

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 307**

51 Int. Cl.:

C07D 403/04 (2006.01)

A61K 31/501 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2009** **E 09752071 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013** **EP 2358703**

54 Título: **Piridazinas tetrasustituidas antagonistas de la ruta de Hedgehog**

30 Prioridad:

17.11.2008 US 115362 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CLAY, JULIA MARIE;
HIPSKIND, PHILIP ARTHUR;
SALL, DANIEL JON;
WILSON (NEE TAKAKUWA), TAKAKO;
THOMPSON, MICHELLE LEE y
BASTIAN, JOLIE ANNE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 446 307 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

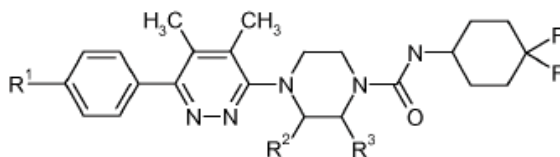
Piridazinas tetrasustituidas antagonistas de la ruta de Hedgehog

La presente invención se refiere a antagonistas de la ruta de Hedgehog y, más específicamente, a piridazinas tetrasustituidas novedosas y al uso terapéutico de las mismas. La ruta de señalización de Hedgehog (Hh) desempeña un importante papel en la formación de patrones embrionarios y mantenimiento tisular adulto dirigiendo la diferenciación y proliferación celular. La familia de proteínas Hedgehog (Hh) que incluye Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y Desert Hedgehog (Dhh) son glicoproteínas segregadas que experimentan modificaciones post-traduccionales, incluyendo escisión autocatalítica y acoplamiento de colesterol al péptido amino-terminal para formar el fragmento que tiene actividad de señalización. Hh se une a la proteína transmembrana de paso doce Ptch (Ptch1 y Ptch2), reduciendo de ese modo la supresión mediada por Ptch de Smoothed (Smo). La activación de Smo desencadena una serie de acontecimientos intracelulares que culminan en la estabilización de los factores de transcripción de Gli (Gli1, Gli2 y Gli3) y la expresión de los genes dependientes de Gli que son responsables de la proliferación celular, supervivencia celular, angiogénesis e invasión.

La señalización de Hh recientemente ha atraído considerable interés en base al descubrimiento de que la activación anómala de la señalización de Shh conduce a la formación de diversos tumores, por ejemplo cáncer pancreático, meduloblastoma, carcinoma de células basales, cáncer pulmonar de células pequeñas y cáncer de próstata. Se han informado varios antagonistas de Hh en la técnica, tales como el compuesto alcaloide esteroide IP-609; el compuesto de aminoprolina CUR61414; y el compuesto de tiazol 2,4-disustituido JK18. El documento WO2005033288 da a conocer ciertos compuestos de ftalazina 1,4-disustituidos que se afirma que son antagonistas de hedgehog. De manera similar, el documento WO2008110611 da a conocer ciertos compuestos de ftalazina 1,4-disustituidos relacionados con el diagnóstico y tratamiento de patologías relacionadas con la ruta de hedgehog.

Todavía existe la necesidad de inhibidores potentes de la ruta de hedgehog, en particular aquéllos que tienen perfiles farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos deseados. La presente invención proporciona piridazinas tetrasustituidas novedosas que son antagonistas potentes de esta ruta.

La presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:



en la que:

R¹ es hidrógeno, flúor o ciano; y

R² y R³ son independientemente metilo o hidrógeno;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se entenderá por los expertos en la técnica que los compuestos de la presente invención comprenden un resto amina terciaria y pueden reaccionar con varios ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Tales sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 66, n.º 1, enero de 1977.

Las realizaciones específicas de la invención incluyen compuestos de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

(a) R¹ es hidrógeno; y

(b) el compuesto de la reivindicación 1 o 2 en el que uno de R² y R³ es hidrógeno y el otro es metilo.

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

Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por una variedad de vías. Preferentemente, tales composiciones son para administración oral o intravenosa. Tales composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, *et al.*, eds., 19ª ed., Mack Publishing Co., 1995).

La presente invención se refiere además a un procedimiento para tratar cáncer cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, linfoma de células B, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón o melanoma en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se entenderá que la cantidad del compuesto realmente administrada se determinará por un médico en las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que va a tratarse, la vía de administración elegida, el compuesto o los compuestos reales administrados, la edad, peso y respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones por día normalmente se encuentran dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que apropiados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún mayores. Por tanto, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Esta invención también proporciona un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

Adicionalmente, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer. En particular, el cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, linfoma de células B, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón o melanoma.

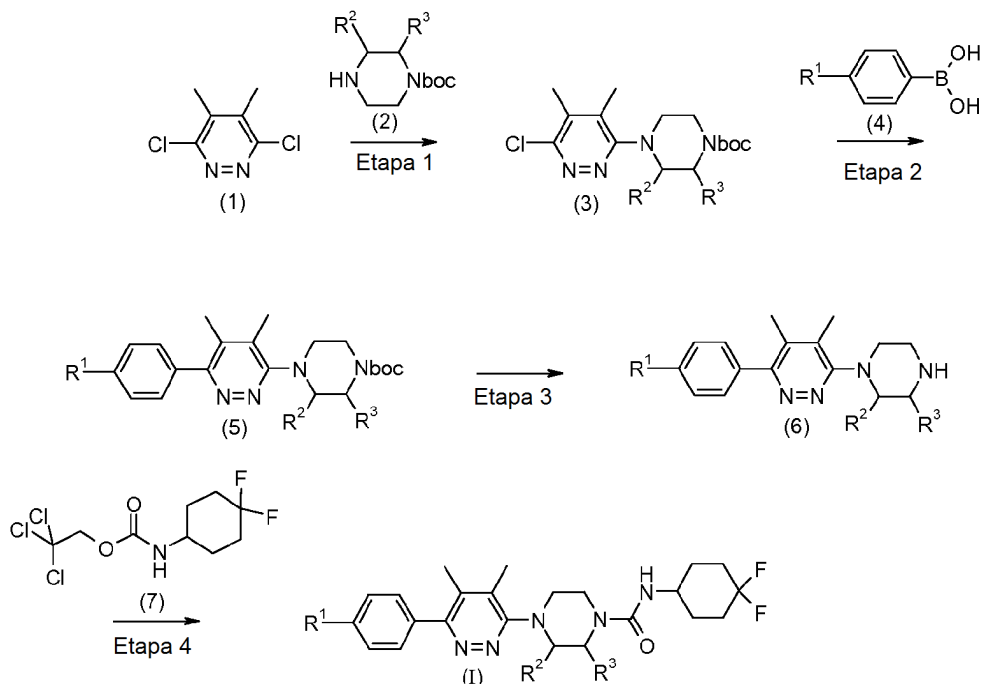
Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo para tratar cáncer cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, linfoma de células B, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón o melanoma.

Los compuestos de fórmula I, o sales de los mismos, pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, así como aquéllos descritos en los esquemas, preparaciones y ejemplos a continuación. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas pueden combinarse en formas diferentes, o conjuntamente con las etapas de diferentes esquemas, para preparar los compuestos de fórmula I, o sales de los mismos.

Los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son tal como se ha definido previamente. Los reactivos y materiales de partida en general están fácilmente disponibles para un experto en la técnica. Otros pueden prepararse mediante técnicas convencionales de química orgánica y heterocíclica, técnicas que son análogas a la síntesis de compuestos estructuralmente similares conocidos, y los procedimientos descritos en las preparaciones y ejemplos que siguen incluyendo cualquier procedimiento novedoso.

Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: "boc" o "t-boc" se refiere a terc-butoxicarbonilo; "EDCI" se refiere a clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; "Et₂O" se refiere a dietil éter; "HOBT" se refiere a hidrato de 1-hidroxibenzotriazol; "DMF" se refiere a *N,N*-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a metilsulfóxido; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "MeOH" se refiere a metanol; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "SCX" se refiere a intercambio de cationes fuerte; y "Cl₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente.

Esquema 1

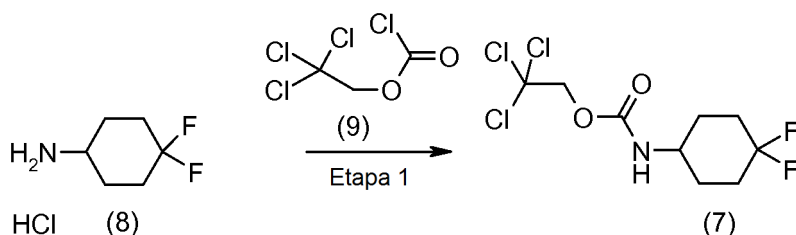


Un compuesto de fórmula I puede prepararse de acuerdo con reacciones tal como se han representado en el esquema 1.

- 5 En el esquema 1, la 3,6-dicloro-4,5-dimetilpiridazina (1) se desplaza con una piperazina sustituida protegida con monoboc (2) en una reacción de sustitución aromática nucleófila (SNAr) para proporcionar una piridazina 3-cloro-4,5-dimetil-6-(sustituida) de fórmula (3). Por ejemplo, en la etapa 1, un cloruro de (1) puede hacerse reaccionar con una piperazina sustituida protegida con monoboc en un disolvente aprótico polar tal como DMSO en presencia de una base orgánica tal como diisopropiletilamina. En la etapa 2, el cloruro restante en la dimetilpiridazina (3) puede hacerse reaccionar con un ácido fenilborónico (4) en una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura para dar la correspondiente piperazina 4,5-dimetil-6-sustituida fenilpiridazina-3-sustituida (5). El experto en la técnica reconocerá que existe una variedad de condiciones útiles para facilitar tales reacciones de acoplamiento cruzado. Las condiciones de reacción hacen uso de un disolvente adecuado tal como dioxano o dioxano/agua y se realizan en presencia de una base tal como fluoruro de cesio. La reacción tiene lugar en presencia de un catalizador de paladio tal como cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno)paladio(II), bajo una atmósfera inerte a una temperatura de aproximadamente 80-160 °C para dar un compuesto de fórmula (5). La amina puede desprotegerse mediante procedimientos convencionales de desprotección. Los procedimientos para introducir y eliminar grupos protectores de nitrógeno se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo, Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York, (1999)). Por ejemplo, la desprotección de boc de la piperazina de fórmula (5) puede realizarse en condiciones ácidas, tal como cloruro de hidrógeno en un disolvente adecuado tal como metanol o dioxano para dar un compuesto de fórmula (6). La acilación de la amina en la etapa 4 puede realizarse con un carbamato de tricloroetilo sustituido (7) usando una base orgánica tal como trietilamina en un disolvente aprótico polar tal como DMSO y calentando hasta aproximadamente 90-110 °C. Los compuestos de fórmula I pueden convertirse en una sal tal como la sal de HCl mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica tal como adición de HCl en Et₂O para dar compuestos de fórmula I.

El carbamato de tricloroetilo sustituido puede prepararse tal como se muestra en el esquema 2.

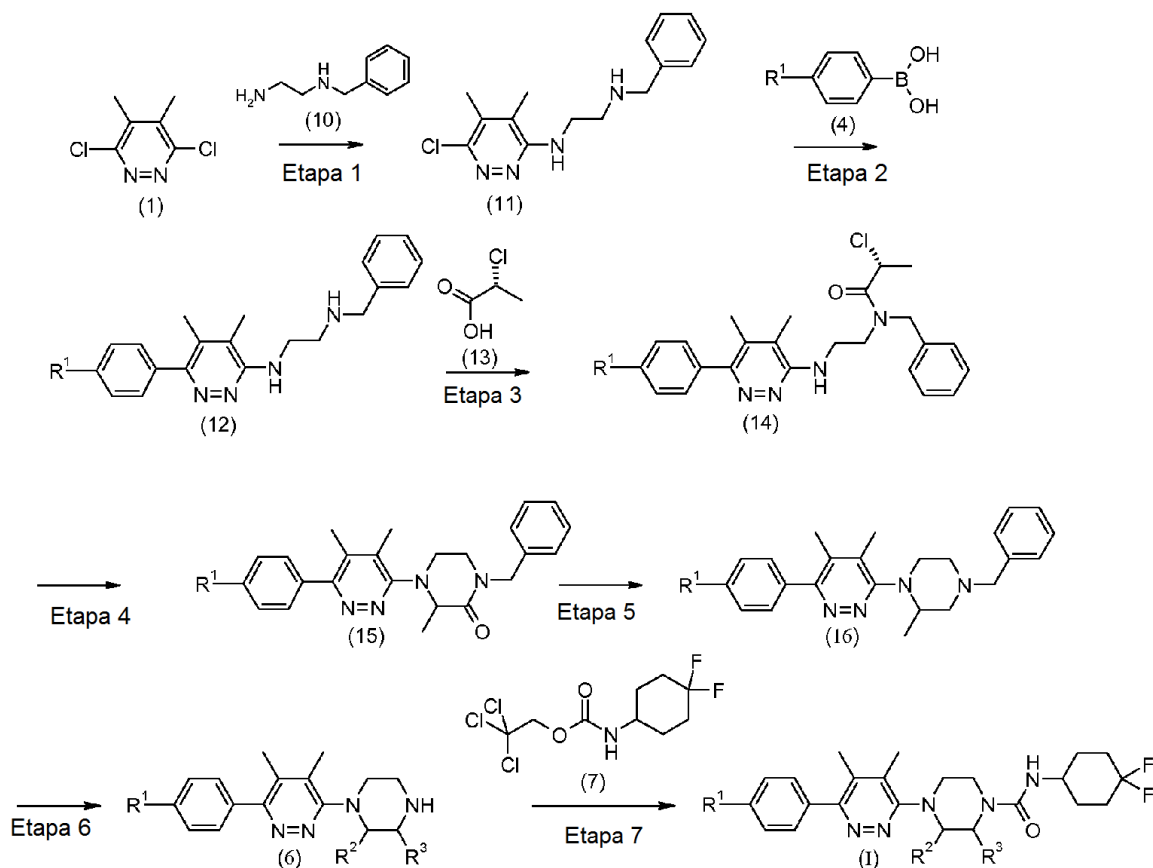
Esquema 2



El clorhidrato de 4,4-difluorociclohexilamina (8) se acila con carbonoclorhidrato de 2,2,2-tricloroetilo (9) usando una base orgánica tal como trietilamina en un disolvente inerte tal como diclorometano para dar 4,4-difluorociclohexilcarbamato de 2,2,2-tricloroetilo, (7), etapa 1.

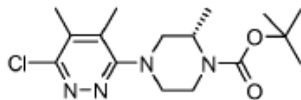
5 Como alternativa, la 3,6-dicloro-4,5-dimetilpiridazina puede alquilarse con benciletilendiamina que puede procesarse para obtener la piperazina en forma cíclica tal como se muestra en el esquema 3.

Esquema 3

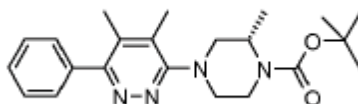


Un cloruro de (1) puede desplazarse con benciletilendiamina (10) usando una base orgánica tal como diisopropilamina en un disolvente aprótico polar tal como DMSO con calentamiento a 110-130 °C tal como se muestra en la etapa 1, esquema 3 para dar la etilendiaminapiridazina protegida de fórmula (11). El segundo cloruro puede hacerse reaccionar tal como se ha descrito anteriormente con un ácido borónico (4) mostrado en la etapa 2 para dar un compuesto de formula (12). El bencil-nitrógeno se acila con ácido 2-cloropropiónico (13) usando una base orgánica tal como trietilamina y un reactivo de acoplamiento adecuado tal como EDCI con HOBt para dar un compuesto de formula (14) tal como se muestra en la etapa 3. La ciclación para formar la piridazina se realiza con hidruro de sodio en un disolvente inerte tal como THF para dar un compuesto de fórmula (15), etapa 4. Un agente reductor tal como sulfuro de borano-metilo reduce la cetona para dar un compuesto de fórmula (16), etapa 5. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (15) puede tratarse con complejo de sulfuro de borano-metilo en un disolvente inerte tal como THF. La mezcla puede calentarse hasta 40-60 °C para dar la piperazina sustituida de fórmula (16). La desprotección de la piperazina se realiza en condiciones de hidrogenación de 272-476 kPa de gas hidrógeno con un catalizador tal como Pd al 10%/C usando un disolvente polar tal como etanol para dar un compuesto de fórmula (6), etapa 6. La acilación de la amina en la etapa 7 puede realizarse con un carbamato de tricloroetilo sustituido (7) usando una base orgánica tal como trietilamina en un disolvente aprótico polar tal como DMSO y calentando hasta aproximadamente 90-110 °C para dar compuestos de fórmula I que pueden convertirse en un sal tal como la sal HCl mediante procedimientos conocidos para un experto en la técnica tal como añadir HCl en Et₂O.

Las siguientes preparaciones y ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención en más detalle y representan síntesis típicas de los compuestos de fórmula I. Los nombres de los compuestos de la presente invención se proporcionan generalmente por ChemDraw Ultra® 10.0.

Preparación 14-(6-Cloro-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxilato de (*S*)-*tert*-butilo

5 Calentar una mezcla de 1,4-dicloro-2,3-dimetilpiridazina (6,06 g, 34,2 mmol), éster *tert*-butílico del ácido (*S*)-2-metilpiperazina-1-carboxílico (6,88 g, 34,4 mmol) y diisopropiletilamina (30 ml, 172 mmol) en DMSO (30 ml) a 120 °C durante 5 d. Enfriar y tratar la mezcla con éster *tert*-butílico del ácido (*S*)-2-metilpiperazina-1-carboxílico adicional (3,74 g, 18,7 mmol), y continuar calentando a 120 °C durante 2 d adicionales. diluir la mezcla de reacción con EtOAc y lavar con H₂O y salmuera. Secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 20 % al 50 % de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto del título como una espuma amarillo pálido (7,36 g, 63 %). ES/EM m/z (³⁵Cl) 341,0 (M+1).

Preparación 24-(4,5-Dimetil-6-fenilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxilato de (*S*)-*tert*-butilo

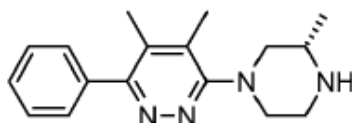
15 Tratar una mezcla desgasificada con N₂ de 4-(6-cloro-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxilato de (*S*)-*tert*-butilo (3,03 g, 8,87 mmol), ácido fenilborónico (1,62 g, 13,3 mmol), y CsF (4,09 g, 26,9 mmol) en 1,4-dioxano (120 ml) con cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio(II) (1,08 g, 1,32 mmol). Calentar la mezcla de reacción a 95 °C durante la noche. Enfriar la reacción y dividir entre EtOAc y H₂O. Lavar la capa orgánica con salmuera, secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 15 % al 85 % de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto del título como un sólido blanco (2,93 g, 86 %). ES/EM m/z 383 0 (M+1).

Preparar las dimetilpiridazinas sustituidas en la tabla a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento descrito en la preparación 2, usando el ácido fenilborónico apropiado.

N.º de preparación	Nombre químico	Estructura	ES/EM m/z
3	4-(6-(4-cianofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxilato de (<i>S</i>)- <i>tert</i> -butilo		408,2 (M+1)
4	4-(6-fluoro-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxilato de (<i>S</i>)- <i>tert</i> -butilo		400,8 (M+1)

Preparación 5

(S)-4,5-Dimetil-3-(3-metilpiperazin-1-il)-6-fenilpiridazina



25

Tratar una disolución de 4-(4,5-dimetil-6-fenilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxilato de (*S*)-*tert*-butilo (2,93 g, 7,66 mmol) en MeOH (20 ml) con HCl 4 M en 1,4-dioxano (10 ml, 40,0 mmol). Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Concentrar la mezcla de reacción con presión reducida. Disolver el residuo

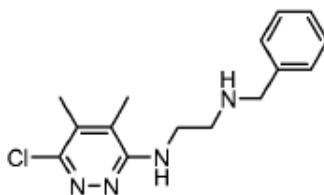
en MeOH y verter en una columna SCX (Varian, 10 g). Lavar la columna con MeOH. Eluir el producto deseado con NH_3 2 M/MeOH. Concentrar con presión reducida para dar el compuesto del título (2,07 g, 95 %). ES/EM m/z 283,0 (M+1).

- 5 Preparar las piperazinas desprotegidas en la tabla a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento descrito en la preparación 5, usando la piperazina protegida con boc apropiada con tiempos de reacción de 3 h y usando 1,4-dioxano en lugar de MeOH como disolvente.

N.º de preparación	Nombre químico	Estructura	ES/EM m/z
6	(S)-4,5-Dimetil-6-(3-metilpiperazin-1-il)piridazina-3-carbonitrilo		308,2 (M+1)
7	(S)-3-(4-Fluorofenil)-4,5-dimetil-6-(3-metilpiperazin-1-il)piridazina		301,2 (M+1)

Preparación 8

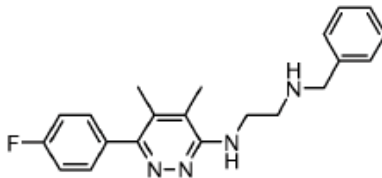
N1-Bencil-N2-(6-cloro-4,5-dimetilpiridazin-3-il)etano-1,2-diamina



- 10 Calentar una mezcla de 3,6-dicloro-4,5-dimetilpiridazina (6,90 g, 39,0 mmol), N-benciletilendiamina (8,78 g, 58,5 mmol) y diisopropiletilamina (25,2 g, 195 mmol) en DMSO (78 ml) a 120 °C durante 3 d. Enfriar la mezcla de reacción, verter en H_2O y extraer la mezcla con Et_2O . Lavar la capa orgánica con H_2O , secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo usando cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 0 % al 5 % NH_3 2 M/MeOH en CH_2Cl_2) para obtener el compuesto del título como un sólido ceroso (6,41 g, 57 %).
- 15 ES/EM m/z 291,2 (M+1).

Preparación 9

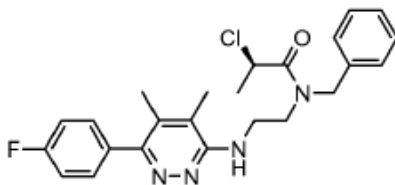
N1-Bencil-N2-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)etano-1,2-diamina



- 20 Tratar una mezcla desgasificada con N_2 de N1-bencil-N2-(6-cloro-4,5-dimetilpiridazin-3-il)etano-1,2-diamina (6,40 g, 22,0 mmol), ácido 4-fluorofenilborónico (9,24 g, 66,0 mmol) y CsF (10,0 g, 66,0 mmol) en 1,4-dioxano (220 ml) con cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio(II) (2,70 g, 3,30 mmol). Calentar la mezcla de reacción a 95 °C durante la noche. Enfriar y dividir entre NaHCO_3 saturado (ac) y EtOAc. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar las capas orgánicas, secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 0 % al 6% NH_3 2 M/MeOH en CH_2Cl_2) para dar el compuesto del título como un sólido ceroso (4,91 g, 64 %). ES/EM m/z 351,2 (M+1).
- 25

Preparación 10

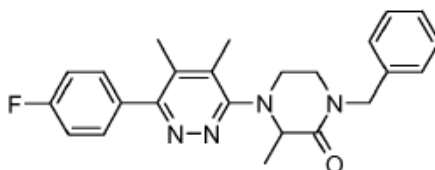
(R)-N-Bencil-2-cloro-N-(2-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-ilamino)etil)propanamida



- 5 Secuencialmente tratar una disolución de N1-bencil-N2-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)etano-1,2-diamina (4,90 g, 13,98 mmol) en CH₂Cl₂ (70 ml) con ácido (R)-(+)-2-cloropropiónico (1,84 ml, 20,97 mmol), trietilamina (2,92 ml, 20,97 mmol), HOBT (3,21 g, 20,97 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (4,02 g, 20,97 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Lavar la mezcla de reacción con NaHCO₃ acuoso saturado. Extraer la capa acuosa con CH₂Cl₂. Combinar las capas orgánicas, secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (20 % de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto del título como una espuma amarilla (4,59 g, 74 %). ES/EM m/z 441,2 (M+1).
- 10

Preparación 11

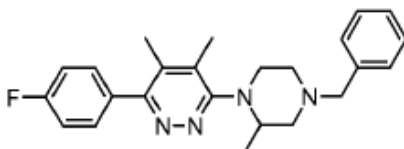
1-Bencil-4-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-3-metilpiperazin-2-ona



- 15 Tratar una disolución a 0 °C de (R)-N-bencil-2-cloro-N-(2-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-ilamino)etil)propanamida (4,59 g, 10,4 mmol) en THF (104 ml) con NaH (60 %, 625 mg, 15,6 mmol). Dejar la mezcla de reacción calentar hasta temperatura ambiente y agitar durante la noche. Enfriar la reacción hasta 0 °C y tratar con NaH adicional (60 %, 208 mg, 5,20 mmol). Dejar la mezcla de reacción calentar hasta temperatura ambiente y agitar durante 3 d. Dividir la mezcla de reacción entre salmuera y EtOAc. Separar la capa orgánica, secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 0 % al 2 % NH₃ 2 M/MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar el compuesto del título como una espuma blanca (3,64 g, 86 %). ES/EM m/z 405,2 (M+1).
- 20

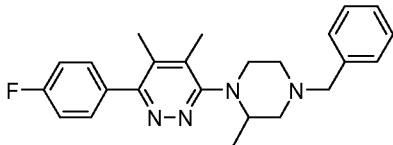
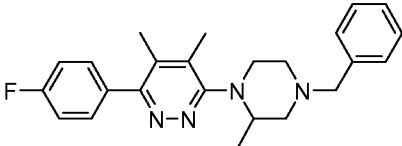
Preparación 12

3-(4-Bencil-2-metilpiperazin-1-il)-6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazina



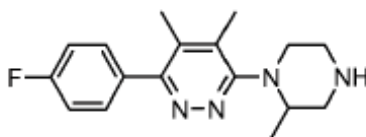
- 25 Tratar una disolución de 1-bencil-4-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-3-metilpiperazin-2-ona (2,84 g, 7,02 mmol) en THF (70 ml) con complejo de sulfuro de borano-metilo (1,96 ml, 21,1 mmol). Calentar la mezcla resultante a 50 °C durante 2 h. Enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo, añadir MeOH (20 ml) por medio de un embudo de adición seguido por HCl 4 M en 1,4-dioxano (20 ml). Calentar la mezcla resultante a 65 °C durante 1 h. Concentrar la mezcla con presión reducida. Dividir el residuo entre CH₂Cl₂ y NaHCO₃ saturado (ac). Separar las capas y extraer la capa acuosa con CH₂Cl₂. Combinar las capas orgánicas, secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 0 % al 3 % NH₃ 2 M/MeOH en CH₂Cl₂) para dar el compuesto del título como un sólido ceroso (2,45 g, 89 %). ES/EM m/z 391,2 (M+1).
- 30

Separar los isómeros de 3-(4-bencil-2-metilpiperazin-1-il)-6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazina mediante cromatografía quiral (Chiralcel OJ-H, velocidad de flujo 30 ml/min, detección 225 nm, 6:4 MeOH:acetonitrilo). Primer pico de elución, isómero 1: 99 % ee. Segundo pico de elución, isómero 2: 99 % ee.

N.º de preparación	Nombre químico	Estructura	ES/EM m/z
13	3-(4-Bencil-2-metilpiperazin-1-il)-6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazina, isómero 1	 Isómero 1	391,2 (M+1)
14	3-(4-Bencil-2-metilpiperazin-1-il)-6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazina, isómero 2	 Isómero 2	391,2 (M+1)

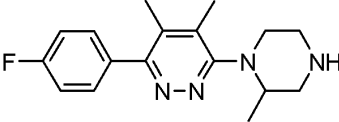
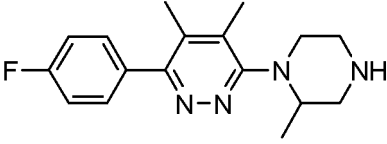
Preparación 15

- 5 3-(4-Fluorofenil)-4,5-dimetil-6-(2-metilpiperazin-1-il)piridazina



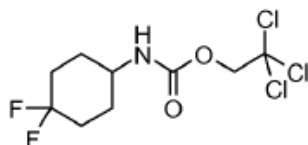
- 10 Añadir una disolución de 3-(4-bencil-2-metilpiperazin-1-il)-6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazina (200 mg, 3,25 mmol) en EtOH absoluto (15 ml) a Pd al 10 %/C (46,8 mg) pre-humedecido con EtOH (5 ml). Agitar la mezcla en un frasco Parr presurizado con H₂ a 408 kPa durante 10 h. Filtrar la mezcla de reacción y aplicar la disolución directamente en una columna SCX (Varian, 2 g). Lavar la columna con MeOH y CH₂Cl₂. Eluir el producto con una mezcla 1:1 de NH₃ 2 M/MeOH y CH₂Cl₂. Concentrar el eluyente con presión reducida para dar el compuesto del título como una espuma blanquecina (142 mg, 92 %). ES/EM m/z 301,2 (M+1).

Preparar las metil-piperazinas desprotegidas en la siguiente tabla siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 15, usando la amina protegida apropiada.

N.º de preparación	Nombre químico	Estructura	ES/EM m/z
16	3-(4-Fluorofenil)-4,5-dimetil-6-(2-metilpiperazin-1-il)piridazina	 Isómero 1	301,2 (M+1)
17	3-(4-Fluorofenil)-4,5-dimetil-6-(2-metilpiperazin-1-il)piridazina	 Isómero 2	301,2 (M+1)

Preparación 18

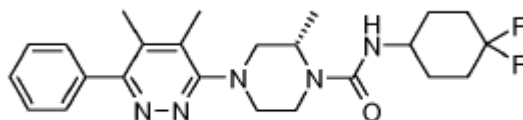
4,4-Difluorociclohexilcarbamato de 2,2,2-tricloroetilo



- 5 Tratar una mezcla a 0 °C de clorhidrato de 4,4-difluorociclohexilamina (3,29 g, 19,2 mmol) y trietilamina (5,88 ml, 42,2 mmol) en CH₂Cl₂ (192 ml) con carbonoclorhidrato de 2,2,2-tricloroetilo (2,91 ml, 21,1 mmol) gota a gota. Después de 1 h, dejar la mezcla de reacción calentarse hasta temperatura ambiente y agitar durante la noche. Dividir la mezcla de reacción entre H₂O y CH₂Cl₂ y separar las capas. Secar la capa orgánica sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar con presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (5,75 g, 97 %). CG/EM m/z ³⁵Cl 309 (M+).

Ejemplo 1

Clorhidrato de (S)-N-(4,4-difluorociclohexil)-4-(4,5-dimetil-6-fenilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxamida



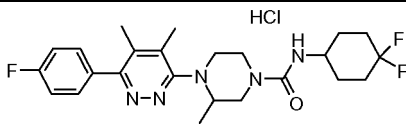
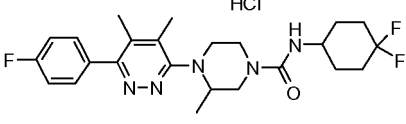
HCl

- 15 Tratar una mezcla de (S)-4,5-dimetil-3-(3-metilpiperazin-1-il)-6-fenilpiridazina (199 mg, 0,70 mmol) y trietilamina (0,30 ml, 2,15 mmol) en DMSO (5 ml) con 4,4-difluorociclohexilcarbamato de 2,2,2-tricloroetilo (341 mg, 1,10 mmol). Calentar la reacción a 100 °C durante 4 d. Verter la mezcla de reacción en H₂O, lavar con EtOAc. Extraer la mezcla con EtOAc. Lavar la capa orgánica dos veces con H₂O, entonces salmuera. Secar sobre Na₂SO₄ y concentrar con presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente del 0 % al 10 % MeOH en CH₂Cl₂). Disolver la base libre purificada en MeOH (1 ml) y tratar con HCl 1 M en Et₂O (1 ml).
20 Concentrar la mezcla para proporcionar el compuesto del título como una espuma amarilla (256 mg, 76 %). ES/EM m/z 444,2 (M+1).

Preparar las piperazinilureas en la tabla a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento descrito e el ejemplo 1, usando la piperazinilpiridazina apropiada.

N.º de ejemplo	Nombre químico	Estructura	ES/EM m/z
2	clorhidrato de (S)-N-(4,4-difluorociclohexil)-4-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxamida	 HCl	461,8 (M+1)
3	clorhidrato de (S)-4-(6-(4-cianofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-metilpiperazina-1-carboxamida	 HCl	468,8 (M+1)
4	clorhidrato de N-(4,4-difluorociclohexil)-4-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-3-metilpiperazina-1-carboxamida	 HCl	462,2 (M+1)

(continuación)

N.º de ejemplo	Nombre químico	Estructura	ES/EM m/z
5	clorhidrato de <i>N</i> -(4,4-difluorociclohexil)-4-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-3-metilpiperazina-1-carboxamida, isómero 1	 Isómero 1	462,2 (M+1)
6	clorhidrato de <i>N</i> -(4,4-difluorociclohexil)-4-(6-(4-fluorofenil)-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-3-metilpiperazina-1 carboxamida, isómero 2	 Isómero 2	462,2 (M+1)

Biología

Hedgehog ha estado implicado como un factor de supervivencia para los siguientes cánceres: carcinoma de células basales; cánceres del tracto gastrointestinal superior (esófago, estómago, páncreas y tracto biliar); cáncer de próstata; cáncer de mama; cáncer pulmonar de células pequeñas; cáncer pulmonar de células no pequeñas; linfoma de células B; mieloma múltiple; cáncer gástrico; cáncer de ovario; cáncer colorrectal; cáncer de hígado; melanoma; cáncer de riñón; y cáncer cerebral.

Se ha afirmado que los elementos de la ruta de hedgehog son potenciales dianas farmacológicas para el tratamiento de cánceres. Una línea celular Daoy establecida a partir del tumor de meduloblastoma (ATCC, HTB-186) es sensible a los ligandos de Hh. Cuando estas células se tratan con medio acondicionado con Shh añadido en forma exógena, la ruta de señalización de Hh se activa y da como resultado un incremento en la expresión de *Gli1*. Ciclopamina, un alcaloide aislado de lirio de maíz *Veratrum californicum*, es un antagonista débil de hedgehog y se ha demostrado que suprime la expresión de *Gli1* en respuesta a la estimulación de Shh. Ciertas observaciones recientes sugieren que la ciclopamina inhibe el crecimiento de células de meduloblastoma cultivada y aloinjertos. Usando este sistema de modelo de células Daoy, pueden identificarse inhibidores potentes de las rutas de señalización hedgehog. Debido a que los compuestos de la presente invención son antagonistas de hedgehog, son adecuados para tratar los tipos de tumor mencionados anteriormente.

Determinación de CI_{50} de la actividad biológica

El siguiente protocolo de ensayo y los resultados del mismo además demuestran la utilidad y eficacia de los compuestos y procedimientos de la presente invención. Los ensayos funcionales respaldan que los compuestos de la presente invención exhiben la capacidad de inhibir la señalización de Shh. Todos los ligandos, disolventes y reactivos empleados en el siguiente ensayo están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales o pueden ser preparados fácilmente por un experto en la técnica.

La actividad biológica se determina usando un ensayo funcional en células de cáncer neuronal Daoy y mide los niveles del ácido ribonucleico de *Gli1* a través de un sistema de ensayo de ADNb (ácido deoxirribonucleico ramificado) (Panomics, Inc., Fremont, CA). *Gli* se descubrió originalmente en una línea celular de glioblastoma y codifica una proteína con dedo de zinc que se activa por la señalización de Shh.

La máxima respuesta se obtiene induciendo la transcripción de *Gli1* en las células Daoy con medio acondicionado (riñón embrionario humano, células HEK-293 que expresan en forma estable Shh recombinante) durante 24 horas y midiendo después la cantidad de transcripto de *Gli1* estimulado. La respuesta mínima es la cantidad de transcripto de *Gli1* inhibido con un compuesto control en células Daoy que se han estimulado con medio acondicionado (riñón embrionario humano, células HEK-293 que expresan en forma estable Shh recombinante) durante 24 horas.

Ensayo funcional para medir la inhibición de *Gli1* en células Daoy

El sistema de ensayo de ADNb usa la tecnología de ADN de cadena ramificada para permitir la amplificación de un ácido ribonucleico diana (transcripto). La tecnología emplea tres tipos de sondas de ADNc específicas de *Gli1* cortas híbridas sintéticas que determinan la especificidad del transcripto diana [prolongadores de captura (CE), prolongadores de etiqueta (LE) y bloqueadores (BL)] que hibridan como un complejo con el transcripto diana para amplificar la señal de hibridación. La adición de un sustrato quimioluminogénico durante la etapa de amplificación permite la detección usando luminiscencia.

La línea celular Daoy obtenida a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) es una línea de células tumorales neuronales humanas sensibles al Shh y se estableció en 1985 a partir de un tumor de meduloblastoma cerebeloso desmoplásico, una línea de células tumorales fisiológicamente relevante. Los niveles endógenos de los niveles de transcritos de *Gli1* son bajos en la células Daoy pero pueden estimularse usando medio acondicionado tomado de células que sobreexpresan en forma estable Shh humano (una línea de células HEK-293 transfectadas en forma estable con hShh).

Las células Daoy se hacen crecer hasta la confluencia en los frascos T225 de cultivo tisular en medio de crecimiento de Daoy que contiene Medio Esencial Mínimo (MEM) más suero bovino fetal al 10% (FBS) con aminoácidos no esenciales 0,1 nM y piruvato de sodio 1 mM. Las células se eliminan de los frascos T225 usando tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se centrifugan, se resuspenden en medio y después se cuentan.

Las células Daoy después se siembran en 50.000 células por pocillo en medio de crecimiento en placas de cultivo tisular de 96 pocillos Costar y se deja que se incuben durante toda la noche a 37 °C con dióxido de carbono al 5 % (CO₂). Las células se lavan una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS) seguido por la adición de 100 µl de medio acondicionado de Shh (Shh-CM) para estimular los niveles de expresión de *Gli1*. Shh-CM se diluye para lograr la máxima estimulación usando medio de crecimiento control - 0,1 % de FBS/DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco). Las células Daoy tratadas con Shh-CM después se tratan con diversas concentraciones de inhibidores de hedgehog que varían de aproximadamente 1 µM a 0,1 nM. Se deja que los compuestos de ensayo se incuben durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %.

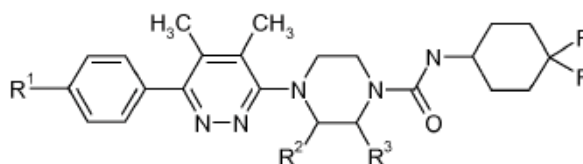
La medición del transcrito de *Gli1* se realiza usando el ensayo de *Gli1* Quantigene 2.0 según lo descrito por el fabricante (Panomics, Inc.). Preparar un tampón de mezcla de lisis diluida (DLM) que incluye proteinasa K. Después de una incubación de 24 horas con el compuesto, las células se lavan una vez con PBS y se añaden 180 µl de DLM a las células. La placa de células que contiene el tampón de lisis se sella y se coloca a 55 °C durante de 30 a 45 minutos. Los lisados de células resultantes se trituran después 5 veces. Un conjunto de sonda de trabajo que contiene sondas de *Gli1* se realiza diluyendo las sondas en el DLM de acuerdo con las instrucciones del fabricante y después se añaden 20 µl del conjunto de sonda de trabajo a las placas de ensayo de ADNb junto con 80 µl de los lisados de Daoy. Las placas se sellan y se incuban durante la noche a 55 °C. La placas de ADNb después se procesan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal se cuantifica mediante lectura de las placas en un lector Perkin Elmer Envision que detecta la luminiscencia. La señal luminescente es directamente proporcional a la cantidad de transcrito diana presente en la muestra.

Los datos de señal luminescente del ensayo funcional se usan para calcular la CI₅₀ para el ensayo *in vitro*. Los datos se calculan en base a los valores control máximos (células Daoy tratadas con Shh-CM) y el valor control mínimo (células Daoy tratadas con Shh-CM y una concentración inhibidora de un compuesto control, 1 µM de N(3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-clorofenil)-3,5-dimetoxibenzamida). Se usa un ajuste de curva logística de cuatro parámetros para generar los valores CI₅₀ usando los programas software ActivityBase versión 5.3, ecuación 205 (Assay Guidance Manual Versión 5.0, 2008, Eli Lilly and Company y NIH Chemical Genomics Center).

Siguiendo el protocolo descrito, los compuestos de la invención ejemplificados en el presente documento muestran una CI₅₀ de < 15 nM. Por ejemplo, el compuesto del ejemplo 1 tiene una CI₅₀ de aproximadamente 1,26 nM con un error estándar de 0,139 (n=3) en el ensayo descrito anteriormente. Estos resultados proporcionan evidencia de que los compuestos de la presente invención son antagonistas de hedgehog y, como tales, son útiles como agentes anticancerígenos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula:



en la que:

- 5 R^1 es hidrógeno, flúor o ciano; y
 R^2 y R^3 son independientemente metilo o hidrógeno;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^1 es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que uno de R^2 y R^3 es hidrógeno y el otro es metilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es clorhidrato de (S)-N-(4,4-difluorociclohexil)-4-(4,5-dimetil-6-fenilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazina-1-carboxamida.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.
- 20 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer.
8. El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es seleccionado del grupo que consiste en cáncer cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, linfoma de células B, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón y melanoma.
- 25