(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 422 557**

(51) Int. CI.:

C07D 413/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2007 E 07761921 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2021328**

(54) Título: **Compuestos y composiciones como moduladores de la ruta Hedgehog**

(30) Prioridad:

05.05.2006 US 797949 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2013

(73) Titular/es:

IRM LLC (100.0%)
HURST HOLME, 12 TROTT ROAD
HAMILTON, HM 11, BM

(72) Inventor/es:

GAO, WENQI;
JIANG, JIQING;
WAN, YONGQIN;
CHENG, DAI;
HAN, DONG;
WU, XU y
PAN, SHIFENG

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Compuestos y composiciones como moduladores de la ruta Hedgehog

Campo de la Invención

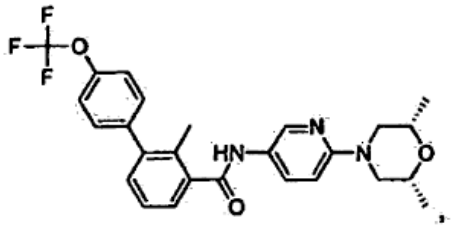
La presente divulgación se refiere a un método para modular la actividad de la ruta de señalización Hedgehog. En particular, se describe un método para inhibir estados de crecimiento aberrantes resultantes de fenotipos tales como pérdida de función de Ptc, ganancia de función de Hedgehog, ganancia de función de Smoothened o ganancia de función de Gli, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad suficiente del compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida).

Antecedentes de la Invención

Durante el desarrollo embrionario, la ruta de señalización Hedgehog es esencial para numerosos procesos tales como el control de la proliferación celular, la diferenciación y el diseño tisular. Sin embargo, la actividad aberrante de la ruta de señalización Hedgehog, por ejemplo, como resultado de una activación potenciada, puede tener consecuencias patológicas. A este respecto, la activación de la ruta Hedgehog en tejidos adultos puede dar como resultado tipos específicos de cáncer que incluyen, pero no se limitan a, cánceres de cerebro, músculo y piel, próstata, meduloblastoma, adenocarcinomas pancreáticos y carcinomas de pulmón microcíticos. La activación potenciada de la ruta de señalización Hedgehog contribuye a la patología y/o la sintomatología de un número de enfermedades. Según esto, las moléculas que modulan la actividad de la ruta de señalización Hedgehog son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales enfermedades.

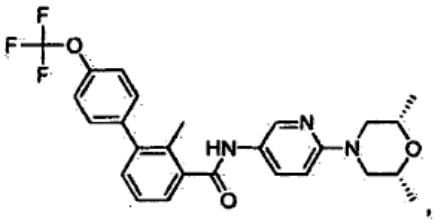
Compendio de la Invención

En un aspecto, la presente invención proporciona el compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



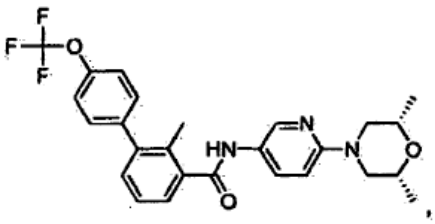
o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



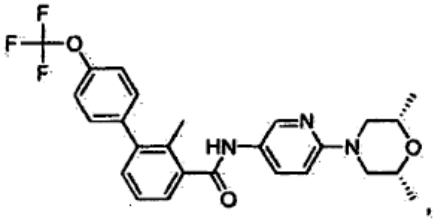
en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi) bifenil-3-carboxamida de fórmula:



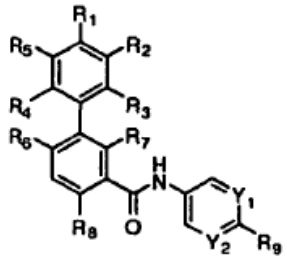
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más agentes terapéuticos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la utilización en el tratamiento de cáncer de páncreas, cáncer de próstata, meduloblastoma, carcinoma de células basales y cáncer de pulmón microcítico.

La presente divulgación describe los compuestos de Fórmula I:



I

en la que

Y_1 e Y_2 se seleccionan independientemente de N y CR_{10}; en donde R_{10} se selecciona de hidrógeno, halo, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-6}, alcoxi C_{1-4} sustituido con halo y -$OXNR_{10a}R_{10b}$; en donde R_{10a} y R_{10b} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4};

R_1 se selecciona de ciano, halo, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-4} sustituido con halo, alcoxi C_{1-6}, alcoxi C_{1-6} sustituido con halo, arilo C_{6-10}, dimetilamino, alquil(C_{1-6})-sulfanilo y heterocicloalquilo C_{3-8} opcionalmente sustituido con hasta 2 radicales alquilo C_{1-6};

R_2 y R_5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, ciano, halo, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-4}, alcoxi C_{1-6} sustituido con halo y dimetilamino;

R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, ciano, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} y alcoxi C_{1-6} sustituido con halo; o bien R_1 y R_2 o R_1 y R_5 junto con el fenilo al que están ambos unidos forman heteroarilo C_{5-10};

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-4} y alcoxi C_{1-6} sustituido con halo; con la condición de que R_6 y R_7 no sean ambos hidrógeno;

R_8 se selecciona de halo, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} y alcoxi C_{1-6} sustituido con halo;

R_9 se selecciona de $-S(O)_2R_{11}$, $-C(O)R_{11}$, $-OR_{11}$, $-NR_{12a}R_{12b}$ y $-R_{11}$; en donde R_{11} se selecciona de arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo; R_{12a} y R_{12b} se seleccionan independientemente de alquilo C_{1-6} y alquilo C_{1-6} sustituido con hidroxi;

en donde dicho arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo de R_9 puede estar opcionalmente sustituido con de 1 a 3 radicales seleccionados independientemente de alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-6}, alcoxi C_{1-6} sustituido con halo, aril(C_{6-10})-alquilo(C_{0-4}), heteroaril(C_{5-10})-alquilo(C_{0-4}), cicloalquilo C_{3-12} y heterocicloalquilo C_{3-8};

en donde dicho sustituyente arilalquilo de R_9 está opcionalmente sustituido con de 1 a 3 radicales seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6} sustituido con halo, alcoxi C_{1-6}, alcoxi C_{1-6} sustituido con halo, y metilpiperacinilo; y los derivados de N-óxido, los derivados de profármaco, los derivados protegidos, los isómeros individuales y una mezcla de isómeros de los mismos; y las sales y solvatos (p. ej. los hidratos) farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

También se describe una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula I o un derivado de N-óxido, isómeros individuales y una mezcla de isómeros del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, mezclados con uno o más excipientes adecuados.

También se describe un método para tratar una enfermedad en un animal en el que la modulación de la actividad de la ruta Hedgehog puede evitar, inhibir o mejorar la patología y/o la sintomatología de las enfermedades, método que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o un derivado de N-óxido, isómeros individuales y una mezcla de isómeros del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se divulga la utilización de un compuesto de fórmula I en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un animal en el que la actividad de la ruta Hedgehog contribuye a la patología y/o la sintomatología de la enfermedad.

También se divulga un procedimiento para preparar compuestos de fórmula I y los derivados de N-óxido, los derivados de profármaco, los derivados protegidos, los isómeros individuales y una mezcla de isómeros de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Definiciones

"Alquilo" como un grupo y como un elemento estructural de otros grupos, por ejemplo alquilo sustituido con halo y alcoxi, puede ser bien de cadena lineal o bien ramificado. El alcoxi C_{1-4} incluye metoxi, etoxi y similares. El alquilo sustituido con halo incluye trifluorometilo, pentafluoroetilo y similares.

"Arilo" significa un conjunto anular aromático monocíclico o bicíclico condensado que contiene de seis a diez átomos de carbono. Por ejemplo, el arilo puede ser fenilo o naftilo, preferiblemente fenilo. "Arileno" significa un radical divalente derivado de un grupo arilo.

"Heteroarilo" es como se define para arilo anteriormente, donde uno o más de los miembros del anillo es un heteroátomo. Por ejemplo, heteroarilo C_{5-10} es un mínimo de 5 miembros que están indicados por los átomos de carbono, pero estos átomos de carbono se pueden reemplazar por un heteroátomo. Por consiguiente, el heteroarilo C_{5-10} incluye piridilo, indolilo, indazolilo, quinoxalinilo, quinolinilo, benzofuranilo, benzopiranilo, benzotiopiranilo, benzo[1,3]dioxol, imidazolilo, benzoimidazolilo, pirimidinilo, furanilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, tienilo, etc.

"Cicloalquilo" significa un conjunto anular monocíclico, bicíclico condensado o policíclico con puente, saturado o parcialmente insaturado, que contiene el número de átomos de anillo indicado. Por ejemplo, el cicloalquilo C_{3-10} incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

"Heterocicloalquilo" significa cicloalquilo, según se define en esta solicitud, con tal de que uno o más de los carbonos de anillo indicados se reemplace por un resto seleccionado de -O-, -N=, -NR-, -C(O)-, -S-, -S(O)- o $-S(O)_2-$, en donde R es hidrógeno, alquilo C_{1-4} o un grupo protector de nitrógeno. Por ejemplo, heterocicloalquilo C_{3-8}, según se utiliza en esta solicitud para describir los compuestos de la invención, incluye morfolino, pirrolidinilo, pirrolidinil-2-ona, piperacinilo, piperidinilo, piperidinilona, 1,4-dioxa-8-aza-espiro[4,5]dec-8-ilo, tiomorfolino, sulfanomorfolino, sulfonomorfolino, etc.

"Halógeno" (o halo) representa preferiblemente cloro o fluoro, pero también puede ser bromo o yodo.

"Ganancia de función de Hedgehog" se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Ptc, un gen

Hedgehog o un gen Smoothened, o una disminución (o pérdida) en el nivel de expresión de tal gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a poner en contacto una célula con una proteína Hedgehog, p. ej., activación aberrante de una ruta Hedgehog. La ganancia de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto del gen Ptc para regular el nivel de expresión de genes Gli, p. ej., Gli1, Gli2 y Gli3. El término 'ganancia de función de Hedgehog' también se utiliza en la presente memoria para referirse a cualquier fenotipo celular similar (p. ej., exhibir proliferación en exceso) que se produce debido a una alteración en cualquier parte de la ruta de transducción de señales Hedgehog, incluyendo, pero no limitada a, una modificación o mutación del propio Hedgehog. Por ejemplo, una célula tumoral con una velocidad de proliferación anormalmente alta debido a la activación de la ruta de señalización Hedgehog tendría un fenotipo de 'ganancia de función de Hedgehog', incluso si Hedgehog no está mutado en esa célula.

"Pérdida de función de Patched" se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Ptc, o un nivel de expresión del gen disminuido, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a poner en contacto una célula con una proteína Hedgehog, p. ej., activación aberrante de una ruta Hedgehog. La pérdida de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto del gen Ptc para regular el nivel de expresión de genes Gli, p. ej., Gli1, Gli2 y Gli3.

"Ganancia de función de Gli" se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Gli, o un nivel incrementado de expresión del gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a poner en contacto una célula con una proteína Hedgehog, p. ej., activación aberrante de una ruta Hedgehog.

"Ganancia de función de Smoothened" se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Smo, o un nivel incrementado de expresión del gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a poner en contacto una célula con una proteína Hedgehog, p. ej., activación aberrante de una ruta Hedgehog.

"Tratar", "tratando" y "tratamiento" se refiere a un método para aliviar o suprimir una enfermedad y/o sus síntomas concomitantes.

La presente divulgación se refiere al descubrimiento de que las rutas de transducción de señales reguladas por Hedgehog, Patched (Ptc), gli y/o Smoothened se pueden modular mediante compuestos de fórmula I. El compuesto según la presente invención es N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

Por lo tanto, se contempla específicamente que los compuestos de fórmula I que interfieren con aspectos de la actividad de transducción de señales de Hedgehog, Ptc o Smoothened serán asimismo capaces de inhibir la proliferación (u otra consecuencias biológicas) en células normales y/o células que tienen un fenotipo de pérdida de función de Patched, un fenotipo de ganancia de función de Hedgehog, un fenotipo de ganancia de función de Smoothened o un fenotipo de ganancia de función de Gli. Así, se contempla que estos compuestos pueden ser útiles para inhibir la actividad de Hedgehog en células normales, p. ej., que no tienen una mutación genética que active la ruta Hedgehog. Según la presente divulgación, los compuestos son capaces de inhibir al menos alguna de las actividades biológicas de proteínas Hedgehog, preferiblemente de forma específica en células diana. Así, la presente divulgación describe la utilización de compuestos de fórmula I que agonizan la inhibición por Ptc de la señalización Hedgehog, tal como inhibiendo la activación de componentes de Smoothened o aguas abajo de la ruta de señalización, en la regulación de la reparación y/o el comportamiento funcional de una amplia gama de células, incluyendo células normales, tejidos y órganos, así como los que tienen el fenotipo de pérdida de función de Ptc, ganancia de función de Hedgehog, ganancia de función de Smotheened o ganancia de función de Gli. Por ejemplo, la presente divulgación describe un método en cuestión que tiene aplicaciones terapéuticas y cosméticas que varían de la regulación de tejidos neurales, la formación y reparación de huesos y cartílagos, la regulación de la espermatogénesis, la regulación del músculo liso, la regulación del pulmón, el hígado y otros órganos que proceden del intestino primitivo, la regulación de la función hematopoyética, la regulación del crecimiento de la piel y el cabello, etc. Por otra parte, los métodos en cuestión se pueden llevar a cabo sobre células que se proporcionan en cultivo (in vitro) o sobre células en un animal entero (in vivo).

La presente divulgación describe una utilización para tratar células epiteliales que tienen un fenotipo de pérdida de función de Ptc, ganancia de función de Hedgehog, ganancia de función de Smoothened o ganancia de función de Gli. Por ejemplo, el método en cuestión se puede utilizar para tratar o prevenir el carcinoma de células basales u otros trastornos relacionados con la ruta Hedgehog.

Un compuesto de fórmula I puede inhibir la activación de una ruta Hedgehog uniéndose a Smoothened o sus proteínas aguas abajo. Un antagonista en cuestión puede inhibir la activación de una ruta Hedgehog uniéndose a Patched.

La utilización puede ser parte de un régimen de tratamiento para meduloblastomas malignos y otros tumores neuroectodérmicos malignos primarios del SNC.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden, como un ingrediente activo, un modulador de la señalización Hedgehog tal como un compuesto de fórmula I, un agonista de Ptc, un antagonista de Smoothened o un antagonista de proteínas de la ruta Hedgehog agua abajo tal como se describe en la presente memoria, formulado en una cantidad suficiente para inhibir, in vivo, la proliferación u otras consecuencias biológicas de la pérdida de función de Ptc, la ganancia de función de Hedgehog, la ganancia de función de Smoothened o la ganancia de función de Gli.

Los tratamientos en cuestión que utilizan un compuesto de fórmula I, agonistas de Patched, antagonistas de Smoothened o antagonistas de proteínas de la ruta Hedgehog aguas abajo pueden ser eficaces para sujetos tanto humanos como animales. Sujetos animales a los que es aplicable la invención se extienden tanto a animales domésticos como a ganado, criados bien como mascotas o con propósitos comerciales. Ejemplos son perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos y cabras.

Farmacología y Utilidad

La presente divulgación describe métodos y compuestos para inhibir la activación de la ruta de señalización Hedgehog, p. ej., para inhibir estados de crecimiento aberrantes resultantes de fenotipos tales como pérdida de función de Ptc, ganancia de función de Hedgehog, ganancia de función de Smoothened o ganancia de función de Gli, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto de fórmula I, en una cantidad suficiente para agonizar una actividad de Ptc normal, antagonizar una actividad de Hedgehog normal, antagonizar la actividad de Smoothened o antagonizar la actividad de Gli p. ej., para invertir o controlar el estado de crecimiento aberrante.

Miembros de la familia Hedgehog de moléculas de señalización median en muchos procesos de formación de patrones a corto y largo plazo durante el desarrollo de los vertebrados. La formación de patrones es la actividad por la que las células embrionarias forman disposiciones espaciales ordenadas de tejidos diferenciados. La complejidad física de los organismos superiores surge durante la embriogénesis a través del efecto recíproco del linaje intrínseco a la célula y la señalización extrínseca a la célula. Las interacciones inductivas son esenciales para la formación de patrones embrionarios en el desarrollo de vertebrados desde el establecimiento más temprano del modelo corporal, a la formación de patrones de los sistemas orgánicos, a la generación de diversos tipos de células durante la diferenciación de tejidos. Los efectos de las interacciones celulares del desarrollo son variados: las células sensibles se desvían desde una ruta de diferenciación celular a otra al inducir células que difieren de los estados tanto no inducido como inducido de las células sensibles (inducciones). A veces, las células inducen a sus vecinas a diferenciarse como ellas mismas (inducción homeogenética); en otros casos una célula inhibe a sus vecinas de diferenciarse como ella misma. Las interacciones celulares en el desarrollo temprano pueden ser secuenciales, de modo que una inducción inicial entre dos tipos de células conduce a una amplificación progresiva de la diversidad. Por otra parte, se producen interacciones inductivas no solo en embriones, sino también en células adultas, y pueden actuar para establecer y mantener patrones morfogenéticos así como inducir la diferenciación.

La familia de genes Hedgehog de vertebrados incluye tres miembros que existen en mamíferos, conocidos como Hedgehogs Desert (Dhh), Sonic (Shh) e Indian (Ihh), todos los cuales codifican proteínas secretadas. Estas diversas proteínas Hedgehog consisten en un péptido de señal, una región N-terminal altamente conservada y un dominio C-terminal más divergente. Estudios bioquímicos han mostrado que la escisión autoproteolítica de la proteína precursora Hh avanza a través de un producto intermedio de tioéster interno que posteriormente se escinde en una sustitución nucleófila. Es probable que el nucleófilo sea una molécula lipófila pequeña que se une covalentemente al extremo C-terminal del N-péptido, ligándolo a la superficie celular. Las implicaciones biológicas son profundas. Como resultado de la ligadura, se genera una alta concentración local de péptido Hedgehog N-terminal sobre la superficie de las células productoras de Hedgehog. Es este péptido N-terminal el que es tanto necesario como suficiente para actividades de señalización Hedgehog a corto y largo plazo.

Una ruta de señalización Hedgehog inactiva es cuando el receptor de proteína de transmembrana Patched (Ptc) inhibe la actividad de Smoothened (Smo), una proteína de siete transmembranas. Se evita que el factor de transcripción Gli, un componente aguas abajo de la señalización Hh, entre en el núcleo a través de interacciones con proteínas citoplásmicas, incluyendo Fused y Supresor de Fused (Sufu). Como consecuencia, se reprime la activación transcripcional de genes diana Hedgehog. La activación de la ruta se inicia a través de la unión de cualquiera de los tres ligandos de mamífero (Dhh, Shh o Ihh) a Ptc. La unión del ligando da como resultado una inversión de la represión de Smo, activando de ese modo una cascada que conduce a la translocación de la forma activa del factor de transcripción Gli al núcleo. El Gli nuclear activa la expresión del gen diana, incluyendo Ptc y el propio Gli.

Niveles incrementados de señalización Hedgehog son suficientes para iniciar la formación de cáncer y se requieren para la supervivencia del tumor. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata ("Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis", Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA., Nature. 7 oct. 2004; 431(7009):707-12; "Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling", Sánchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A., Proc Natl Acad Sci U S

A. 24 ag. 2004; 101(34):13561-6), cáncer de mama ("Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer", Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M., Cancer Res. 1 sep. 2004; 64(17):6071-4), meduloblastoma ("Medulloblastoma growth inhibition by Hedgehog pathway blockade", Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA., Science. 30 ag. 2002; 297(5586):1559-61), carcinoma de células basales ("Identification of a small molecule inhibitor of the Hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions", Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, Xu Y, Chai L, Wichterle H, Kon C, Gatchalian C, Porter JA, Rubin LL, Wang FY., Proc Natl Acad Sci U S A. 15 abr. 2003; 100(8):4616-21; "Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma", Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ., Nature. 1 en. 1998; 391 (6662):90-3), cáncer de páncreas ("Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis", Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M., Nature. 23 oct. 2003; 425(6960):851-6; "Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours", Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA., Nature. 23 oct. 2003; 425(6960):846-51) y cáncer de pulmón microcítico ("Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer", Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB., Nature. 20 mar. 2003; 422(6929):313-7).

Según lo precedente, la presente invención proporciona además un método para prevenir o tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos anteriormente en un sujeto que necesite tal tratamiento, método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz (véase "Administración y Composiciones Farmacéuticas", posteriormente) de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Para cualquiera de las utilizaciones anteriores, la dosificación requerida variará dependiendo del modo de administración, la afección particular que se vaya a tratar y el efecto deseado.

Administración y Composiciones Farmacéuticas:

En general, los compuestos de la invención se administrarán en cantidades terapéuticamente eficaces a través de cualquiera de los modos habituales y aceptables conocidos en la técnica, bien individualmente o bien en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad, la edad y la salud relativa del paciente, la potencia del compuesto utilizado y otros factores. En general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios sistémicamente con dosificaciones diarias de aproximadamente 0,03 a 2,5 mg/kg de peso corporal. Una dosificación diaria indicada en un mamífero superior, p. ej. seres humanos, está en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg, convenientemente administrada, p. ej. en dosis divididas hasta cuatro veces al día o en forma retardada. Formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración oral comprenden de alrededor de 1 a 50 mg de ingrediente activo.

Los compuestos de la invención se pueden administrar como composiciones farmacéuticas mediante cualquier vía convencional, en particular enteralmente, p. ej., oralmente, p. ej., en forma de comprimidos o cápsulas, o parenteralmente, p. ej., en forma de soluciones o suspensiones inyectables, tópicamente, p. ej., en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en una forma nasal o de supositorio. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se pueden fabricar de manera convencional mediante métodos de mezcladura, granulación o revestimiento. Por ejemplo, las composiciones orales pueden ser comprimidos o cápsulas de gelatina que comprenden el ingrediente activo junto con a) diluyentes, p. ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina; b) lubricantes, p. ej., sílice, talco, ácido esteárico, su sal magnésica o cálcica y/o polietilenglicol; para comprimidos también c) aglutinantes, p. ej., silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona; si se desea d) desintegrantes, p. ej., almidones, agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y/o e) absorbentes, colorantes, aromas y edulcorantes. Las composiciones inyectables pueden ser soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se pueden preparar a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones se pueden esterilizar y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Formulaciones adecuadas para aplicaciones transdérmicas incluyen una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención con un vehículo. Un vehículo puede incluir disolventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del paciente. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en forma de un vendaje que comprende un miembro de soporte, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de control de la velocidad para aportar el compuesto a la piel del paciente a una velocidad controlada y predeterminada a lo largo de un período de tiempo prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel. También se pueden utilizar formulaciones transdérmicas de matriz. Las formulaciones adecuadas para la aplicación tópica, p. ej., a la piel y los ojos, son preferiblemente soluciones acuosas, pomadas, cremas o geles bien conocidos en la técnica. Estos pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes

potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

Los compuestos de la invención se pueden administrar en cantidades terapéuticamente eficaces en combinación con uno o más agentes terapéuticos (combinaciones farmacéuticas). Por ejemplo, se pueden producir efectos sinérgicos con sustancias inmunomoduladoras o antiinflamatorias u otros agentes antitumorales. Cuando los compuestos de la invención se administran junto con otras terapias, las dosificaciones de los compuestos coadministrados variarán por supuesto dependiendo del tipo de cofármaco empleado, del fármaco específico empleado, de la afección que se esté tratando, etc.

La invención también proporciona combinaciones farmacéuticas, p. ej. un estuche, que comprenden a) un primer agente que es un compuesto de la invención según se reivindica en la presente memoria, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y b) al menos un coagente. El estuche puede comprender instrucciones para su administración.

Los términos "coadministración" o "administración combinada" o similares, según se utilizan en la presente memoria, están destinados a abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un solo paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente mediante la misma vía de administración o al mismo tiempo.

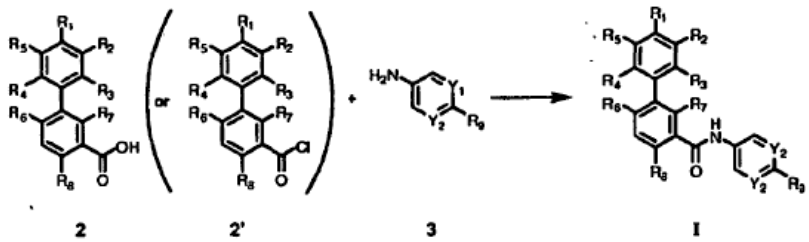
El término "combinación farmacéutica", según se utiliza en la presente memoria, significa un producto que resulta de la mezcladura o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones de los ingredientes activos tanto fijadas como no fijadas. El término "combinación fijada" significa que los ingredientes activos, p. ej. un compuesto de la invención y un coagente, se administran ambos a un paciente simultáneamente en la forma de una sola entidad o dosificación. El término "combinación no fijada" significa que los ingredientes activos, p. ej. un compuesto de la invención y un coagente, se administran ambos a un paciente como entidades separadas bien simultáneamente, bien concurrentemente o bien secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en donde tal administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los 2 compuestos en el cuerpo del paciente. Lo último también se aplica a la terapia de cócteles, p. ej. la administración de 3 o más ingredientes activos.

Procedimientos para Elaborar Compuestos de Fórmula I

La presente invención también incluye procedimientos para la preparación de compuestos de fórmula I. En las reacciones descritas, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxi, amino, imino, tio o carboxi, cuando estos se deseen en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Se pueden utilizar grupos protectores convencionales según la práctica estándar, por ejemplo, véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 1991.

Los compuestos de fórmula I se pueden preparar procediendo como en el siguiente Esquema de Reacción I:

Esquema de Reacción I:



en el que Y_1, Y_2, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8 y R_9 son como se definieron anteriormente para la Fórmula I. Un compuesto de fórmula I se puede preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 2 (o 2') con un compuesto de fórmula 3 en presencia de un disolvente adecuado (p. ej., diclorometano, N,N-dimetilformida o similares), en un intervalo de temperatura de aproximadamente -20 a aproximadamente 100°C. La reacción puede llevar hasta aproximadamente 20 horas hasta completarse.

Ejemplos detallados de la síntesis de compuestos de fórmula I se pueden encontrar en los Ejemplos, posteriormente.

Procedimientos Adicionales para Elaborar Compuestos de la Invención

Un compuesto de la invención se puede preparar como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable

haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, se puede preparar un sal de adición de base farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención haciendo reaccionar la forma de ácido libre del compuesto con una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable.

Alternativamente, las formas de sal de los compuestos de la invención se pueden preparar utilizando sales de los materiales de partida o los productos intermedios.

Las formas de ácido libre o base libre de los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de la correspondiente forma de sal de adición de base o sal de adición de ácido, respectivamente. Por ejemplo, un compuesto de la invención en una forma de sal de adición de ácido se puede convertir en la correspondiente base libre tratando con una base adecuada (p. ej., solución de hidróxido amónico, hidróxido sódico y similares). Un compuesto de la invención en una forma de sal de adición de base se puede convertir en el correspondiente ácido libre tratando con un ácido adecuado (p. ej., ácido clorhídrico, etc.).

Se pueden preparar compuestos de la invención en forma no oxidada a partir de N-óxidos de compuestos de la invención tratando con un agente reductor (p. ej., azufre, dióxido de azufre, trifenilfosfina, borohidruro de litio, borohidruro sódico, tricloruro, tribromuro de fósforo, o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (p. ej. acetonitrilo, etanol, dioxano acuoso, o similares) a de 0 a 80°C.

Se pueden preparar derivados de profármaco de los compuestos de la invención mediante métodos conocidos por los expertos normales en la técnica (p. ej., para detalles adicionales, véase Saulnier et ál., (1994), Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Vol. 4, p. 1985). Por ejemplo, se pueden preparar profármacos apropiados haciendo reaccionar un compuesto de la invención no derivado con un agente de carbamilación adecuado (p. ej., carbanocloridato de 1,1-aciloxialquilo, carbonato de para-nitrofenilo, o similares).

Se pueden elaborar derivados protegidos de los compuestos de la invención por medios conocidos por los expertos normales en la técnica. Una descripción detallada de técnicas aplicables a la creación de grupos protectores y su retirada se puede encontrar en T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry", 3ª edición, John Wiley and Sons, Inc., 1999.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar convenientemente, o formarse durante el procedimiento de la invención, como solvatos (p. ej., hidratos). Se pueden preparar convenientemente hidratos de compuestos de la presente invención mediante recristalización en una mezcla de disolventes acuosos/orgánicos, utilizando disolventes orgánicos tales como dioxina, tetrahidrofurano o metanol.

Se pueden preparar compuestos de la invención como sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisómeros, separando los diastereoisómeros y recuperando los enantiómeros ópticamente puros. Aunque la resolución de enantiómeros se puede llevar a cabo utilizando derivados diastereoisómeros covalentes de los compuestos de la invención, se prefieren complejos disociables (p. ej., sales diastereoisómeras cristalinas). Los diastereoisómeros tienen distintas propiedades físicas (p. ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.) y se pueden separar fácilmente beneficiándose de tales diferencias. Los diastereoisómeros se pueden separar mediante cromatografía, o, preferiblemente, mediante técnicas de separación/resolución basadas en las diferencias de solubilidad. El enantiómero ópticamente puro se recupera a continuación, junto con el agente de resolución, por cualquier medio práctico que no dé como resultado la racemización. Una descripción más detallada de las técnicas aplicables a la resolución de estereoisómeros de los compuestos a partir de su mezcla racémica se puede encontrar en Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley And Sons, Inc., 1981.

En resumen, los compuestos de fórmula I se pueden elaborar mediante un procedimiento que implica:

(a) los del esquema de reacción I; y

(b) opcionalmente convertir un compuesto de la invención en una sal farmacéuticamente aceptable;

(c) opcionalmente convertir una forma de sal de un compuesto de la invención en una forma no salina;

(d) opcionalmente convertir una forma no oxidada de un compuesto de la invención en un N-óxido farmacéuticamente aceptable;

(e) opcionalmente convertir un N-óxido de un compuesto de la invención en su forma no oxidada;

(f) opcionalmente resolver un isómero individual de un compuesto de la invención a partir de una mezcla de

isómeros;

(g) opcionalmente convertir un compuesto de la invención no derivado en un derivado de profármaco farmacéuticamente aceptable; y

(h) opcionalmente convertir un derivado de profármaco de un compuesto de la invención en su forma no derivada.

En tanto que la producción de los materiales de partida no se describe particularmente, los compuestos se conocen o se pueden preparar análogamente a métodos conocidos en la técnica o como los divulgados en los Ejemplos posteriores.

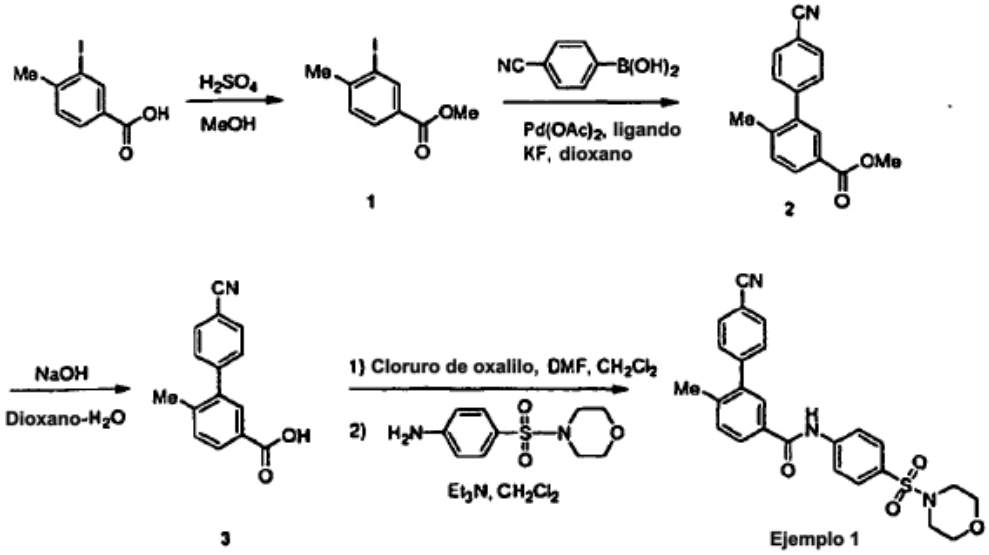
Un experto en la técnica apreciará que las transformaciones anteriores solo son representativas de métodos para la preparación de los compuestos de la presente invención, y que se pueden utilizar de forma similar otros métodos muy conocidos.

Ejemplos

El siguiente ejemplo ilustra la preparación de compuestos de fórmula I.

Ejemplo de Referencia 1

[4-(morfolino-4-sulfonil)-fenil]-amida de ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico



Etapa 1: Se añade ácido sulfúrico concentrado (0,5 ml) a una solución de ácido 3-yodo-4-metil-benzoico (10,0 g, 38,2 mmol) en metanol (70 ml). La mezcla de reacción se calienta a 70°C durante 48 horas, se enfría hasta temperatura ambiente normal y a continuación se concentra. Después de eso, se añaden al residuo acetato de etilo (100 ml) y solución acuosa de $NaHCO_3$ (saturada, 100 ml). La capa orgánica se separa y se lava de nuevo con solución acuosa de $NaHCO_3$ (saturada, 100 ml). La capa orgánica se separa, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentra para dar éster metílico de ácido 3-yodo-4-metil-benzoico 1. Se utiliza sin purificación adicional en la siguiente etapa. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,31 (s, 1 H), 7,87 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 7,48 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 3,85 (s, 3 H), 3,35 (s, 3H); LC-MS m/z: 277,0 (M+1).

Etapa 2: Se añade 1,4-dioxano anhidro (15 ml) a un matraz de fondo redondo que contiene éster metílico de ácido 3-yodo-4-metilbenzoico (1,38 g, 5,00 mmol), ácido 4-cianofenilborónico (1,10 g, 7,48 mmol), acetato de paladio (168 mg, 0,748 mmol), 2-(diciclohexilfosfino)bifenilo (0,526 g, 1,50 mmol) y fluoruro potásico (0,870 g, 15,0 mmol). El matraz se purga con argón y se sella. La mezcla se agita a 130°C durante 18 horas, se enfría hasta temperatura ambiente y a continuación se añaden agua (20 ml) y acetato de etilo (20 ml). El sólido se retira bajo filtración a vacío. El filtrado se extrae con EtOAc (20 ml x 2). Las capas orgánicas se combinan, se lavan con HCl acuoso (5%, 20 ml) y $NaHCO_3$ saturado (20 ml). Se seca sobre $MgSO_4$ y se concentra. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc/hexano, gradiente) para dar éster metílico de ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-

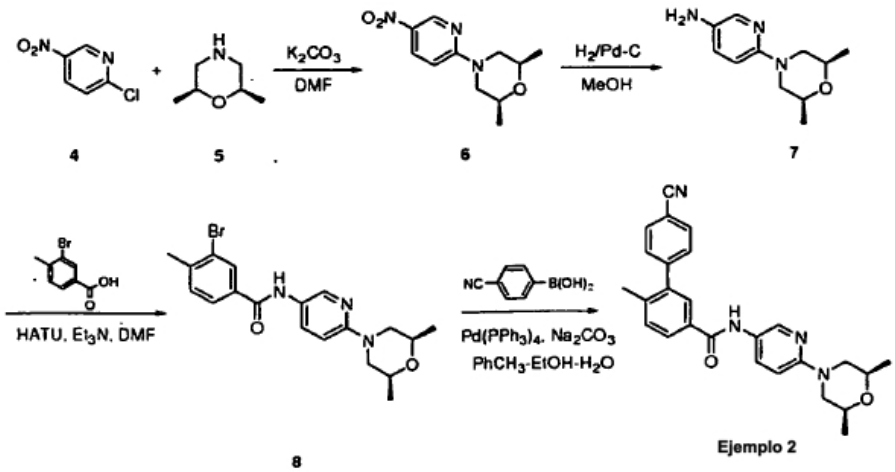
carboxílico 2; LC-MS m/z: 252,1 (M+1).

Etapa 3: Se añade NaOH (1,22 g, 30,2 mmol) a una solución de éster metílico de ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 2 (2,56 g, 10,3 mmol) en 1,4-dioxano-H_2O (mezcla 1:1, 20 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añade a esta mezcla HCl acuoso (1 N, 36 ml) y a continuación se extrae con acetato de etilo (40 ml x 3). Las capas orgánicas se combinan, se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se retira. El sólido obtenido se lava con una pequeña cantidad de acetonitrilo y se seca al aire para dar ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 3: ^{1}H NMR (DMSO-d_6) 8 7,94 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,84 (dd, 1 H, J1 = 8,4 Hz, J2 = 1,2 Hz), 7,75 (d, 1 H, J = 1,2 Hz), 7,61 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,48 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 2,29 (s, 3 H); LC-MS m/z 238,1 (M+1).

Etapa 4: Se añaden 2 gotas de DMF a una suspensión de ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 3 (40 mg, 0,17 mmol) en cloruro de metileno anhidro (5 ml). A continuación, se añade cloruro de oxalilo (32 mg, 22 µl, 0,25 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se vuelve transparente. Después de eso, se concentra, se redisuelve en cloruro de metileno anhidro (3 ml) y se añade a una solución de 4-(morfolino-4-sulfonil)-fenilamina (61 mg, 0,25 mmol) y trietilamina (34 mg, 47 µl, 0,33 mmol) en cloruro de metileno (2 ml). La mezcla se agita durante 2 horas, se concentra y el residuo se purifica mediante HPLC de masas preparativa activada (columna C_{18}, eluida con CH_3CN-H_2O que contiene TFA al 0,05%) para dar [4-(morfolino-4-sulfonil)-fenil]-amida de ácido 4'-ciano-6-metilbifenil-3-carboxílico: ^{1}H NMR (DMSO-d_6) 8 10,64 (s, 1 H), 8,07(d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,97 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,95 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 7,89 (s, 1 H), 7,43 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,67 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,53 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 3,63 (m, 4 H), 2,84 (m, 4 H) 2,32 (s, 3 H); LC-MS m/z: 462,1 (M+1).

Ejemplo de Referencia 2

[6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-il]-amida de ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico



Etapa 1: Se añade K_2CO_3 (4,14 g, 30 mmol) a una solución de 2-cloro-5-nitro-piridina 4 (2,38 g, 15 mmol) y *cis*-2,6-dimetilmorfolina (1,73 g, 15 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante la noche. Después de la concentración, el residuo se reparte entre EtOAc y agua. La capa de EtOAc se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentra para dar un producto 6 bruto como un sólido amarillo. El producto bruto se utiliza directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS m/z: 238,1 (M+1).

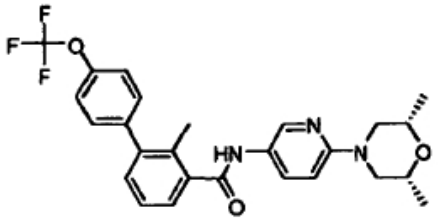
Etapa 2: El material 6 bruto anterior se hidrogena en presencia de Pd-C (0,2 g) en MeOH (100 ml) bajo hidrógeno a lo largo de 10 h. La suspensión se filtra a través de celita y el filtrado se concentra para dar el producto 7 bruto como un aceite marrón oscuro que se utiliza directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS m/z: 208,1 (M+1).

Etapa 3: Se añade gota a gota trietilamina (139 µl, 1,0 mmol) a una solución de ácido 3-bromo-4-metilbenzoico (108 mg, 0,5 mmol), 6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-ilamina 7 (104 mg, 0,5 mmol) y HATU (190 mg, 0,5 mmol) en DMF seca (5 ml). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la concentración, el residuo se reparte entre EtOAc y agua. La capa orgánica se seca y se concentra para dar el producto bruto. El compuesto final se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido en columna usando EtOAc al 50% en hexano como eluyente para dar 8 como un sólido blanco. LC-MS m/z: 404,1 (M+1).

Etapa 4: Una mezcla de ácido 4-cianofenilborónico (18 mg, 0,12 mmol), 3-bromo-N-[6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-il]-4-metil-benzamida 8 (40 mg, 0,1 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (11 mg, 0,01 mmol) y Na_2CO_3 (42 mg, 0,4 mmol) en

un sistema de disolventes combinados de tolueno (0,2 ml) y agua (0,2 ml) y etanol (0,05 ml) se calienta a 140°C bajo irradiación con microondas durante 30 min. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y agua. La capa acuosa se extrae con EtOAc. La capa orgánica combinada se lava con salmuera y se concentra para dar el producto bruto que se purifica mediante HPLC de masas preparativa activada (columna C_{18}, eluida con CH_3CN-H_2O que contiene TFA al 0,05%) para dar [6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-il]-amida de ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico. LC-MS m/z: 427,2 (M+1).

Repitiendo los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores, utilizando materiales de partida apropiados, se obtiene el Compuesto Número 153.

153  LC-MS m/z 486,2 (M+1)

Los compuestos de la presente invención se ensayan para evaluar su capacidad para inhibir la ruta de señalización Hedgehog.

Ensayo del Indicador Gli-Luc para la Inhibición de la Ruta Hh

Se cultivan células TM3 de ratón (obtenidas de American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) en medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero de caballo inactivado térmicamente al 5% y FBS al 2,5% (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C con CO_2 al 5% en atmósfera de aire. Las células TM3 se transfectaron con plásmido indicador pTA-8xGli-Luc. Se selecciono un clon establemente transfectado denominado TMHh-12. El clon TMHh-12 mostraba buena respuesta a la estimulación con Shh-N. Para evaluar las IC_{50} de los antagonistas, 8.000 células TMHh-12 se pusieron en cada uno de los pocillos en placas de 384 pocillos con medio DMEM/F12 al 50% complementado con FBS al 2%. Después de 12 horas, la ruta Hh se activa añadiendo proteína Shh de ratón recombinante (expresada en E.coli, 8 µg/ml) o añadiendo agonistas de Smo. Los compuestos de prueba se añaden a placas con diferentes concentraciones. Después de 48 horas, se ensayan las actividades de luciferasa de la luciferasa de luciérnaga con el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega, Madison, WI). La IC_{50} se mide cuando el efecto del compuesto reduce la señal de luminiscencia en 50%. La toxicidad de estos compuestos se evalúa en células TM3 utilizando ensayos CellTiter Glo o mediante la línea celular TM3-Luc (una célula TM3 transfectada establemente con un vector de expresión de luciferasa constitutivo).

Los compuestos de fórmula I tienen típicamente una EC_{50} de menos de 500 nM, más preferiblemente menos de 200 nM.

Ensayo de Citotoxicidad

Se realiza un ensayo de citotoxicidad para comparar los efectos de un compuesto de la invención sobre células de meduloblastoma (células Daoy), células de carcinoma de células basales (células TE354.T) y células de control (fibroblasto humano normal) según el siguiente procedimiento:

Se adquieren células Daoy (línea celular de meduloblastoma) de ATCC, y se cultivan en medio esencial mínimo (Eagle) con L-glutamina 2 mM y BSS de Earle para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato sódico 1,0 mM y FBS al 10% a 37°C con CO_2 al 5% en atmósfera de aire.

Se cocultivan células TE354.T (de ATCC) en medio de Eagle modificado de Dulbecco con suero bovino fetal con L-glutamina 4 mM y FBS al 10%.

Se cultivan células fibroblásticas dérmicas humanas normales (Clonetics) en medio de crecimiento de fibroblastos (Clonetics).

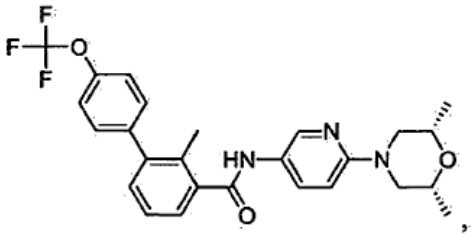
Cada una de las líneas celulares anteriores se siembra independientemente en placas de 96 pocillos y se cultiva hasta una densidad de 5.000-10.000 células/pocillo. Un compuesto de la invención, en diferentes concentraciones, se añade a los cultivos celulares. Después de 2 días, la viabilidad celular se evalúa con el estuche de ensayo de viabilidad celular luminiscente Cell Titer-Glo (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La viabilidad celular se

mide directamente mediante señalización luminiscente y las EC_{50} se miden cuando la señal se inhibe 50%.

Los compuestos de fórmula I tienen típicamente una EC_{50} de menos de 500 nM, más típicamente menos de 200 nM.

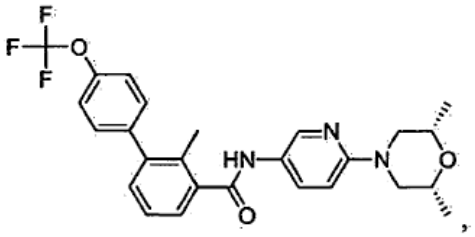
REIVINDICACIONES

1. El compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



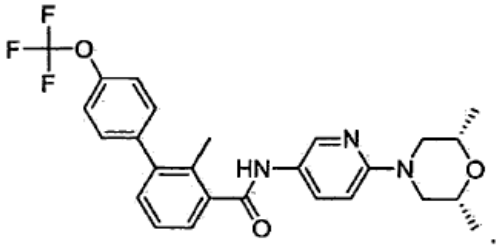
o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:

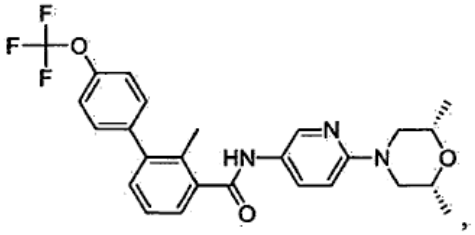


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



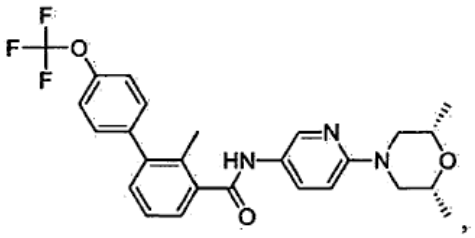
4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto N-(6-

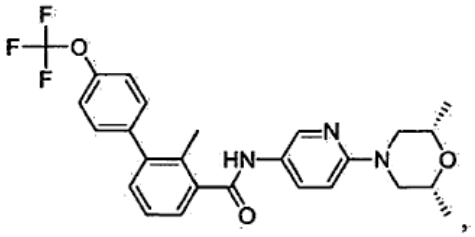
((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más agentes terapéuticos.

6. Una combinación farmacéutica según la reivindicación 5, en la que el agente terapéutico adicional se selecciona de sustancias inmunomoduladoras, antiinflamatorias u otros agentes terapéuticos antitumorales.

7. El compuesto N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de mismo, para la utilización en el tratamiento de cáncer de páncreas, cáncer de próstata, meduloblastoma, carcinoma de células basales y cáncer de pulmón microcítico.