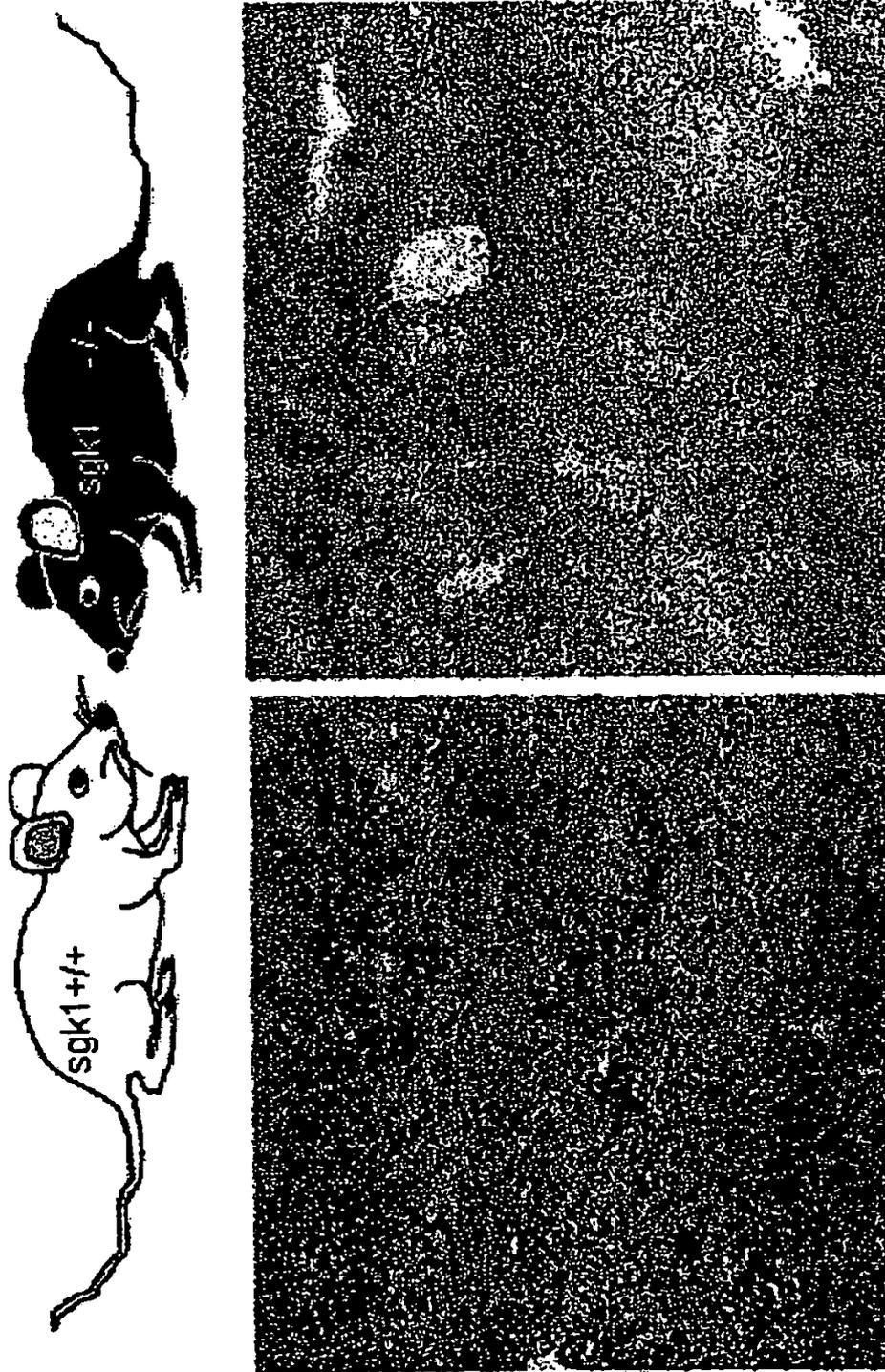


Fig. 3

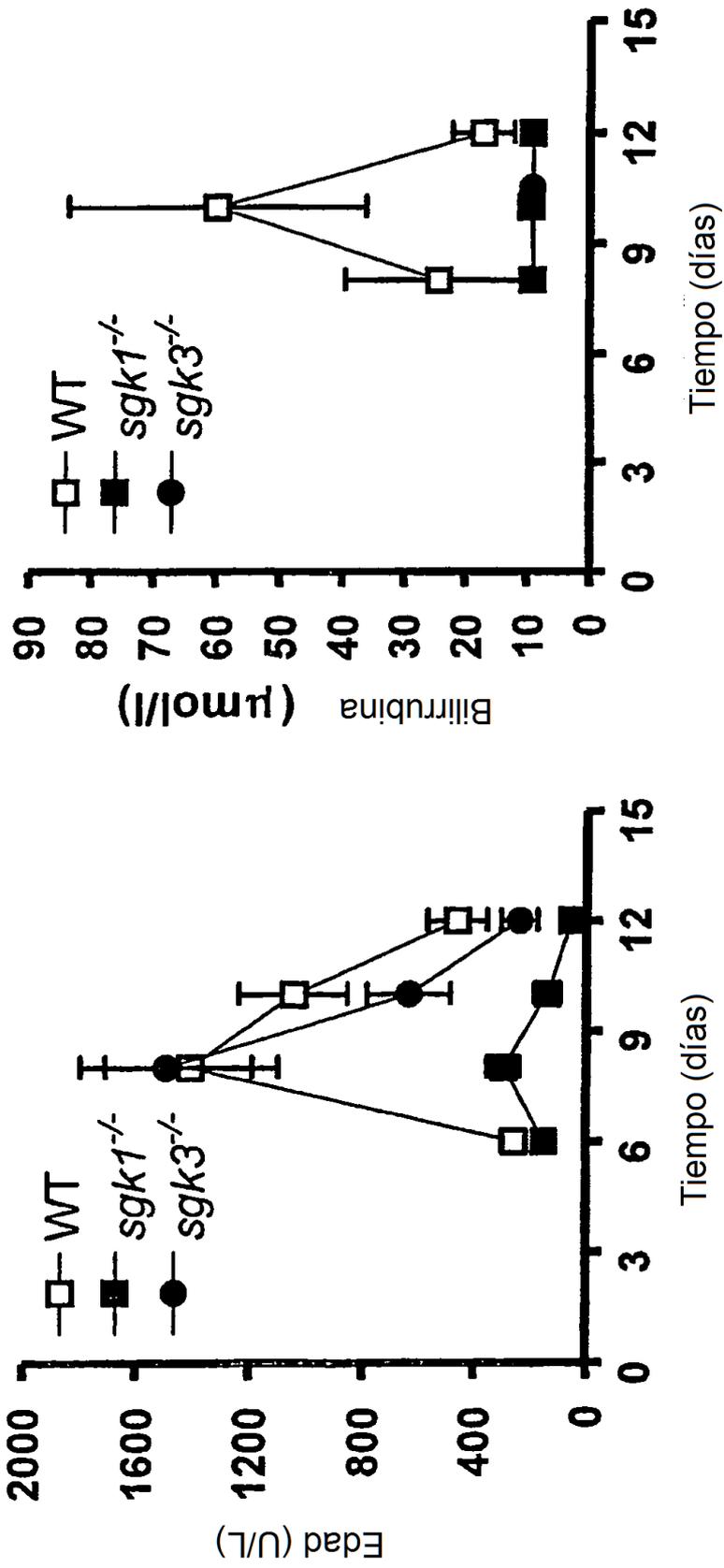


Fig. 4

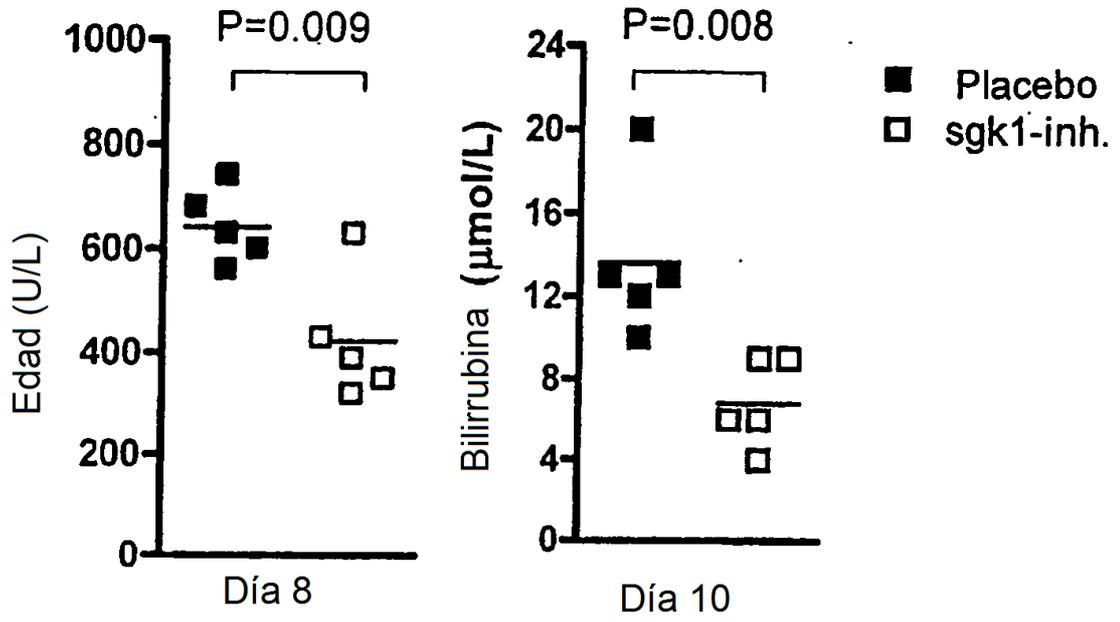


Fig. 5

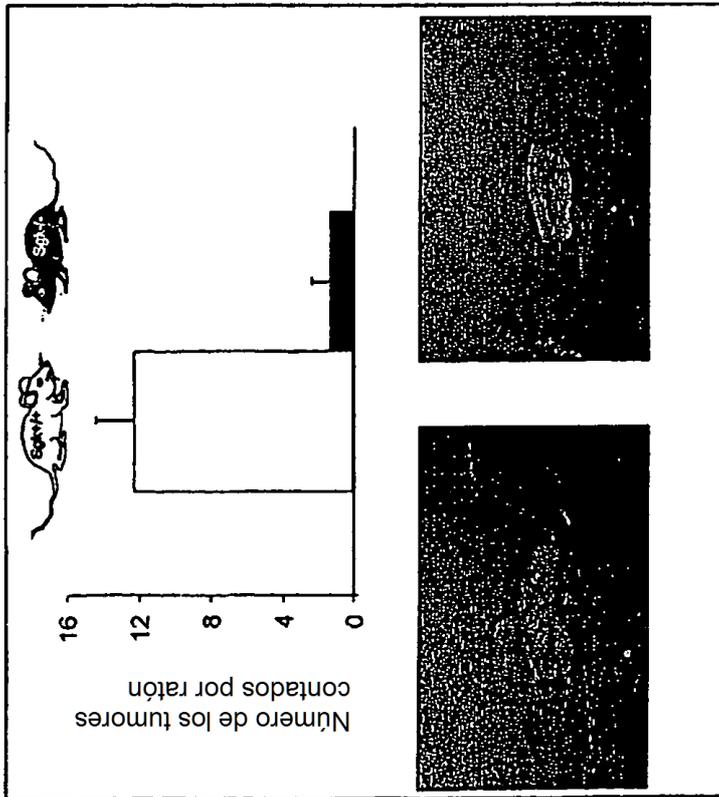


Fig. 6.

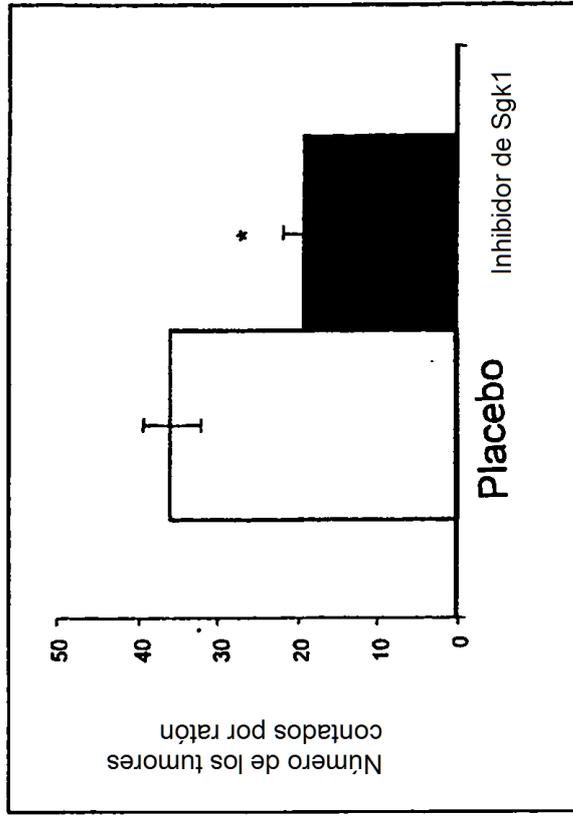
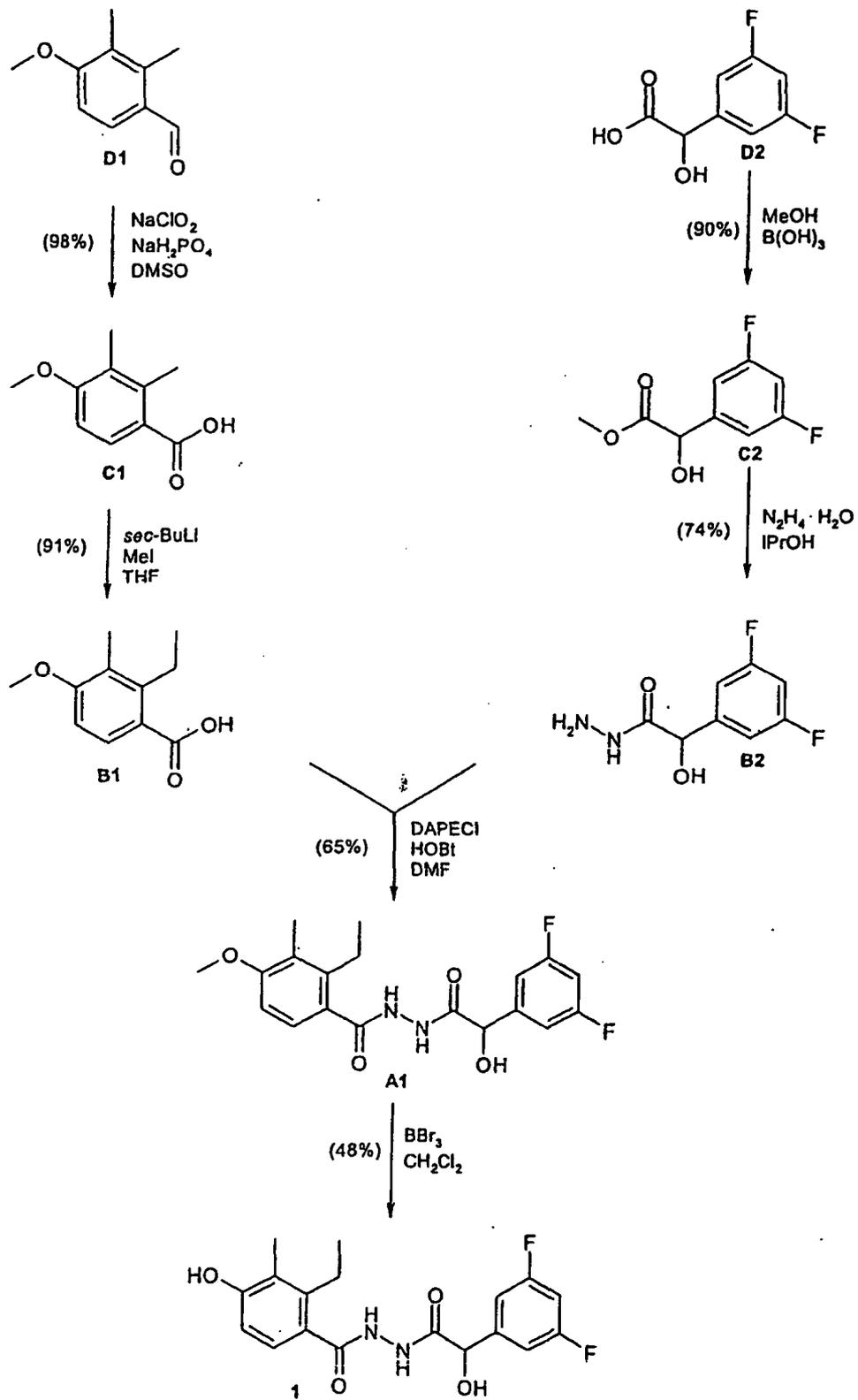


Fig. 7

Esquema de síntesis **EMD 638683**



EMD 638683

Fig. 9:

