

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 054**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/14** (2006.01)

**A61K 31/502** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2010 E 10726756 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2443104**

54 Título: **Antagonistas de la vía Hedgehog de ftalazina disubstituida**

30 Prioridad:

**19.06.2009 US 218628 P**

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

**24.06.2013**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**HIPSKIND, PHILIP, ARTHUR;  
PATEL, BHARVIN, KUMAR y  
WILSON (NEE TAKAKUWA), TAKAKO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 409 054 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).

## DESCRIPCION

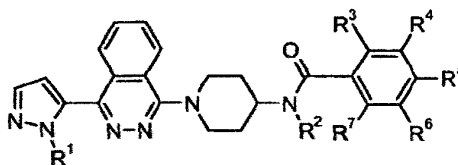
Antagonistas de la vía Hedgehog de ftalazina disustituida

La presente invención se refiere a antagonistas de la vía Hedgehog y, más específicamente, a nuevas ftalazinas 1,4-disustituidas y uso terapéutico de las mismas. La vía señal Hedgehog (Hh) juega un papel importante en la formación del patrón embrionario y el mantenimiento del tejido adulto mediante el direccionamiento de la diferenciación y proliferación celular. La familia de proteína Hedgehog (Hh), la cual incluye la Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh), y Desert Hedgehog (Dhh), son glucoproteínas secretadas que experimentan modificaciones post-traducción, incluyendo la escisión autocatalítica y acoplamiento del colesterol al péptido amino-terminal para formar el fragmento que posee actividad de señal. La Hh se une a la proteína transmembrana de doce pasos Ptch (Pitch1 y Ptch2), aliviando, de esta forma, la supresión mediada por Ptch de Smoothened (Smo). La activación de Smo inicia una serie de episodios intracelulares que culminan en la estabilización de los factores de transcripción Gli (Gli1, Gli2, y Gli3) y la expresión de genes dependientes de Gli que son responsables de la proliferación de células, supervivencia de células, angiogénesis e invasión.

La señal Hh ha atraído recientemente un considerable interés en base al descubrimiento de que la activación aberrante de la señal Shh conduce a la formación de diversos tumores, por ejemplo, cáncer pancreático, meduloblastoma, carcinoma de célula basal, cáncer de pulmón de célula pequeña, y cáncer de próstata. El Documento WO 2005033288 divulga ciertos compuestos de ftalazina 1,4-disustituidos que se asegura que son antagonistas de hedgehog. De manera similar, el Documento WO 2008110611 divulga ciertos compuestos de ftalazina 1,4-disustituidos relacionados con la diagnosis y tratamiento de patologías relacionadas con la vía hedgehog. El Documento 2009002469 divulga ciertos compuestos de ftalazina 1,4-disustituidos de los que se asegura que son una opción de tratamiento para todos los tumores impulsados por una señal hedgehog inapropiada.

Existe aún una necesidad de potentes inhibidores de la vía hedgehog, particularmente aquellos que tienen perfiles toxicológicos deseables. La presente invención proporciona nuevas ftalazinas 1,4-disustituidas que son potentes antagonistas de esta vía. Los compuestos particulares de la presente invención proporcionan deseable interacción fármaco-fármaco y perfiles de seguridad relacionados con respecto al potencial de inhibición de CYP3A4 irreversible en base al mecanismo y/o reversible.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I



Fórmula I

en el que, R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>2</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> o R<sup>7</sup> son independientemente hidrógeno, fluoro, cloro, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, difluorometoxi, metilsulfonilo, o trifluorometilsulfonilo, a condición de que al menos tres de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> sean hidrógeno; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

La presente invención proporciona igualmente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en combinación con un excipiente, vehículo o diluyente aceptable farmacéuticamente.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia. Igualmente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer. En particular, el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de cerebro, carcinoma de célula basal, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, linfoma de célula B, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer colorectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas de tejido blando, sarcomas de hueso, leucemia, y cáncer testicular.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En particular, el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de cerebro, carcinoma de célula basal, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, linfoma de célula B, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer colorectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas de tejido blando, sarcomas de hueso, leucemia, y cáncer testicular.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, como un ingrediente activo para el tratamiento de cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de cerebro, carcinoma de célula basal, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, linfoma de célula B, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer colorectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas de tejido blando, sarcomas de hueso, leucemia, y cáncer testicular.

Los compuestos particulares de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, son aquellos en los que:

- 10 (a)  $R^1$  es metilo;
- (b)  $R^2$  es metilo;
- (c)  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^7$  son independientemente hidrógeno, fluoro, cloro, trifluorometilo, o metilsulfonilo;
- (d)  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^7$  son independientemente hidrógeno, fluoro, cloro, o trifluorometilo;
- 15 (e) al menos dos de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son independientemente fluoro, cloro, trifluorometilo o metilsulfonilo, a condición de que  $R^3$  y  $R^7$  no sean simultáneamente hidrógeno;
- (f) al menos dos de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son independientemente fluoro o trifluorometilo, a condición de que  $R^3$  y  $R^7$  no sean simultáneamente hidrógeno;
- (g)  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son hidrógeno;
- 20 (h)  $R^3$  y  $R^5$  son independientemente fluoro, cloro, trifluorometilo o metilsulfonilo; y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son hidrógeno;
- (i)  $R^3$  y  $R^5$  son independientemente fluoro o trifluorometilo; y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son hidrógeno;
- (j)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo;
- (k)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo; y  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^7$  son independientemente hidrógeno, fluoro, cloro, trifluorometilo, o metilsulfonilo;
- 25 (l)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo; y  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^7$  son independientemente hidrógeno, fluoro, o trifluorometilo;
- (m)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo; y al menos dos de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son independientemente fluoro, cloro, trifluorometilo o metilsulfonilo, a condición de que  $R^3$  y  $R^7$  no sean simultáneamente hidrógeno;
- 30 (n)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo; y al menos dos de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son independientemente fluoro o trifluorometilo, a condición de que  $R^3$  y  $R^7$  no sean simultáneamente hidrógeno;
- (o)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo; y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son hidrógeno;
- (p)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo;  $R^3$  y  $R^5$  son independientemente fluoro, cloro, trifluorometilo o metilsulfonilo; y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son hidrógeno; y
- 35 (q)  $R^1$  es metilo; y  $R^2$  es metilo;  $R^3$  y  $R^5$  son independientemente fluoro, o trifluorometilo; y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son hidrógeno.

Tal como se han usado anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, los términos siguientes, salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que tienen los significados siguientes:

Un "vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente" es un medio generalmente aceptado en la técnica para el suministro de agentes activos biológicamente a mamíferos, por ejemplo, humanos.

- 40 Las "sales aceptables farmacéuticamente" se refieren a las sales orgánicas e inorgánicas, relativamente no tóxicas, de compuestos de la presente invención.

La "cantidad eficaz terapéuticamente" o "cantidad eficaz" significa la cantidad del compuesto de Fórmula I, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de la presente invención o composición farmacéutica que contiene un compuesto de Fórmula I, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de la presente invención que causará la respuesta biológica o médica o el efecto terapéutico deseado sobre un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que está siendo deseada por el investigador, veterinario, médico u otro clínico.

Los términos “tratamiento”, “tratar”, “trato”, y similares, están pensados para incluir el retardo o reversión de la progresión de un trastorno. Estos términos incluyen igualmente el alivio, mejora, atenuación, eliminación, o reducción de uno o más síntomas de un trastorno o estado, incluso si el trastorno o estado no está realmente eliminado e incluso si la progresión del trastorno o estado no se ha retardado o revertido por sí misma.

- 5 De acuerdo con la nomenclatura convencional usada a lo largo de la presente divulgación, en primer lugar se describe la porción terminal de la cadena lateral designada, seguido de la funcionalidad adyacente con respecto al punto de unión. Por ejemplo, un sustituyente metilsulfonilo es equivalente a  $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-}$ .

Los compuestos de la presente invención son capaces de reacción, por ejemplo, con un cierto número de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido aceptables farmacéuticamente. Dichas sales de adición aceptables farmacéuticamente y la metodología común para su preparación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, HANDBOOK OF PHARMACY SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, y otros, “Pharmaceutical salts”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, No. 1, (January 1977).

15 Los compuestos de la presente invención son preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas que usan un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente y administrados por una diversidad de vías. Preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, y otros, eds. 19<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., 1995).

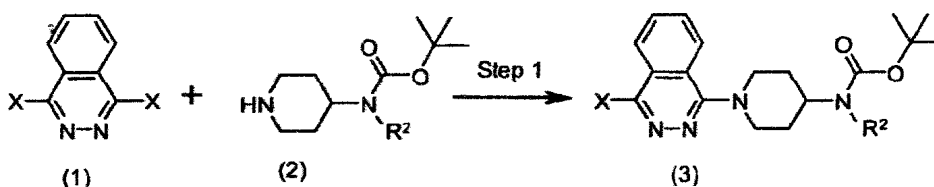
20 El compuesto realmente administrado será determinado por un médico bajo las circunstancias relevantes, incluyendo el estado a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones diarias normalmente caen dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, pueden ser más que adecuados niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado, en tanto que en otros casos pueden usarse dosis mayores.

25 Los compuestos de Fórmula I, o sus sales, pueden prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, así como por los descritos en los Esquemas, Preparaciones, y Ejemplos que figuran más adelante. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar compuestos de Fórmula I, o sus sales aceptables farmacéuticamente.

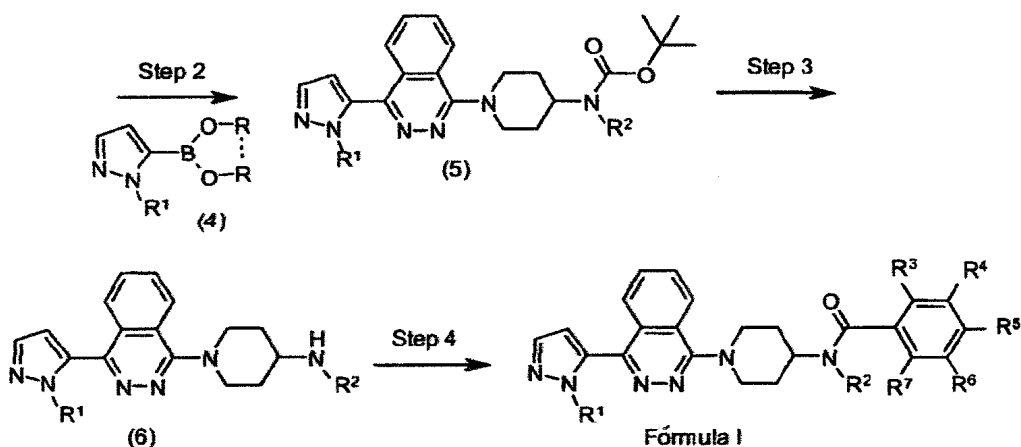
30 Los sustituyentes, salvo que se indique lo contrario, son tal como previamente se han definido. Los reactivos y materiales de partida están generalmente fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica. Otros pueden obtenerse mediante técnicas usuales de química orgánica y de heterociclos, técnicas que son análogas a las de síntesis de compuestos estructuralmente similares conocidos, y los procedimientos descritos en las Preparaciones y Ejemplos que siguen a continuación que incluyen cualquier nuevo procedimiento. La denominación de las Preparaciones y Ejemplos que siguen a continuación se ha realizado usando la estructura de denominación de Struct=Name en ChemDraw® Ultra 10.0.

35 Tal como se usan en la presente invención, los términos siguientes tienen los significados indicados: “ $\text{Et}_2\text{O}$ ” se refiere a éter dietílico; “DMF” se refiere a dimetilformamida; “DMSO” se refiere a dimetilsulfóxido; “DMAC” se refiere a N,N-dimetilacetamida; “NMP” se refiere a N-metilpirrolidina; “MeOH” se refiere a metanol; “*boc*” o “*t-boc*” se refiere a *tert*-butoxicarbonilo; y “ $\text{IC}_{50}$ ” se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibidora máxima posible para dicho agente.

#### Esquema



## Esquema (Cont)

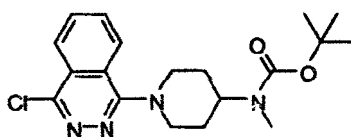


Un compuesto de Fórmula I puede prepararse de acuerdo con las reacciones tal como se representan en el Esquema.

- 5 En la Etapa 1, una ftalazina dihalo sustituida (1) (X = Cl o Br) se hace reaccionar con una piperidina 4-amino boc protegida (2) en una sustitución aromática nucleofílica (S<sub>N</sub>Ar) para proporcionar una halo piperidil ftalazina de fórmula (3). La reacción se desarrolla en un disolvente aprótico dipolar tal como DMF, DMAC, o NMP, en la presencia de una base orgánica o inorgánica. Preferiblemente, la reacción tiene lugar en NMP, en la presencia de carbonato potásico, a una temperatura de 50 - 140°C.
- 10 En la Etapa 2, una halo piperidil ftalazina de fórmula (3) desarrolla una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki con un éster o ácido pirazol borónico (4). Por ejemplo, una halo piperidil ftalazina (3) se combina con éster pinacol del ácido 1-metil-1H-pirazol-5-borónico en la presencia de un catalizador de paladio, tal como tetraquis(trifenilfosfina)paladio y una base inorgánica, tal como bicarbonato sódico. La reacción se desarrolla en una mezcla disolvente de tolueno/etanol/agua para proporcionar la pirazolil ftalazina de fórmula (5).
- 15 La Etapa 3 en una simple desprotección boc realizada bajo condiciones ácidas tal como HCl en éter dietílico o dioxano para proporcionar la aminopiperidinil ftalazina de fórmula (6). Los procedimientos para la introducción y eliminación de grupos de protección de nitrógeno y oxígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd. Ed., John Wiley and Sons, New York, (1999)).
- En la Etapa 4, la aminopiperidil ftalazina de fórmula (6) se acila para proporcionar la piperidinil amida de Fórmula I.
- 20 En un procedimiento, la amina se hace reaccionar con un cloruro de benzilo apropiadamente sustituido en un disolvente inerte, tal como diclorometano, en la presencia de una base orgánica tal como trietilamina o diisopropil-etilamina. Como alternativa, la amida se forma usando un ácido benzoico apropiadamente sustituido. Un éster activo se forma usando difenilfosfinato de pentafluorofenilo seguido de reacción con la amina. La reacción se desarrolla en una mezcla disolvente de DMF/DMSO a una temperatura de aproximadamente -10 hasta 100°C en la presencia de una base orgánica, tal como trietilamina o diisopropil-etilamina.
- 25

## Preparación 1

1-(4-cloroftalazin-1-il)piperidin-4-il(metil)carbamato de *tert*-butilo

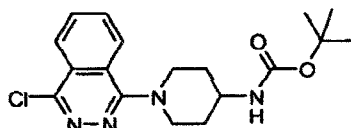


- 30 Se calentó una mezcla carbonato potásico (21,23 g, 153,6 mmol), 1,4-dicloroftalazina (26 g, 128 mmol) y éster *tert*-butílico del ácido metilpiperidin-4-il carbámico (30,01 g, 134,4 mmol) en N-metilpirrolidina (200 ml) a 80°C durante una noche. La mezcla se vertió en agua, se extrajo con diclorometano, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró bajo presión reducida. Se agregó éter dietílico y se separó por filtración el sólido resultante (4-cloroftalazin-1-ol procedente de impureza del material de partida). El filtrado se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromato-

grafía de gel de sílice ultrarrápida (hexano:acetato de etilo = 2:1), proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco (17,66 g, 37%). ES/MS m/z (<sup>37</sup>Cl) 377,0 (M+1).

### Preparación 2

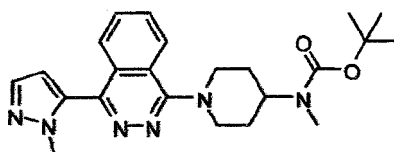
1-(4-clorofthalazin-1-il)piperidin-4-ilcarbamato de *terc*-butilo



5 El compuesto del epígrafe se preparó esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en la Preparación 1, usando éster *terc*-butílico del ácido piperidin-4-il carbámico. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió en agua (500 ml). Se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y los disolventes se eliminaron bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color amarillo (36 g, 97%). ES/MS m/z 363,0 (M+1).

### Preparación 3

Metil(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)carbamato de *terc*-butilo

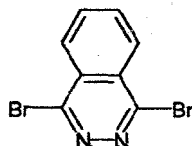


15 Se introdujo carbonato potásico (3,82 g, 36,09 mmol), 1-(4-clorofthalazin-1-il)piperidin-4-il(metil)carbamato de *terc*-butilo (6,8 g, 18,04 mmol) y éster pinacol del ácido 1-metil-1H-pirazol-5-borónico (5,63 g, 27,1 mmol) en un matraz con una mezcla de tolueno (50 ml), etanol (17 ml), y agua (17 ml). La mezcla se desgasificó durante 10 minutos con gas nitrógeno. Se agregó tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0,4 g, 0,35 mmol) y la mezcla se calentó a 74°C durante una noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con diclorometano. La porción orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de gel de sílice ultrarrápida (hexano:acetato de etilo: NH<sub>3</sub> 2 M en MeOH = 20:5:1), proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de una espuma de color amarillo (5,33 g, 70%). ES/MS m/z 423,2 (M+1).

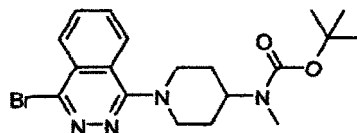
**Procedimiento alternativo para preparar metil(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)carbamato de *terc*-butilo: Preparaciones 4 – 6**

### Preparación 4

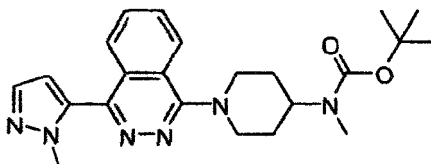
25 1,4-dibromofthalazina



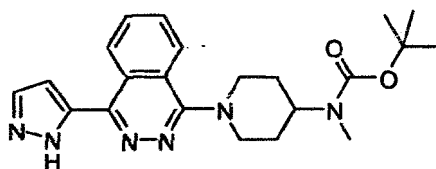
30 Se cargó un tubo a presión con pentabromuro de fósforo (24,5 g, 54,1 mmol) y 2,3-dihidrofthalazina-1,4-diona (5,00 g, 30,8 mmol). El tubo se selló y se calentó a 140°C durante 6-7 horas. Se dejó enfriar durante una noche. El tubo se abrió cuidadosamente debido a la presión. El sólido se extrajo con un rascador y se vertió dentro de agua-hielo. Se agitó en agua-hielo y el sólido resultante se recogió mediante filtración en vacío. Se secó en una estufa de vacío, proporcionando el producto final (8,31 g, 93%). ES/MS (<sup>79</sup>Br, <sup>81</sup>Br) m/z 288,8 (M+). Ref.: Can. J. Chem., vol. 43, pág. 2708, (1965).

**Preparación 5**1-(4-bromoftalazin-1-il)piperidin-4-il(metil)carbamato de *tert*-butilo

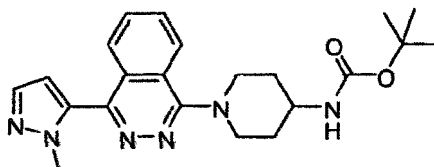
5 Se combinó 1,4-dibromoftalazina (0,70 g, 2,38 mmol), N-metilpirrolidona (7,0 ml), carbonato potásico (395 mg, 2,86 mmol), y éster *tert*-butílico del ácido metilpiperidin-4-il-carbámico (532 mg, 2,38 mmol). Se calentó a 80°C durante una noche. Se enfrió y se vertió en agua. El sólido se recogió y se secó en una estufa de vacío a temperatura ambiente durante una noche, obteniéndose el producto final (0,96 g, 95%). ES/MS ( $\delta^1\text{Br}$ ) m/z 421,0 (M+1).

**Preparación 6**Metil(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)carbamato de *tert*-butilo

10 Se cargó un tubo de reacción con 1-(4-bromoftalazin-1-il)piperidin-4-il(metil)carbamato de *tert*-butilo (500 mg, 1,2 mmol), éster pinacol del ácido 1-metil-1H-pirazol-5-borónico (370 mg, 1,8 mmol), carbonato sódico (252 mg, 2,4 mmol), tolueno (3,75 ml), etanol (1,25 ml), y agua (1,25 ml). La mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Se agregó tetraquis(trifenilfosfina)paladio (137,1 mg, 118,7  $\mu\text{mol}$ ). Se borboteó nitrógeno a través de la mezcla de reacción durante otros 10 minutos. El vial de reacción se cerró y se calentó a 90°C durante una noche. La reacción se enfrió y se filtró a través de un lecho de gel de sílice, eluyendo con MeOH al 5%:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fracciones se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó usando cromatografía de gel de sílice (NH<sub>3</sub> 2 N al 2% en MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), proporcionando el producto final (345,6 mg, 69%). ES/MS m/z 432,2 (M+1).

**Preparación 7**(1-(4-(1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)(metil)carbamato de *tert*-butilo

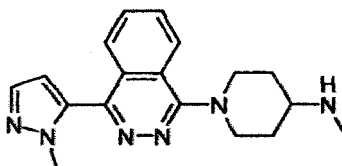
25 El compuesto del epígrafe se preparó esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en la Preparación 3, usando (1-(4-cloroftalazin-1-il)piperidin-4-il)(metil)carbamato de *tert*-butilo y éster pinacol del ácido 1H-pirazolo-3-borónico, proporcionando 580 mg, (67%). ES/MS m/z 409,2 (M+1).

**Preparación 8**(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)(metil)carbamato de *terc*-butilo

- 5 El compuesto del epígrafe se preparó esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en la Preparación 3, usando (1-(4-clorofthalazin-1-il)piperidin-4-il)(metil)carbamato de *terc*-butilo, proporcionando 5,92 g (94%). ES/MS  $m/z$  308,8 ( $M^+$ ).

**Preparación 9**

N-metil-1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-amina



- 10 Se disolvió metil(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)(metil)carbamato de *terc*-butilo (7,77 g, 18,39 mmol) en diclorometano (100 ml). Se agregó un exceso de cloruro de hidrógeno 1 M en éter dietílico (20 ml, 80 mmol) a la solución y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de gel de sílice ultrarrápida ( $NH_3$  2 M en MeOH = 10:1), proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de una espuma de color amarillo (5,83 g, 96%). ES/MS  $m/z$  323,2 ( $M+1$ ).

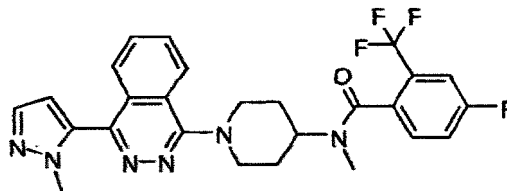
15 Los compuestos intermedios de la tabla que figura a continuación se prepararon esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en la Preparación 9, con la excepción de que la amina t-Boc protegida apropiada se desprotegió usando HCl 4 M en dioxano.

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	ES/MS $m/z$
10	1-(4-(1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)-N-metilpiperidin-4-amina		309,2 ( $M^+$ )
11	1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-amina		408,8 ( $M^+$ )



**Ejemplo 1**

4-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)benzamida



5 Se trató una solución de N-metil-1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-amina (2,8 g, 8,68 mmol) y trietilamina (3,36 ml, 26,1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) con cloruro de 4-fluoro-2-(trifluorometil)benzoilo (2,14 ml, 10,42 mmol). Se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de gel de sílice ultrarrápida (hexano:acetato de etilo:NH<sub>3</sub> 2 M en MeOH = 20:5:1), proporcionando la base libre en forma de una espuma de color amarillo (3,83 g, 86%). ES/MS m/z 513,0 (M+1).

**Ejemplo 1a**

Hidrocloruro de 4-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)benzamida

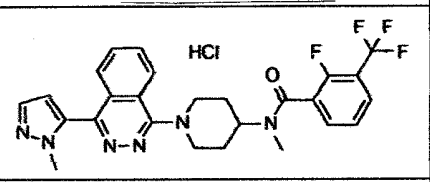
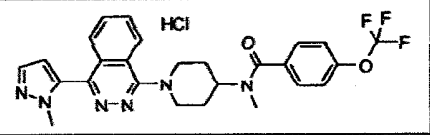
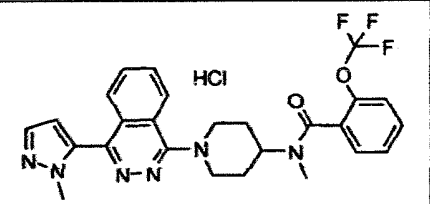
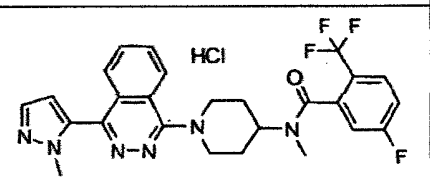
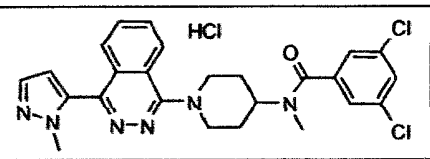
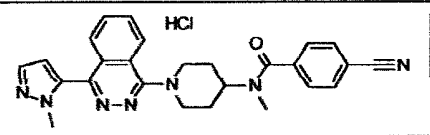
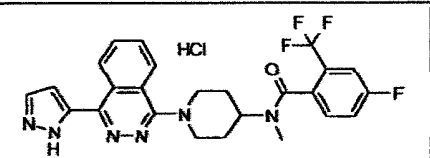
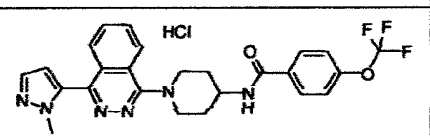
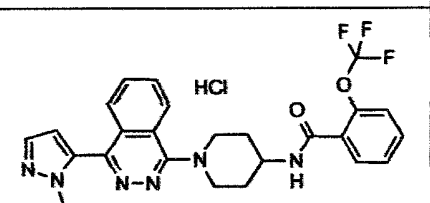
15 Se disolvió 4-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)benzamida (7,13 g, 13,91 mmol) en diclorometano (100 ml) y se agregó un exceso de HCl 1 N en éter dietílico (30 ml, 30 mmol). Los disolventes se eliminaron bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del epígrafe (7,05 g, 92%). ES/MS m/z 513,0 (M+1). La RMN mostró una mezcla 2:1 de rotámeros de amida. Rotámero mayor; RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,34 (m, 1H), 8,26 (m, 2H), 7,95 (m, 1H), 7,75 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,55 (m, 1H), 6,72 (d, 1H, J=2Hz), 5,15 (ancho, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,22 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,48 (m, 2H), 2,65 (s, 3H), 2,19 (m, 2H), 1,89 (m, 2H). Rotámero menor; RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,27 (m, 1H), 8,24 (m, 2H), 7,94 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,63 (m, 3H), 6,70 (d, 1H, J=2Hz), 5,15 (ancho, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,16 (m, 2H), 2,92 (s, 3H), 1,90 (m, 2H), 1,62 (m, 2H).

20 Las amidas de la tabla que figura a continuación se prepararon esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y 1a, usando la piperidinilftalazina apropiada y cloruro de benzoilo sustituido.

25

30

35

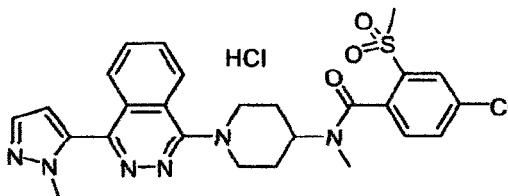
Ej. No.	Nombre químico	Estructura	ES/MS m/z
2	hidrocloruro de 2-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-3-(trifluorometil)-benzamida		513,0 (M+1)
3	hidrocloruro de N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-4-(trifluorometoxi)benzamida		511,0 (M+1)
4	hidrocloruro de N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometoxi)benzamida		511,0 (M+1)
5	hidrocloruro de 5-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)benzamida		513,0 (M+1)
6	hidrocloruro de 3,5-dicloro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		( <sup>35</sup> Cl) 495,0 (M+1)
7	hidrocloruro de 4-ciano-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		526,2 (M+1)
8	hidrocloruro de N-(1-(4-(1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-4-fluoro-N-metil-2-trifluorometil)benzamida		499,0 (M+1)
9	hidrocloruro de N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-4-trifluorometoxi)benzamida		497,0 (M+1)
10	hidrocloruro de N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-trifluorometoxi)benzamida		497,0 (M+1)

(Continuación)

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	ES/MS m/z
11	hidrocloruro de 5-fluoro-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-trifluorometil)benzamida		499,0 (M+1)
12	hidrocloruro de 4-fluoro-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-trifluorometil)benzamida		499,0 (M+1)
13	hidrocloruro de 4-ciano-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		438,0 (M+1)

**Ejemplo 14**

- 5 Hidrocloruro de 4-cloro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(metilsulfonil)benzamida



10 Se disolvió N-metil-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-amina (100 mg, 0,31 mmol), ácido 4-cloro-2-(metilsulfonil)benzoico (87 mg, 0,37 mmol) y diisopropiletilamina (0,26 ml, 1,5 mmol) en DMF:DMSO = 4:1 (2 ml) a 60°C. Se enfrió a 0°C y se agregó difenilfosfinato de pentafluorofenilo (250 mg, 0,65 mmol) en DMFO:DMSO = 1:1 (1 ml) a la solución. La mezcla se agitó a 60°C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de gel de sílice ultrarrápida (hexano:acetato de etilo: NH<sub>3</sub> 2 M en MeOH = 20:5:1), proporcionando el producto. Se agregó exceso de HCl 1 N en éter dietílico (1 ml, 10 mmol) al producto aislado y el disolvente se eliminó, proporcionando el compuesto del epígrafe (150 mg, 84%). ES/MS m/z 15 539,0 (M+1).

Las amidas de la tabla que figura a continuación se prepararon esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 14, usando la piperidiniftalazina apropiada y ácido benzoico sustituido.

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	ES/MS m/z
15	hidrocloruro de N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(metilsulfonil)benzamida		505,0 (M+1)

(Continuación)

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	ES/MS m/z
16	hidrocloruro de 5-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(metilsulfonil)benzamida		476,0 (M+1)
17	hidrocloruro de N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometilsulfonil)benzamida		559,0 (M+1)
18	hidrocloruro de 2-cloro-4-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		( <sup>35</sup> Cl) 479,0 (M+1)
19	hidrocloruro de 2-ciano-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		452,0 (M+1)
20	hidrocloruro de 4-(difluorometoxi)-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		493,0 (M+1)
21	hidrocloruro de N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		491,0 (M+1)
22	hidrocloruro de 4-cloro-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(metilsulfonil)benzamida		( <sup>35</sup> Cl) 525,0 (M+1)
23	hidrocloruro de N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometilsulfonil)benzamida		545,0 (M+1)
24	hidrocloruro de 2-cloro-4-fluoro-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)benzamida		( <sup>35</sup> Cl) 465,0 (M+1)

El hedgehog ha sido implicado como un factor de supervivencia para los cánceres siguientes: carcinoma de célula basal; cánceres del tracto gastrointestinal superior (esófago, estómago, páncreas, y tracto biliar); cáncer de próstata; cáncer de mama; cáncer de pulmón de célula pequeña; cáncer de pulmón de célula no pequeña; linfoma de célula  $\beta$ ; mieloma múltiple, cáncer gástrico; cáncer colorectal; cáncer de hígado, melanoma; cáncer de cabeza y cuello; mesotelioma; sarcomas de tejido blando; sarcomas de hueso; leucemia; cáncer testicular; cáncer de riñón; y cáncer de cerebro.

Se ha asegurado que LOS elementos de la vía hedgehog son dianas potenciales para fármacos para el tratamiento de cánceres. Una línea de células Daoy establecida a partir de tumor de meduloblastoma (ATCC, HTB-186), es responsable de ligandos Hh. Cuando estas células son tratadas con medios acondicionados de Shh agregados exógenamente, la vía señal Hh se activa y da como resultado una expresión incrementada de *Gli1*. La ciclopamina, un alcaloide aislado a partir del maíz lirio *Veratrum californicum* es un antagonista de hedgehog débil y se ha mostrado que suprime la expresión de *Gli1* en respuesta a la estimulación de Shh. Recientes observaciones sugieren que la ciclopamina inhibe el crecimiento de células de meduloblastomas y aloinjertos cultivados. Usando este sistema de modelo de célula Daoy, pueden identificarse potentes inhibidores de las vías de señal hedgehog. Puesto que los compuestos de la presente invención son antagonistas de hedgehog, son adecuados para el tratamiento de los tipos de tumores anteriormente mencionados.

#### Determinación de la actividad biológica IC<sub>50</sub>: Ensayo funcional para la medición de la inhibición de *Gli1* en células Daoy

El protocolo de ensayo siguiente y los resultados del mismo demuestran adicionalmente la utilidad y eficacia de los compuestos y procedimientos de la presente invención. Los ensayos funcionales proporcionan el soporte de que los compuestos de la presente invención muestran la capacidad para inhibir la señal Shh. Todos los ligandos, disolventes, y reactivos usados en el ensayo siguiente están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales o pueden prepararse fácilmente por un experto en la técnica.

La actividad biológica se determina usando un ensayo funcional en células de cáncer neuronales Daoy y mide los niveles de ácido nucleico *Gli1* mediante un sistema de ensayo de ADNb (ácido desoxiribonucleico ramificado) (Panomics, Inc., Fremont, CA). La *Gli* fue originalmente descubierta en una línea de células de glioblastoma y codifica una proteína huella de cinc que es activada por la señal Shh. La respuesta máxima se obtiene mediante la inducción de la transcripción de *Gli1* en las células Daoy con medio acondicionado (Shh recombinante que expresa de manera estable células HEK-293, de riñón embrionario humano) durante 24 horas y, a continuación, medición de la cantidad de transcritos *Gli1* estimulado. La respuesta mínima es la cantidad de transcritos *Gli1* inhibido con un compuesto de control en células Daoy que han sido estimuladas con medio acondicionado (Shh recombinante que expresa de manera estable células HEK-293, de riñón embrionario humano) durante 24 horas.

El sistema de ensayo ADNb usa la tecnología de ADN de cadena ramificada para permitir la amplificación de un ácido ribonucleico diana (transcrito). La tecnología usa tres tipos de sondas de ADNc específicas de *Gli1* cortas híbridas sintéticas que determinan la especificidad del transcrito diana [extendedores de captura (Ces), extendedores de marcas (Les), y bloqueadores (BLs)] que se hibridan en forma de un complejo con el transcrito diana para amplificar la señal de hibridación. La adición de un substrato quimioluminogénico durante la etapa de amplificación permite la detección usando luminiscencia.

Las células Daoy se desarrollaron hasta confluencia en matraces T225 de cultivo de tejidos en medio de desarrollo Daoy conteniendo Medio Esencial Mínimo (MEM) más 10% de suero bovino fetal (FBS) con aminoácidos no esenciales 0,1 nM y piruvato sódico 1 mM. Las células se retiraron de los matraces T225 usando tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se centrifugaron, se resuspendieron en medio y, a continuación, se contaron.

A continuación, las células Daoy se sembraron a una concentración de 50.000 células por pocillo en medio de desarrollo en placas de cultivo de tejido transparentes de 96 pocillos Costar y se dejaron incubar durante una noche a 37°C bajo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) al 5%. Las células se lavaron una vez en solución tamponada de fosfato (PBS) seguido de la adición de 100  $\mu$ l de Medio Acondicionado de Shh (Shh-CM) para estimular niveles de expresión de *Gli1*. El Shh-CM se diluyó para lograr la máxima estimulación usando medio de desarrollo de control - FBS al 0,1%/DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco). A continuación, las células Daoy tratadas con Shh-CM se trataron con diversas concentraciones de inhibidores de hedgehog que variaron desde aproximadamente 1  $\mu$ M hasta 0,1 nM. Los compuestos de ensayo se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5%.

La medición del transcrito *Gli1* se realizó usando el ensayo *Gli1* Quantigene 2.0 tal como se describe por el fabricante (Panomics, Inc.). Se preparó un tampón de mezcla de lisis diluida (DLM), el cual incluye Proteinasa K. Después de una incubación durante 24 horas con compuesto, las células se lavaron una vez con PBS y se agregaron 180  $\mu$ l de DLM a las células. La placa de células que contenía el tampón de lisis se selló y se dispuso a 55°C durante 30 a 45 minutos. A continuación, los lisatos de células resultantes se trituraron 5 veces. Se preparó un set de sondas de trabajo que contenía sondas *Gli1* diluyendo las sondas en el DLM de acuerdo con las instrucciones del fabricante y, a continuación, se agregaron 20  $\mu$ l del set de sondas de trabajo a las placas de ensayo de ADNb conjuntamente con 80  $\mu$ l de los lisatos de Daoy. Las placas se sellaron y se incubaron durante una noche a 55°C. a continuación, las placas de ADN se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal se cuanti-

ficó leyendo las placas sobre un lector Perkin Elmer Envision que detecta la luminiscencia. La señal luminiscente es directamente proporcional a la cantidad de transcripto diana presente en la muestra.

Los datos de señal luminiscente procedentes del ensayo funcional se usaron para calcular el IC<sub>50</sub> para el ensayo *in vitro*. Los datos se calcularon en base a los valores de control máximos (células Daoy tratadas con Shh-CM) y el valor de control mínimo (células Daoy tratadas con Shh-CM y una concentración inhibitoria de un compuesto de control, 1 μM de N-(3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-clorofenil)-3,5-dimetoxibenzamida). Se usó un ajuste de curva logística de cuatro parámetros para generar los valores IC<sub>50</sub> usando programas de software ActivityBase versión 5.3, equation 205 (Assay Guidance Manual Version 5.0, 2008, Eli Lilly and Company and NIH Chemical Genomics Center).

5 Siguiendo el protocolo descrito, los compuestos ejemplificados en la presente invención mostraron un IC<sub>50</sub> de <40 nM. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1a tiene un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 2,4 nM con un error estándar de 0,5 (n=7, calculado como una media geométrica y error estándar geométrico) en el ensayo descrito anteriormente. Estos resultados proporcionan la evidencia de que los compuestos de la presente invención son potentes antagonistas de hedgehog y, como tales, son útiles como agentes anticáncer.

#### 15 Ensayo de inhibición CYP3A4

Las muestras de incubación se prepararon mediante la adición de una preparación microsomal de hígado humano al inhibidor de ensayo (concentraciones finales 0,05 mg/ml de proteína, inhibidor 10 μM en tampón de NaPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,4) y se mezclaron. Las mezclas se pre-incubaron durante aproximadamente cinco minutos a 37°C. Después del periodo de pre-incubación, la reacción se inició con la adición de una solución que contenía NADPH y midazolam, como el sustrato de la enzima, (concentración final NADPH 1 mM, midazolam 5 μM). Después de la adición de la solución de NADPH, las muestras se incubaron durante 3 minutos a aproximadamente 37°C. Después del periodo de incubación, la reacción se interrumpió mediante la adición de 50 μl de metanol (y un patrón interno para cromatografía) y las muestras se mezclaron bien. Después de la interrupción de la reacción, la mezcla se centrifugó a aproximadamente 4000 rpm durante 15 minutos a aproximadamente 5°C y se analizó mediante análisis LC/MS.

25 Las muestras se analizaron usando HPLC/MS con gradiente de elución sobre columnas C18 convencionales cortas (Fase móvil de carga - 95/5 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/metanol (v/v) con ácido acético al 1%. Fase móvil B - 80/20 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/metanol (v/v) con ácido acético al 1%. Fase móvil C - 5/95 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/metanol (v/v) con ácido acético al 1%. Fase móvil de lavado - 75/25 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/acetonitrilo (v/v)).

30 Las muestras se inyectaron dentro de un Analizador de Espectros de Masa para Monitorización de Iones Seleccionados (SIM) a una masa de 342,1 (1-OH-midazolam) y 346,1 (patrón interno de α-hidroximidazolam-d4) usando Turbolon Spray bajo condiciones positivas. Los datos se reportaron como % de inhibición de la formación de 1-OH-midazolam en la presencia de una concentración de inhibidor de 10 μM.

35 De acuerdo con el protocolo descrito, el Ejemplo 1a muestra un 13,5% de inhibición de CYP3A4. Los compuestos, tales como el del Ejemplo 1a, que demuestran bajo potencial de inhibición de CYP3A4 reversible tienen una probabilidad reducida para acciones negativas con otras medicaciones que podrían dar como resultado cambios de dosificaciones de las medicaciones o una necesidad de interrumpir la medicación en un paciente. De acuerdo con ello, dichos compuestos son deseables y tienen perfiles de seguridad mejorados.

#### Inhibición basada en mecanismos *in vitro* de CYP3A

40 El compuesto del Ejemplo 1a se evaluó como un inhibidor basado en mecanismos de CYP3A con el objetivo de obtener constantes cinéticas de K<sub>inact</sub> y K<sub>i</sub> para esta interacción. (K<sub>inact</sub> es la constante de proporción máxima de formación de complejo de enzima inactiva. K<sub>i</sub> es la concentración a la semi-inactivación máxima). El compuesto se incubó con microsomas de hígado humano (agrupación de microsomas de hígado humano con alta expresión de actividad de CYP3A4) en una incubación *in vitro* de dos fases: una reacción de inactivación, la cual permite al inhibidor inactivar la enzima, y un ensayo de actividad, el cual confirma la actividad remanente de la proteína microsomal usando la 1'-hidroxilación de midazolam como la sonda.

45 Las reacciones de inactivación (100 μl de volumen final) conteniendo tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 7,4), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, en la ausencia o presencia de NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, reducido) 1 mM, con concentraciones comprendidas desde 0,75 μM - 24 μM del compuesto de ensayo, se pre-incubaron durante 3 minutos a 37°C por triplicado. Las reacciones de inactivación se iniciaron con la adición de la agrupación microsomal de alta actividad de CYP3A (CellzDirect, Austin TX, 0,5 mg/ml). En puntos de tiempo múltiples (0, 2,5, 5, 10, y 30 minutos), se extrajeron partes alícuotas de 5 μl de las mezclas de reacción de inactivación y se diluyeron 1/20 en un sistema de incubación de ensayo de actividad de CYP3A4 precalentado (37°C) (95 μl) que contenía NADPH 1 mM y midazolam (100 μM). Esta mezcla de ensayo de actividad, a una concentración de proteína final de 0,025 mg/ml y 1/20 de concentración del inhibidor, se incubó (37°C) durante un tiempo adicional de 1 minuto antes de interrumpir la reacción con la adición de 50 μl de MeOH. Las muestras se mezclaron y la proteína desnaturalizada se separó mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos.

5 La formación de 1'-OH midazolam se analizó mediante LC/MS/MS con un gradiente de elución sobre una columna Hydro-RP de 4  $\mu$  de Phenomenex Synergi (Fase móvil A - 95/5 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/metanol (v/v) con acetato amónico 5 mM. Fase móvil B - 5/95 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/metanol (v/v) con acetato amónico 5 mM, Disolvente de lavado de aguja A - ácido trifluoroacético al 0,4% en 90/10 de acetonitrilo/Milli-Q® H<sub>2</sub>O (v/v), Disolvente de lavado de aguja B - 50/50 de Milli-Q® H<sub>2</sub>O/metanol (v/v)). Las muestras se inyectaron dentro de un Sciex API 4000 para Monitorización de Reacción Seleccionada a una masa de 342,0 (1-OH-midazolam) y 347,0 (patrón interno de  $\alpha$ -hidroximidazolam-d3) usando Turbolon Spray bajo condiciones positivas.

10 La pérdida de formación de 1'-OH midazolam (actividad de CYP3A4) en las incubaciones microsomales se representó como el porcentaje de log de actividad de CYP3A4 remanente como una función del tiempo de pre-incubación para cada concentración de compuesto. Los parámetros cinéticos para la inactivación se determinaron usando Win-Nonlin Professional para ajustar las ecuaciones siguientes a los datos:

$$\text{Ecuación 1: porcentaje de inhibición}_{(t)} = 100_{(t=0)} * e^{(-\lambda t)}$$

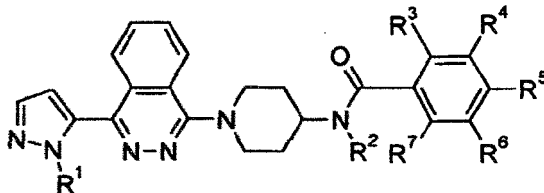
En donde  $\lambda$  se define como

$$\text{Ecuación 2: } \lambda = (k_{\text{inact}} * I)/(K_i + I)$$

15 La pérdida de actividad para el compuesto del Ejemplo 1a varía desde 11% - 22% y no depende de la concentración. Por ello, no pueden determinarse los valores para  $k_{\text{inact}}$  y  $K_i$  a partir de la ecuación 2. En base a estos datos, el compuesto del Ejemplo 1a no es un inhibidor basado en el mecanismo de CYP3A4. Los compuestos, tal como el del Ejemplo 1a, que demuestran un bajo o nulo potencial de inhibición de CYP3A4 irreversible basado en el mecanismo  
20 tienen una probabilidad reducida para interacciones negativas con otras medicaciones que podrían dar como resultado cambios en la dosificación de la medicación o una necesidad de interrumpir la medicación en un paciente. En consecuencia, dichos compuestos son deseables y tienen perfiles de seguridad mejorados.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



en el que:

- 5            R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo;
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o metilo; y R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, fluoro, cloro, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, difluorometoxi, metilsulfonilo, o trifluorometilsulfonilo, a condición de que al menos tres de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> sean hidrógeno; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
- 10          2. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es metilo, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que R<sup>2</sup> es metilo, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, fluoro, cloro, trifluorometilo o metilsulfonilo, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
- 15          5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, fluoro, o trifluorometilo, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que R<sup>4</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son cada uno hidrógeno, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
- 20          7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es 4-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)benzamida, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es hidrocloruro de 4-fluoro-N-metil-N-(1-(4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)ftalazin-1-il)piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)benzamida, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
- 25          9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente.
10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia.
- 30          11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer.
12. Un compuesto o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer es cáncer de cerebro, carcinoma de célula basal, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, linfoma de célula B, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer colorectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas de tejido blando, sarcomas de hueso, leucemia, o cáncer testicular.
- 35