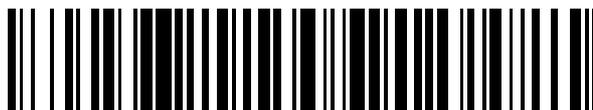


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 871**

51 Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

C07D 213/06 (2006.01)

A61K 31/4418 (2006.01)

A61K 31/4436 (2006.01)

A61K 31/443 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 09731060 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2271642**

54 Título: **Inhibidores piridilo de la señalización de hedgehog**

30 Prioridad:

11.04.2008 US 44451 P

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

07.05.2014

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US y
CURIS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUNZNER, JANET L.;
SUTHERLIN, DANIEL P.;
STANLEY, MARK S.;
BAO, LIANG;
CASTANEDO, GEORGETTE;
LALONDE, REBECCA L.;
WANG, SHUMEI;
REYNOLDS, MARK E.;
SAVAGE, SCOTT J.;
MALESKY, KIMBERLY y
DINA, MICHAEL S.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 458 871 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores piridilo de la señalización de hedgehog.

5 **Reivindicación de prioridad**

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud estadounidense provisional 61/044451 presentada el 11 de abril de 2008.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de compuestos orgánicos útiles para métodos de terapia y/o profilaxis en un mamífero, en particular a un determinado compuesto de piridilo que inhibe la ruta de señalización de hedgehog y que resulta útil en métodos de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas y enfermedades mediadas por angiogénesis.

15 **Antecedentes de la invención**

La proteína hedgehog (Hh) se identificó por primera vez en *Drosophila melanogaster* como un gen de polaridad de segmento implicado en la formación de patrones embrionarios (Nusslein-Volhard *et al.*, Roux. Arch. Dev. Biol. 193: 267-282 (1984)). Se identificaron posteriormente tres ortólogos de hedgehog de *Drosophila* (Sonic, Desert e Indian) que se encuentran en todos los vertebrados incluyendo peces, aves y mamíferos. La Desert hedgehog (Dhh) se expresa principalmente en los testículos, tanto en el desarrollo embrionario de ratón como en el roedor y ser humano adultos; Indian hedgehog (Ihh) está implicada en el desarrollo óseo durante la embriogénesis y en la formación de hueso en el adulto; y Sonic hedgehog (Shh) se expresa a altos niveles en la notocorda y placa del suelo de embriones de vertebrados en desarrollo. Los ensayos de explantes *in vitro* así como la expresión ectópica de Shh en animales transgénicos han mostrado que Shh desempeña un papel clave en la formación del patrón del tubo neuronal (Echelard *et al.*, citado anteriormente.; Ericson *et al.*, Cell 81: 747-56 (1995); Marti *et al.*, Nature 375: 322-5 (1995); Krauss *et al.*, Cell 75, 1432-44 (1993); Riddle *et al.*, Cell 75: 1401-16 (1993); Roelink *et al.*, Cell 81:445-55 (1995); Hynes *et al.*, Neuron 19: 15-26 (1997)). Además, Hh desempeña un papel en el desarrollo de extremidades (Krauss *et al.*, Cell 75: 1431-44 (1993); Laufer *et al.*, Cell 79, 993-1003 (1994)), somitas (Fan y Tessier-Lavigne, Cell 79, 1175-86 (1994); Johnson *et al.*, Cell 79: 1165-73 (1994)), pulmones (Bellusci *et al.*, Develop. 124: 53-63 (1997) y piel (Oro *et al.*, Science 276: 817-21 (1997)). Asimismo, Ihh y Dhh están implicadas en el desarrollo óseo, del intestino y de células germinales (Apelqvist *et al.*, Curr. Biol. 7: 801-4 (1997); Bellusci *et al.*, Dev. Suppl. 124: 53-63 (1997); Bitgood *et al.*, Curr. Biol. 6: 298-304 (1996); Roberts *et al.*, Development 121: 3163-74 (1995)).

Se sintetiza Shh humana como una proteína precursora de 45 kDa que tras una escisión autocatalítica produce un fragmento N-terminal de 20 kDa que es responsable de la actividad de señalización de hedgehog normal; y un fragmento C-terminal de 25 kDa que es responsable de la actividad de autoprocesamiento en la que el fragmento N-terminal se conjuga con un resto colesterol (Lee, J.J., *et al.* (1994) Science 266, 1528-1536; Bumcrot, D.A., *et al.* (1995), Mol. Cell Biol. 15, 2294-2303; Porter, J.A., *et al.* (1995) Nature 374, 363-366). El fragmento N-terminal consiste en los residuos de aminoácido 24-197 de la secuencia precursora de longitud completa que permanece asociada a la membrana a través del colesterol en su extremo C-terminal (Porter, J.A., *et al.* (1996) Science 274, 255-258; Porter, J.A., *et al.* (1995) Cell 86, 21-34). La conjugación con colesterol es responsable de la localización tisular de la señal de hedgehog.

En la superficie celular, se cree que la señal de Hh se transmite mediante la proteína de 12 dominios transmembrana Patched (Ptc) (Hooper y Scott, Cell 59: 751-65 (1989); Nakano *et al.*, Nature 341: 508-13 (1989)) y el receptor de tipo acoplado a proteínas G Smoothened (Smo) (Alcedo *et al.*, Cell 86: 221-232 (1996); van den Heuvel e Ingham, Nature 382: 547-551 (1996)). Las pruebas tanto genéticas como bioquímicas respaldan un modelo de receptor en el que Ptc y Smo son parte de un complejo receptor de múltiples componentes (Chen y Struhl, Cell 87: 553-63 (1996); Marigo *et al.*, Nature 384: 176-9 (1996); Stone *et al.*, Nature 384: 129-34 (1996)). Tras la unión de Hh a Ptc, se alivia el efecto inhibitor normal de Ptc sobre Smo, permitiendo que Smo transduzca la señal de Hh a través de la membrana plasmática. Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual Ptc controla la actividad de Smo aún tiene que aclararse.

La cascada de señalización iniciada por Smo da como resultado la activación de factores de transcripción Gli que se translocan al núcleo en el que controlan la transcripción de genes diana. Se ha mostrado que Gli influye en la transcripción de inhibidores de la ruta de Hh tales como Ptc y Hip1 en un bucle de retroalimentación negativa que indica que se requiere un control estricto de la actividad de la ruta de Hh para lograr una diferenciación celular y formación de órganos apropiadas. La activación no controlada de la ruta de señalización de Hh está asociada con tumores malignos, en particular los del cerebro, piel y músculo así como angiogénesis. Una explicación de esto es que se ha mostrado que la ruta de Hh regula la proliferación celular en adultos mediante activación de genes implicados en la progresión del ciclo celular tales como ciclina D que está implicada en la transición G1-S. Además, Shh bloquea la detención del ciclo celular mediada por p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas. La señalización de Hh está implicada además en cáncer al inducir componentes en la ruta de EGFR (EGF, Her2)

implicados en la proliferación así como componentes en las rutas de PDGF (PDGF α) y de VEGF implicados en la angiogénesis. Se han identificado mutaciones de pérdida de función en el gen Ptc en pacientes con el síndrome de nevus de células basales (BCNS), una enfermedad hereditaria caracterizada por carcinomas de células basales múltiples (BCC). Además se han asociado mutaciones disfuncionales del gen Ptc con un gran porcentaje de tumores de carcinoma de células basales esporádicos (Chidambaram *et al.*, Cancer Research 56: 4599-601 (1996); Gailani *et al.*, Nature Genet. 14: 78-81 (1996); Hahn *et al.*, Cell 85: 841-51 (1996); Johnson *et al.*, Science 272: 1668-71 (1996); Uden *et al.*, Cancer Res. 56: 4562-5; Wicking *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 60: 21-6 (1997)). Se cree que la pérdida de función de Ptc provoca una señalización de Smo no controlada en carcinoma de células basales. De manera similar, se han identificado mutaciones de Smo activantes en tumores de BCC esporádicos (Xie *et al.*, Nature 391: 90-2 (1998)), lo que enfatiza el papel de Smo como subunidad de señalización en el complejo receptor para SHh.

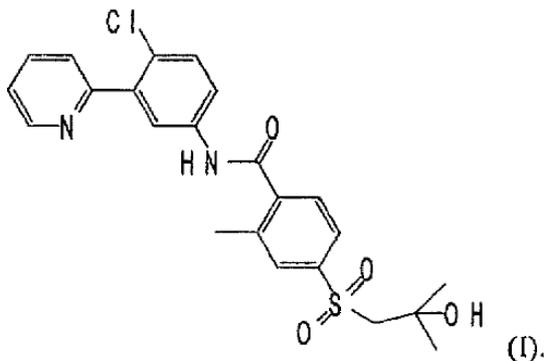
Se han investigado diversos inhibidores de la señalización de hedgehog tales como ciclopamina, un alcaloide natural que se ha mostrado que detiene el ciclo celular en G0-G1 e induce apoptosis en SCLC. Se cree que la ciclopamina inhibe Smo uniéndose a su haz heptahelicoidal. Se ha mostrado que la forskolina inhibe la ruta de Hh posteriormente a Smo activando la proteína cinasa A (PKA) que mantiene los factores de transcripción Gli inactivos.

Particularmente, el documento WO 2006/028958 A2 dio a conocer inhibidores piridilo de la señalización de hedgehog útiles en métodos de tratamiento de cáncer. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que dependiendo de la selección de residuos específicos y de la selección de posiciones de su unión, pueden modificarse de manera impredecible las propiedades del compuesto resultante, por ejemplo puede aumentarse su actividad correspondiente significativamente para que sea útil en métodos de tratamiento de enfermedades respectivas.

A pesar de los avances con los compuestos establecidos anteriormente y otros, sigue existiendo una necesidad de inhibidores potentes de la ruta de señalización de hedgehog.

Sumario de la invención

En un aspecto de la presente invención se proporciona un inhibidor de hedgehog nuevo que presenta la fórmula (I)



A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones el compuesto que presenta la fórmula (I) es idéntico al compuesto mencionado en la reivindicación 1 y sus reivindicaciones dependientes 2 a 9, así como el mencionado en el resumen.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho cáncer está asociado con señalización de hedgehog aberrante.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho cáncer es carcinoma de células basales, meduloblastoma, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de mama, rabdomiosarcoma, cáncer esofágico, cáncer de estómago o cáncer del tracto biliar.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho cáncer es neuroectodérmico, meningioma, hemangioma, glioblastoma, carcinoma de pulmón escamoso, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, condrosarcoma, carcinoma renal, carcinoma de tiroides o un tumor sólido de colon, de pulmón, pancreático, de ovario, de mama o de glioma.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de inhibición de la angiogénesis en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de inhibición de la señalización de la ruta de hedgehog en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización en un método de tratamiento de degeneración macular, degeneración macular húmeda relacionada con la edad, enfermedades inflamatorias/inmunitarias, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de Sjogren, asma, rechazo de trasplante de órganos, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis o esclerosis múltiple o para lograr un efecto depilatorio, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para preparar el compuesto según la fórmula (I) de la invención.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

El compuesto de fórmula (I) de la invención puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos. Por lo tanto, los compuestos pueden existir como diastereómeros, enantiómeros o mezclas de los mismos. La síntesis de los compuestos puede emplear racematos, diastereómeros o enantiómeros como materiales de partida o como productos intermedios. Pueden separarse compuestos diastereoméricos mediante métodos cromatográficos o de cristalización. De manera similar, pueden separarse mezclas enantioméricas utilizando las mismas técnicas u otras conocidas en la técnica. Cada uno de los átomos de carbono asimétricos puede estar en la configuración R o S y ambas de estas configuraciones están dentro del alcance de la invención.

También se describen profármacos del compuesto descrito anteriormente. Los profármacos adecuados incluyen grupos protectores de amino y protectores de carboxilo conocidos que se liberan, por ejemplo se hidrolizan, para producir el compuesto original en condiciones fisiológicas. Una clase particular de profármacos son compuestos en los que un átomo de nitrógeno en un grupo amino, amidino, aminoalquilenamino, iminoalquilenamino o guanidino se sustituye con un grupo hidroxilo (OH), un grupo alquilcarbonilo (-CO-R), un alcóxicarbonilo (-CO-OR), un grupo aciloxialquil-alcóxicarbonilo (-CO-O-R-O-CO-R) en el que R es un grupo monovalente o divalente y tal como se definió anteriormente o un grupo que presenta la fórmula -C(O)-O-CP1P2-haloalquilo, en la que P1 y P2 son iguales o diferentes y son H, alquilo inferior, alcóxilo inferior, ciano, haloalquilo inferior o arilo. Pueden prepararse compuestos de profármaco haciendo reaccionar los compuestos de la invención descritos anteriormente con un compuesto activado con acilo para enlazar un átomo de nitrógeno en el compuesto de la invención al carbonilo del compuesto activado con acilo. Los compuestos de carbonilo activados adecuados contienen un grupo saliente bueno enlazado al carbono del carbonilo e incluyen haluros de acilo, acilaminas, sales de acilpiridinio, alcóxidos de acilo, en particular fenóxidos de acilo tales como p-nitrofenoxiacilo, dinitrofenoxiacilo, fluorofenoxiacilo y difluorofenoxiacilo. Las reacciones son generalmente exotérmicas y se llevan a cabo en disolventes inertes a temperaturas reducidas tales como de -78 a aproximadamente 50°C. Las reacciones se llevan a cabo también habitualmente en presencia de una base inorgánica tal como carbonato de potasio o bicarbonato de sodio, o una base orgánica tal como una amina, incluyendo piridina, TEA, etc. Se describe una manera de preparación de profármacos en el documento USSN 08/843.369 presentado el 15 de abril de 1997 (correspondiente a la publicación PCT WO9846576).

SÍNTESIS

El compuesto de la invención se prepara utilizando técnicas de síntesis orgánica convencionales a partir de materiales de partida y reactivos disponibles comercialmente. Se apreciará que los procedimientos de síntesis empleados en la preparación del compuesto de la invención dependerán de los sustituyentes particulares presentes en un compuesto y que pueden requerirse diversos procedimientos de protección y desprotección tal como es convencional en síntesis orgánica. El compuesto de la invención inhibe la señalización de hedgehog y es útil para aplicarse en métodos de tratamiento de cánceres asociados con señalización de hedgehog aberrante, por ejemplo cuando Patched deja de, o reprime de manera inadecuada, Smoothed (fenotipo de pérdida de función de Ptc) y/o

cuando Smoothened se activa independientemente de la represión por Patched (fenotipo de ganancia de función de Smo). Los ejemplos de tales tipos de cáncer incluyen carcinoma de células basales, tumores neuroectodérmicos tales como meduloblastoma, meningioma, hemangioma, glioblastoma, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de pulmón escamoso, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, condrosarcoma, carcinoma de mama, rhabdomyosarcoma, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer del tracto biliar, carcinoma renal, carcinoma de tiroides. El compuesto de la invención puede administrarse antes de, de manera simultánea con o tras la administración de otros tratamientos anticancerígenos tales como radioterapia o quimioterapia. Los compuestos de quimioterapia citostáticos adecuados comprenden de manera no limitativa (i) antimetabolitos, tales como citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea o metotrexato; (ii) agentes de fragmentación del ADN, tales como bleomicina, (iii) agentes de reticulación del ADN, tales como clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida o mostaza de nitrógeno; (iv) agentes de intercalación tales como adriamicina (doxorubicina) o mitoxantrona; (v) inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina o toxina de la difteria; (vi) venenos de topoisomerasa I, tales como camptotecina o topotecán; (vii) venenos de topoisomerasa II, tales como etopósido (VP-16) o tenipósido; (viii) agentes dirigidos a los microtúbulos, tales como colcemida, colchicina, paclitaxel, vinblastina o vincristina; (ix) inhibidores de cinasa tales como flavopiridol, estaurosporina, STI571 (CPG 57148B) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina); (x) agentes de investigación diversos tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH₃ o inhibidores de farnesiltransferasa (L-739749, L-744832); polifenoles tales como quercetina, resveratrol, piceatanol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavonoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de los mismos; (xi) hormonas tales como glucocorticoides o fenretinida; (xii) antagonistas de hormonas, tales como tamoxifeno, finasterida o antagonistas de LHRH. En una forma de realización particular, se coadministra el compuesto de la presente invención con un compuesto citostático seleccionado del grupo que consiste en cisplatino, doxorubicina, taxol, taxotere y mitomicina C.

En otro aspecto, puede utilizarse el compuesto según la fórmula (I) de acuerdo con la presente invención en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho compuesto puede sensibilizar para o inducir la apoptosis uniéndose a receptores de muerte ("agonistas de receptores de muerte"). Tales agonistas de receptores de muerte incluyen ligandos de receptores de muerte tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de necrosis tumoral β (TNF- β , linfotoxina- α), LT- β (linfotoxina- β), TRAIL (Apo2L, ligando de DR4), ligando de CD95 (Fas, APO-1), ligando de TRAMP (DR3, Apo-3), ligando de DR6 así como fragmentos y derivados de cualquiera de dichos ligandos. En una realización particular, el ligando de receptores de muerte es TNF- α . En otra forma de realización particular, el ligando de receptores de muerte es Apo2L/TRAIL. Además, los agonistas de receptores de muerte comprenden anticuerpos agonistas frente a receptores de muerte tales como anticuerpo anti-CD95, anticuerpo anti-TRAIL-R1 (DR4), anticuerpo anti-TRAIL-R2 (DR5), anticuerpo anti-TRAIL-R3, anticuerpo anti-TRAIL-R4, anticuerpo anti-DR6, anticuerpo anti-TNF-R1 y anticuerpo anti-TRAMP (DR3) así como fragmentos y derivados de cualquiera de dichos anticuerpos.

Para el fin de sensibilizar células para apoptosis, puede utilizarse también el compuesto de la presente invención en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero en combinación con radioterapia. El término "radioterapia" se refiere a la utilización de radiación electromagnética o particulada en el tratamiento de neoplasia. La radioterapia se basa en el principio de que una radiación a alta dosis administrada a una zona diana dará como resultado la muerte de células en reproducción en tejidos tanto tumorales como normales. El régimen de dosificación de la radiación se define generalmente en cuanto a dosis absorbida de radiación (rad), tiempo y fraccionamiento, y debe definirse cuidadosamente por el oncólogo. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de diversas consideraciones incluyendo la ubicación del tumor en relación con otros órganos del cuerpo y el grado en el que el tumor se ha propagado. Se proporcionan ejemplos de agentes radioterápicos en, pero sin limitarse a, radioterapia y se conocen en la materia (Hellman, Principles of Radiation Therapy, Cancer, en Principles I and Practice of Oncology, 24875 (Devita *et al.*, 4ta ed., vol. 1, 1993). Los avances recientes en radioterapia incluyen radiación de haz externo conformal tridimensional, radioterapia de intensidad modulada (IMRT), radiocirugía estereotáctica y braquiterapia (radioterapia intersticial), situando esta última la fuente de radiación directamente en el tumor como "simientes" implantadas. Estas modalidades de tratamiento más nuevas administran mayores dosis de radiación al tumor, lo que explica su eficacia aumentada en comparación con radioterapia de haz externo convencional.

Se considera que la radiación ionizante con radionúclidos de emisión beta es la más útil para aplicaciones radioterápicas debido a la transferencia de energía lineal moderada (LET) de la partícula ionizante (electrón) y a su alcance intermedio (normalmente varios milímetros en tejido). Los rayos gamma administran una dosificación a niveles inferiores a lo largo de distancias mucho mayores. Las partículas alfa representan el otro extremo, administran una dosificación de LET muy alta, pero presentan un alcance extremadamente limitado y deben, por tanto, estar en contacto íntimo con las células del tejido que va a tratarse. Además, los emisores alfa son generalmente metales pesados, lo que limita la química posible y presentan riesgos excesivos de fuga de radionúclido del área que va a tratarse. Dependiendo del tumor que va a tratarse, pueden concebirse todos los tipos de emisores dentro del alcance de la presente invención. Además, la presente invención comprende tipos de radiación no ionizante como por ejemplo radiación ultravioleta (UV), luz visible de alta energía, radiación de microondas (terapia de hipertemia), radiación infrarroja (IR) y láseres. En una forma de realización particular de la presente invención se aplica radiación UV en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero en combinación con la administración de un compuesto que presenta la fórmula (I).

El compuesto de la invención inhibe la angiogénesis y es por tanto útil en un método de tratamiento de enfermedades o estados mediados por angiogénesis tales como tumores, en particular tumores sólidos tales como tumores sólidos de colon, de pulmón, pancreático, de ovario, de mama y de glioma. Además, el compuesto de la invención es útil en un método de tratamiento de degeneración macular por ejemplo degeneración macular húmeda relacionada con la edad. El compuesto de la invención también es útil en un método de tratamiento de enfermedades inflamatorias/inmunitarias tales como enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de Sjogren, asma, rechazo de trasplante de órganos, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis y esclerosis múltiple. El compuesto de la invención además es útil como depilatorio.

La invención también incluye composiciones farmacéuticas o medicamentos que contienen el compuesto de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente terapéuticamente inerte, así como métodos de utilización del compuesto de la invención para preparar tales composiciones y medicamentos. Normalmente, el compuesto de la invención tal como se utiliza en los métodos para el tratamiento de acuerdo con la invención se formula mediante mezclado a temperatura ambiental al pH apropiado y al grado deseado de pureza, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas en una forma de administración galénica. El pH de la formulación depende principalmente de la utilización particular y la concentración de compuesto, pero puede estar comprendido entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8. Una formulación particular es un tampón acetato a pH 5. El compuesto para su utilización en la presente memoria puede estar en una formulación estéril. El compuesto puede almacenarse como una composición sólida, aunque son aceptables disoluciones acuosas o formulaciones liofilizadas.

La composición de la invención se formulará, dosificará y administrará de un modo compatible con la buena práctica médica. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el momento de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad eficaz" del compuesto que va a administrarse estará dictada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para disminuir la señalización de la ruta de hedgehog o si no es la cantidad mínima necesaria para provocar una reducción en tamaño, volumen o masa de un tumor que es sensible a la señalización de hedgehog, o una reducción en el aumento en tamaño, volumen o masa de un tumor de este tipo en relación con el aumento en ausencia de administración del compuesto de la invención. Alternativamente, una "cantidad eficaz" del compuesto significa la cantidad necesaria para reducir el número de células malignas o la velocidad en el aumento del número de células malignas. Alternativamente, una "cantidad eficaz" es la cantidad del compuesto de la invención requerida para aumentar la supervivencia de pacientes aquejados de un tumor sensible a un compuesto contra la ruta de hedgehog. Tal cantidad puede estar por debajo de la cantidad que es tóxica para células normales, o el mamífero en conjunto. Con respecto a indicaciones no malignas, "cantidad eficaz" significa la cantidad de compuesto de la invención requerida para disminuir la gravedad de la indicación particular o síntomas de la misma.

Generalmente, la cantidad farmacéuticamente eficaz inicial del compuesto de la invención administrada por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del paciente al día, por ejemplo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg/día. Las formas farmacéuticas unitarias orales, tales como comprimidos y cápsulas, pueden contener de desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 1000 mg del compuesto de la invención.

El compuesto de la invención puede administrarse mediante cualesquier medios adecuados, incluyendo oral, tópico, transdérmico, parenteral, subcutáneo, rectal, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Un ejemplo de una forma farmacéutica oral adecuada es un comprimido que contiene aproximadamente 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg o 500 mg del compuesto de la invención combinado con aproximadamente 90-30 mg de lactosa anhidra, aproximadamente 5-40 mg de croscarmelosa de sodio, aproximadamente 5-30 mg de polivinilpirrolidona (PVP) K30 y aproximadamente 1-10 mg de estearato de magnesio. En primer lugar se mezclan juntos los componentes en polvo y luego se mezclan con una disolución de la PVP. La composición resultante puede secarse, granularse, mezclarse con el estearato de magnesio y comprimirse hasta proporcionar una forma de comprimido utilizando equipo convencional. Puede prepararse una formulación de aerosol disolviendo el compuesto, por ejemplo 5-400 mg, de la invención en una disolución tampón adecuada, por ejemplo un tampón fosfato, añadiendo un tonificador, por ejemplo una sal tal como cloruro de sodio, si se desea. Se filtra normalmente la disolución, por ejemplo utilizando un filtro de 0,2 micrómetros, para eliminar impurezas y contaminantes. Las formulaciones tópicas incluyen pomadas, cremas, lociones, polvos, disoluciones, óvulos vaginales, pulverizadores, aerosoles y cápsulas. Pueden formularse pomadas y cremas con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes y/o disolventes adecuados. Tales bases pueden incluir agua y/o un aceite tal como una parafina líquida o un aceite vegetal tal como aceite de maní o aceite de ricino o un disolvente tal como un polietilenglicol. Los agentes espesantes que pueden utilizarse incluyen parafina blanda, estearato de aluminio, alcohol cetoestearílico, polietilenglicoles, cera microcristalina y cera de abejas. Pueden formularse lociones con una base acuosa u oleosa y pueden contener uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes de dispersión, agentes de suspensión o agentes espesantes. Pueden formarse polvos para

aplicación externa con la ayuda de cualquier base de polvo adecuada, por ejemplo talco, lactosa o almidón. Pueden formularse gotas con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes de dispersión, agentes solubilizantes o agentes de suspensión.

5 Ejemplos

La invención se describe con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, esto no debe interpretarse como limitativo del alcance de la invención definido mediante las reivindicaciones adjuntas. Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria son las siguientes:

10

BuOH: butanol;

DIPEA: diisopropiletilamina;

DMA: N,N-dimetilacetamida;

DMAP: 4-dimetilaminopiridina;

15

DME: 1,2-dimetoxietano;

DMF: dimetilformamida;

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida;

HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio;

HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución

20

MPLC: cromatografía de líquidos de resolución media

NBS: N-bromosuccinimida;

TEA: trietilamina;

TASF: difluorotrimetilsilicato de tris(dimetilamino)sulfonio;

THF: tetrahidrofurano;

25

EtOH: etanol;

MeOH: metanol;

μl: microlitro

Se obtuvieron comercialmente todos los reactivos a menos que se indique lo contrario. Se realizaron las reacciones utilizando material de vidrio secado en horno bajo una atmósfera de nitrógeno. Se transfirieron líquidos y disoluciones sensibles al aire y la humedad mediante jeringa o cánula de acero inoxidable. Se concentraron las disoluciones orgánicas a presión reducida (aprox. 15 mm Hg) mediante evaporación rotatoria. A menos que se indique lo contrario, se obtuvieron comercialmente todos los disolventes utilizados. Se logró la purificación cromatográfica de los productos mediante la utilización de un instrumento CombiFlash Companion de Isco y medios. Se facilitan los tiempos de reacción sólo para ilustración. Se siguió el transcurso de las reacciones mediante cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). Se realizó la cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas 60 F₂₅₄ (250 μm) de gel de sílice de EM Science. Se logró la visualización del cromatograma desarrollado mediante extinción de fluorescencia. Se adquirieron las CL-EM con un instrumento 10AD LC de Shimadzu en una columna Phenomenex (50 x 4,6 mm, 5 μm) que funcionaba a 3 ml/min. Se utilizó un detector SPD-10A de Shimadzu que monitorizaba a 214 y 254 nm. Se realizó la espectrometría de masas de cuadrupolo único en un espectrómetro de masas de Applied Biosystems. Se adquirieron los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en un espectrómetro Inova de Varian que funcionaba a 400 MHz para ¹H y se relacionó internamente con tetrametilsilano (TMS) en partes por millón (ppm). Se registran los datos para ¹H-RMN tal como sigue: desplazamiento químico (δ, ppm), multiplicidad (s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; t, triplete; q, cuartete; quint, quintete; sext, sextete; hept, heptete; m, multiplete; ma, multiplete ancho) e integración. Se evaluó la estructura y pureza de todos los productos finales mediante al menos una de las técnicas siguientes: CL-EM, RMN, CCF.

30

35

40

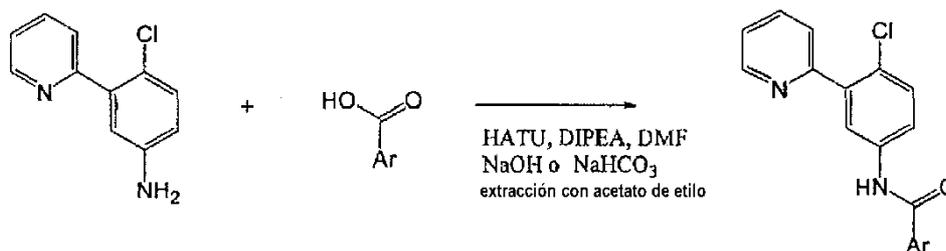
45

Ejemplo 1 Procedimientos generales

50

Se preparó el compuesto del ejemplo 2 a continuación según el siguiente procedimiento general.

A: Acoplamiento de enlace amida con HATU

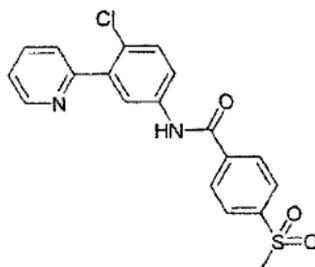


55

Se añadió anilina (1,0 eq.) a una mezcla de ácido carboxílico (1,1 eq.), HATU (1,1 eq.) y DIPEA (2 eq.) en DMF (0,1 – 0,2 M). Tras agitar durante la noche, se diluyó la mezcla de reacción con hidróxido de sodio 0,1 N o NaHCO₃ saturado, se extrajo en acetato de etilo y se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se concentró y se purificó la mezcla en bruto mediante HPLC de fase inversa.

5

Ejemplo 2 (a) N-(4-Cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(etilsulfonil)benzamida

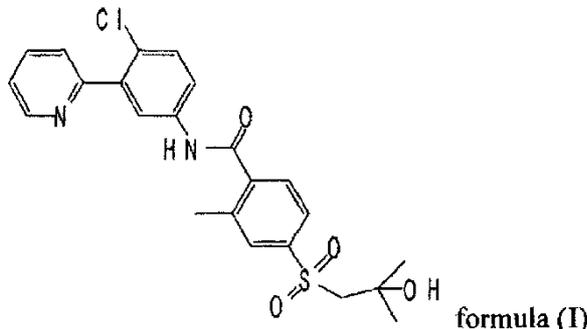


10 Se realizó el procedimiento general A utilizando ácido 4-(etiltio)benzoico y 4-cloro-3-(piridin-2-il)anilina para producir N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(etiltio)benzamida.

15 Se trató con oxona (133 mg, 0,22 mmol) una disolución de N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(etiltio)benzamida (40 mg, 0,11 mmol) en MeOH (3 ml), enfriada hasta 0°C, y se retiró el baño de hielo. Tras 1 h de agitación, se concentró la mezcla de reacción y se disolvió el residuo en acetato de etilo. Se lavó la disolución orgánica con agua, se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó la mezcla de reacción en bruto mediante HPLC de fase inversa para producir N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(etilsulfonil)benzamida. EM (Q1) 401,0 (M)⁺.

20 (b) N-(4-Cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzamida

20



formula (I)

25 2-Cloro-5-nitrodobenceno: Se purgó el reactor utilizado con nitrógeno y se mantuvo bajo nitrógeno durante toda la síntesis. Se cargó el reactor con agua purificada según la USP (400,0 l), se agitó y se cargó con 2-cloro-5-nitroanilina (50,0 kg) y luego se enfrió el contenido hasta 0-5°C. Se cargó el reactor con agitación con ácido sulfúrico concentrado (40,0 l), manteniendo la temperatura a ≤10°C (tiempo de adición ~3-4 h) y se agitó el contenido a 0-5°C durante al menos 15 minutos. En un recipiente separado se preparó una disolución de nitrito de sodio (25,0 kg) y agua purificada según la USP (100,0 l). Se cargó lentamente la disolución de nitrito de sodio en el reactor con agitación manteniendo la temperatura a ≤5°C (emisión de calor y provocó desprendimiento de gas, tiempo de adición ~2 horas) y entonces se agitó el contenido a ≤5°C durante al menos 1 hora. En un recipiente separado se preparó una disolución de yoduro de potasio (60,0 kg) y agua purificada según la USP (240,0 l) y se cargó lentamente en el reactor con agitación manteniendo la temperatura a ≤5°C (emisión de calor, provocó desprendimiento de gas y formación de espuma, tiempo de adición ~7 h). Se apagó gradualmente el enfriamiento permitiendo que la reacción alcanzara la temperatura ambiente (~20°C) y entonces se agitó el contenido durante al menos 18 horas a 15-25°C, y entonces se tomaron muestras de la masa de reacción mediante análisis de HPLC (muestra disuelta en acetonitrilo), cuando restaba ≤5% de 2-cloro-5-nitroanilina se continuó entonces con la siguiente etapa, sin embargo, cuando el nivel del material de partida era ≥5% entonces se tomaron muestras cada hora hasta que la reacción se completó. En un recipiente separado se preparó una disolución de tiosulfato de sodio (30,0 kg) y agua purificada según la USP (600,0 l) y se cargó lentamente ~1/2 de la disolución de tiosulfato de sodio en el reactor con agitación, manteniendo la temperatura a 20-30°C y entonces se agitó el contenido del reactor a 20-30°C durante al menos 20 minutos. Se cargó ciclohexano (300,0 l) en el reactor y se calentó el contenido hasta 55-60°C y se agitó durante al menos 20 minutos a 55-60°C. Se detuvo la agitación para permitir que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos y entonces se separaron (sedimentando la fase orgánica aparte) y se devolvió la fase acuosa al reactor.

40

Se cargó ciclohexano (200,0 l) en el reactor y se agitó a 55-60°C durante al menos 20 minutos y entonces se detuvo la agitación para permitir que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos y entonces se separaron las fases (se mantuvo la fase acuosa para controlar el rendimiento) y se combinaron ambas fases orgánicas de las etapas anteriores de nuevo en el reactor. Se cargó ~1/2 restante de la disolución de tiosulfato de sodio en el reactor con agitación, manteniendo la temperatura a 55-60°C y se agitó durante al menos 20 minutos a 55-60°C. Se detuvo la agitación para permitir que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos y se drenó la fase acuosa del reactor. Entonces se cargó agua purificada según la USP (300,0 l) en el reactor y se agitó durante al menos 20 minutos a 55-60°C y entonces se detuvo la agitación para permitir que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos y se drenó la fase acuosa al desecho. Se calentó el contenido del reactor a -45°C y se retiró ~65% del disolvente mediante destilación a vacío. Entonces se enfrió el contenido del reactor hasta 0-5°C y se permitió que se agitase durante al menos 5 horas y entonces se filtraron los sólidos y se lavó el producto con ciclohexano frío (100,0 l). Se recogió el producto y se secó en un secador de aire caliente a 45 +/- 5°C hasta que LOD era ≤1,0%. El procedimiento produjo 50,0 kg (rendimiento del 61%) de 2-cloro-5-nitroyodobenceno como un sólido amarillo.

2-(2-Piridil)-4-nitroclorobenceno en bruto: Se purgó el reactor con nitrógeno y se mantuvo bajo nitrógeno durante toda la síntesis. Se cargó tolueno (375,0 l) en el reactor y se comenzó la agitación y se cargó cloruro de zinc (19,56 kg) en el reactor. Se separó el contenido del reactor utilizando destilación atmosférica hasta ~50% del volumen original y entonces se enfrió hasta ≤30°C. Se cargó lentamente THF (100,0 l) en el reactor (la adición fue exotérmica).

Preparación de reactivo de Grignard en el reactor 2: Se purgó el reactor con nitrógeno y se mantuvo bajo nitrógeno durante toda la síntesis. Se comenzó la agitación y se cargó THF (50,0 l) en el reactor. Se laminó cloruro de isopropilmagnesio (89,0 kg, ajustado tras la valoración) en tambor para mezclar y entonces se añadió lentamente, manteniendo la temperatura a ≤30 (exotérmica, tiempo de adición 30-40 min). Se cargó lentamente 2-bromopiridina (22,3 kg) en el reactor manteniendo la temperatura a ≤30°C (exotérmica, tiempo de adición 50-60 min). Se calentó el contenido del reactor hasta 50 +/- 5°C y se mantuvo durante al menos 1 hora. Se cargó lentamente la disolución de Grignard (del reactor 2) en el reactor (de la etapa anterior) manteniendo la temperatura a ≤55°C (la adición exotérmica provocó formación de espuma, tiempo de adición ~20 min). Entonces se agitó el reactor a 50 +/- 5°C al menos 1 hora mientras se mantenía la temperatura. Se cargó diclorobistrifenilfosfinapaladio (2,0 kg) en el reactor y se agitó durante ~15 minutos. Se cargó trifenilfosfina (2,75 kg) en el reactor y se agitó durante ~15 minutos. Se cargó lentamente 2-cloro-5-nitroyodobenceno (25,0 kg) en el reactor con agitación (tiempo de adición de 15 minutos). Se calentó el contenido del reactor hasta 60 +/- 5°C y se agitó durante al menos 14 horas a 60 +/- 5°C, entonces se tomaron muestras de la masa de reacción para análisis de HPLC. Cuando la cantidad del material de partida era ≥4% se continuó calentando y se tomaron muestras de nuevo cada hora hasta que el nivel del material de partida resultó inferior a 4%. Se enfrió la mezcla de reacción hasta ~55°C y entonces se calentó el contenido del reactor a reflujo a vacío y se retiraron 75-90 l de disolvente. Se cargó tolueno (120,0 l) en el reactor mientras se agitaba. En un tanque separado, se disolvió el cloruro de amonio (25,0 kg) en agua purificada según la USP (250,0 l) y se cargó lentamente la disolución en el reactor y se agitó durante al menos 30 minutos. Se filtró la mezcla a través de un filtro Nutsche (preparado con Celite (6,25 kg) y agua purificada según la USP (12,5 l)) y se lavó la torta de filtro con tolueno (75,0 l) y se añadió el filtrado y se lavó al interior de un reactor limpio. Se permitió que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos y entonces se separaron (la fase orgánica contenía el producto) y se devolvió la fase acuosa al reactor. Se cargó tolueno (75,0 l) en el reactor y se agitó durante al menos 15 minutos y entonces se permitió que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos antes de la separación (la fase orgánica contenía el producto). Se cargaron las fases orgánicas de las etapas anteriores en un reactor limpio. Se cargó agua purificada según la USP (125,0 l) en el reactor y se agitó durante al menos 15 minutos y entonces se permitió que las fases se sedimentaran durante al menos 10 minutos antes de drenar la fase acuosa y mantener para controlar el rendimiento.

En un tanque separado, se preparó una disolución de ácido clorhídrico 3 N mezclando ácido clorhídrico concentrado (127,5 l) y agua purificada según la USP (272,5 l). Se cargó aproximadamente 1/3 del ácido clorhídrico 3 N (133,3 l) en el reactor y se agitó durante al menos 30 minutos. Se permitió que las fases se sedimentaran durante al menos 15 minutos y entonces se drenó la fase acuosa y se transfirió a un recipiente separado (el producto estaba en la fase acuosa). Se cargó aproximadamente 1/3 del ácido clorhídrico 3 N (133,3 l) en el reactor y se agitó durante al menos 30 minutos. Se permitió que las fases se sedimentaran durante al menos 15 minutos y entonces se drenó la fase acuosa y se transfirió a un recipiente separado (el producto estaba en la fase acuosa). Se cargó aproximadamente 1/3 del ácido clorhídrico 3 N (133,3 l) en el reactor y se agitó durante al menos 30 minutos. Se permitió que las fases se sedimentaran durante al menos 15 minutos y entonces se drenó la fase acuosa y se transfirió a un recipiente separado (el producto estaba en la fase acuosa). Se transfirieron las fases acuosas de las etapas anteriores a un reactor limpio en el que se cargó carbono activado (1,0 kg) y entonces se calentó hasta 50 +/- °C y se agitó durante al menos 30 minutos. Se filtró la mezcla a través de un filtro Nutsche (preparado con Celite (5,0 kg) y agua purificada según la USP (12,5 l)) y se lavó la torta de filtro con ácido clorhídrico 3 N (40,0 l) y se añadió el filtrado y se lavó al interior de un reactor limpio. Se filtraron con pulido las disoluciones acuosas combinadas a través de un filtro de 1 micrómetro al interior de un reactor limpio y se enfriaron hasta ≤10°C. Se cargó lentamente hidróxido de amonio (115,0 l) en el reactor, ajustando el pH a entre 8,5 y 9,0 (tiempo de adición 4,25 horas). Se ajustó la temperatura de

reacción hasta 25-30°C y se permitió que la mezcla se agitase durante 30 minutos. Entonces se centrifugó la mezcla de reacción y se lavó el producto con agua purificada según la USP (300,0 l) y se secó en un secador de aire caliente a 50-60°C. El procedimiento produjo 15,0 kg (72%) de 2-(2-piridil)-4-nitroclorobenceno en bruto.

5 Purificación de 2-(2-piridil)-4-nitroclorobenceno – Se purgó el reactor con nitrógeno y se mantuvo bajo nitrógeno durante toda la síntesis. Se cargó diclorometano (400,0 l) en el reactor y se comenzó la agitación. Se cargó 2-(2-piridil)-4-nitroclorobenceno en bruto (40,0 kg) en el reactor y se agitó a 20-30°C durante al menos 30 minutos y se controló para observar si todos los sólidos se disolvían. Se cargó gel de sílice (20,0 kg) en el reactor y se agitó durante al menos 2 horas. Se filtró la mezcla a través de un filtro Nutsche (preparado con Celite (14,8 kg) y diclorometano (14,8 l)) y se lavó la torta de filtro con diclorometano (80,0 l) y se añadió el filtrado y se lavó al interior de un reactor limpio. Se calentó el contenido del reactor a reflujo a vacío y se retiró el 80-90% del disolvente y entonces se enfrió hasta 20-30°C y entonces se cargó n-hexano (240,0 l) en el reactor que se agitó durante al menos 2 horas a 20-30°C. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó con n-hexano (80,0 l) y se secó el producto en un secador de aire caliente a 50-55°C. El procedimiento produjo 34,5 kg (recuperación del 86%) de 2-(2-piridil)-4-nitroclorobenceno como un sólido beis.

4-Cloro-3-(piridin-2-il)anilina: Se cargó 2-(2-piridil)-4-nitroclorobenceno en un reactor dimensionado adecuadamente bajo nitrógeno. Se añadió platino sobre carbono (al 5%, ~50% húmedo) (0,10 peso) con agitación, seguido por tetrahidrofurano (9,68 peso). Se presurizó el reactor con nitrógeno hasta 40 psi, entonces se liberó la presión. Se repitió este procedimiento dos veces adicionales. Entonces se presurizó el reactor con hidrógeno hasta 50 psi mientras se mantenía la temperatura interna a 20-26°C. Tras disminuir la captación de hidrógeno (1-2 horas), se mantuvo la presión a 50 psi y se calentó el reactor hasta 50°C durante 2-3 horas. Se controló la reacción mediante HPLC y una vez que se completó, se enfrió hasta 30°C. A continuación, se presurizó el reactor con nitrógeno hasta 40 psi, entonces se liberó la presión. Se repitió este procedimiento dos veces adicionales. En un tanque separado, se añadieron Celite (0,1 peso) y tetrahidrofurano (0,9 peso). Entonces se transfirió esta suspensión al reactor y se agitó durante un mínimo de 30 minutos. Se filtró la mezcla de reacción a través de un filtro prensa y filtro de 0,2 micrómetros, se lavó la torta con tetrahidrofurano (2,2 peso) y se combinaron todas las fases orgánicas. Se cargó gel de sílice con tiol (0,05 peso) en el reactor y se agitó durante al menos 30 minutos. Entonces se filtró esta mezcla a través de un filtro prensa al interior de un reactor purgado con nitrógeno adyacente. Se lavó la torta de filtro con tetrahidrofurano (2,2 peso) y se añadió el lavado de nuevo al reactor. Con agitación, se añadieron heptanos (6,8 peso) al reactor y se calentó el contenido a reflujo a vacío. Se retiraron aproximadamente dos tercios del disolvente mediante destilación a vacío. Se enfrió el reactor hasta 20-26°C y agitó durante 2-3 horas. Se centrifugó el contenido del reactor y se lavó con heptanos (1,0 peso) y se secó en un horno de vacío a 20-25°C hasta que se obtuvo un peso constante de 4-cloro-3-(piridin-2-il)anilina (rendimiento típico ~80%).

35 N-(4-Cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzamida – Se cargó tetrahidrofurano (10,24 peso) en un reactor dimensionado adecuadamente bajo nitrógeno. Mientras se agitaba, se añadieron ácido 4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzoico (1,265 peso) y 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (0,815 peso) y se agitó hasta que se disolvieron. Se cargó lentamente 4-metilmorfolina (0,564 peso) en el reactor mientras se mantenía la temperatura interna a $\leq 30^\circ\text{C}$. Se permitió que la mezcla se agitase a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, entonces se tomaron muestras mediante CCF. Una vez que se consumió todo el ácido 4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzoico, se añadió 4-cloro-3-(piridin-2-il)anilina (1,0 peso). Se calentó el reactor hasta 50°C y se agitó durante al menos 6 horas, momento en el que se tomaron muestras de la reacción mediante HPLC. Una vez que se completó la reacción mediante HPLC, se añadió una disolución de bicarbonato de sodio (bicarbonato de sodio (0,506 peso) y agua purificada según la USP (24,8 peso), agitada hasta que todos los sólidos se disolvieron) a la reacción. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo (~70°C) y se destiló el disolvente (5,7 peso) del reactor. Se enfrió el reactor hasta $\leq 30^\circ\text{C}$ y se agitó durante al menos 20 horas. Se centrifugó el contenido del reactor, se lavó con agua purificada según la USP (3,47 peso) y se secó en un horno de vacío a 45°C hasta que se obtuvo un peso constante de N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzamida en bruto (rendimiento típico ~90%).

55 Se cargó metilisobutilcetona (20,0 peso) en un reactor dimensionado adecuadamente bajo nitrógeno. Mientras se agitaba, se añadió N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzamida en bruto (1,0 peso) y se calentó el reactor hasta 60°C y se agitó durante al menos una hora. Se filtró con pulido la disolución a través de un filtro prensa en un reactor purgado con nitrógeno adyacente y se lavó la torta con metilisobutilcetona (2,56 peso). Entonces se calentó la disolución filtrada a reflujo (~115°C) y se destiló para retirar ~2/3 del disolvente (~14,5 peso). Se enfrió el reactor hasta 100°C y se agitó durante al menos 15 minutos. Entonces se enfrió el reactor hasta 80°C y se ajustó la velocidad del extremo del agitador a 2,0 m/s. Se preparó una suspensión de simiente mezclando N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzamida forma A (0,001 peso) y metilisobutilcetona (0,008 peso). Se añadió esta suspensión de simiente al reactor a 80°C y se agitó durante al menos 2,5 horas. Se ajustó la temperatura del baño a 70°C y se agitó el contenido hasta que la temperatura interna alcanzó 70°C. Se ajustó la temperatura del baño a 50°C y se agitó el contenido hasta que la temperatura interna alcanzó 50°C. Se ajustó la temperatura del baño a 25°C y se agitó el contenido hasta que la temperatura interna alcanzó 15-30°C. Una vez que se obtuvo esta temperatura, se agitó la mezcla durante al menos 12 horas. En un tanque separado, se preparó una disolución cargando metilisobutilcetona (3,0 peso) y heptanos (2,6 peso). Se

65

centrifugó el contenido del reactor, se lavó con la mezcla de metilisobutilcetona/heptanos (todo) y se secó en un horno de vacío a 60°C hasta que se obtuvo un peso constante de N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(2-hidroxi-2-metilpropilsulfonil)-2-metilbenzamida purificada. Se molieron los sólidos utilizando un molinillo Fitzmill utilizando un tamiz de 18 de malla, martillos delanteros en baja velocidad (rendimiento típico ~80%).

5 Ejemplo 3 Ensayos de inhibición de la señalización de hedgehog

10 Líneas celulares indicadoras de ratón - Células 10T1/2-GliLuc [S12] (derivadas a partir de la línea celular C3H10T1/2 n° de la ATCC CCL-226); fibroblastos embrionarios de ratón); medio de crecimiento: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina 10 unidades/ml, estreptomicina 100 ug/ml, glutamina 2 mM y HEPES 10 mM.

15 Líneas celulares indicadoras de ser humano - Células HEPM-GliLuc [MZ24] (derivadas a partir de HEPM, mesénquima palatino embrionario humano n° de la ATCC CRL-1486); medio de crecimiento: medio mínimo esencial (MEM; con sales de Earle) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10-20%, penicilina 10 unidades/ml, estreptomicina 100 ug/ml, glutamina 2 mM y HEPES 10 mM pH 7,2.

Sonic hedgehog - Conjugado octilado N-terminal de SHh humano recombinante.

20 Placas de microtitulación (MTP) – Para el ensayo de luciferasa se siembran en placa las células en MTP de 96 pocillos (blancas, de fondo plano, vista transparente).

25 Medio de ensayo de luciferasa - DMEM complementado con FBS al 0,5%, penicilina 10 unidades/ml, estreptomicina 100 ug/ml, glutamina 2 mM y HEPES 10 mM pH 7,2.

Mezcla de PBS/Ca/Mg - Solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con CaCl₂ 0,5 mM y MgCl₂ 1 mM.

30 Procedimiento de ensayo

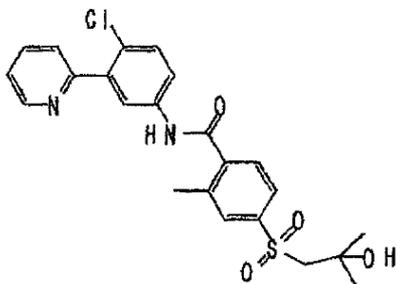
Se mantuvieron células s12 y MZ24 modificadas genéticamente para contener un gen indicador de luciferasa dirigido por el promotor Gli sensible a hedgehog sobre placas de cultivo tisular en medio de crecimiento a 37°C y el 5% de CO₂. Se realizaron pases de los cultivos celulares a subconfluencia cada 3-4 días (de 1:20 a 1:40 para s12; de 1:3 a 1:10 para MZ24). Se recogieron las células y se diluyeron en medio de crecimiento de modo que pudieron colocarse en una placa de microtitulación a 10.000-20.000 células (s12) o 20.000-30.000 células (MZ24), por 100 ul, por pocillo. Se incubaron adicionalmente las células durante ~24-48 horas a 37°C y el 5% de CO₂.

40 Después de ~24-48 horas de incubación se sustituyó el medio de crecimiento en las placas de microtitulación por medio de ensayo de luciferasa (100 ul por pocillo), con y sin conjugado de Sonic hedgehog-octilo, a 0,1-0,3 ug/ml (s12) o 0,5-1,0 ug/ml (MZ24), y compuestos de prueba. Entonces se incubaron adicionalmente las células durante y 24 h adicionales.

45 Entonces se sometieron las placas de microtitulación al kit de ensayo de gen indicador de luciferasa (LucLite™), con modificaciones en el procedimiento del fabricante en el que se retiró el medio y se reconstituyó el sustrato con PBS/Ca/Mg:tampón de lisis 1:1 en lugar del tampón de lisis solo. En resumen, se mezcló 1:1 el PBS/Ca/Mg con tampón de lisis y se añadieron 10 ml a cada vial de sustrato (del kit de ensayo 1000). Entonces se desechó el medio de ensayo de la placa de microtitulación, y se añadieron 100 ul de esta mezcla de sustrato a cada pocillo. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y entonces se determinaron las unidades relativas de luz (RLU), que representan el nivel de expresión relativo del gen indicador de luciferasa, con un lector Topcount (Packard) o un lector Analyst (Molecular Devices). Los compuestos de la invención sometidos a prueba en 50 los ensayos demostraron una expresión de Gli reducida en las líneas celulares indicadoras indicando la inhibición de señalización de la ruta de hedgehog.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula



5

2. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

10 3. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho cáncer está asociado con la señalización de hedgehog aberrante.

4. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho cáncer es carcinoma de células basales, meduloblastoma, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de mama, rabdomyosarcoma, cáncer esofágico, cáncer de estómago o cáncer del tracto biliar.

5. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho cáncer es neuroectodérmico, meningioma, hemangioma, glioblastoma, carcinoma de pulmón escamoso, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, condrosarcoma, carcinoma renal, carcinoma de tiroides o un tumor sólido de colon, de pulmón, pancreático, de ovario, de mama o de glioma.

6. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de inhibición de la angiogénesis en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

7. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de inhibición de la señalización de la ruta de hedgehog en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

8. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización en un método de tratamiento de degeneración macular, degeneración macular húmeda relacionada con la edad, enfermedades inflamatorias/inmunitarias, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de Sjogren, asma, rechazo de trasplante de órganos, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis o esclerosis múltiple o de obtención de un efecto depilatorio, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

9. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.