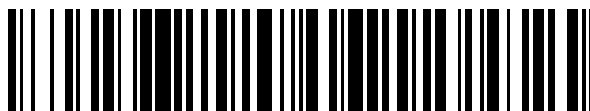


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 466**

51 Int. Cl.:

A01N 43/42 (2006.01)

A61K 31/4355 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

C07J 69/00 (2006.01)

C07D 491/04 (2006.01)

C07D 491/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2007 E 07870001 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2096917**

54 Título: **Análogos de ciclopamina**

30 Prioridad:

28.12.2006 US 878018 P

01.06.2007 US 941596 P

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

27.08.2014

73 Titular/es:

INFINITY DISCOVERY, INC. (100.0%)

780 MEMORIAL DRIVE

CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

AUSTAD, BRIAN;

JANARDANANNAIR, SOMARAJANNAIR;

LESCARBEAU, ANDRE;

TREMBLAY, MARTIN;

BEHNKE, MARK L.;

CASTRO, ALFREDO C.;

CHARETTE, ANDRE B.;

GROGAN, MICHAEL J. y

PELUSO, STEPHANE

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 488 466 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

Análogos de ciclopamina.

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de USSN 60/878,018, presentada el 28 de diciembre de 2006, y USSN 60/941,596, presentada el 1 de junio de 2007.

10 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a análogos de la ciclopamina y composiciones farmacéuticas de éstos. Se describen métodos para preparar tales análogos y composiciones. Estos compuestos y composiciones son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por la vía hedgehog, tales como el cáncer.

La inhibición de la vía hedgehog en ciertos tipos de cánceres se ha demostrado que resulta en la inhibición del crecimiento del tumor. Por ejemplo, los anticuerpos anti-hedgehog han demostrado antagonizar la función de la vía hedgehog e inhibir el crecimiento de tumores. La inhibición de molécula pequeña de actividad de la vía de hedgehog también se ha demostrado que resulta en la muerte celular en un número de tipos de cáncer.

La investigación en esta área se ha centrado principalmente en la elucidación de la biología de la vía hedgehog y el descubrimiento de nuevos inhibidores de la vía hedgehog. Aunque se han identificado inhibidores de la vía hedgehog, todavía existe la necesidad de identificar inhibidores más potentes de la vía hedgehog.

La publicación PCT WO 2006/026430 publicada el 9 de marzo de 2006 y asignada al mismo solicitante de la presente solicitud, describe una amplia variedad de análogos de la ciclopamina, centrándose en los que tienen insaturación en el anillo A o B. En la presente solicitud, los análogos sorprendentemente potentes contienen anillos completamente saturados A y B.

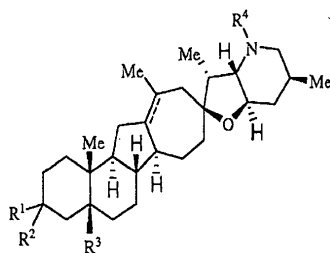
30 Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Las materias principales que no están comprendidas en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

La presente invención se relaciona con análogos de alcaloides esteroideos, tales como la ciclopamina, composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos como se define en las reivindicaciones. Se describen métodos para preparar estos compuestos. En una modalidad, la presente invención se relaciona con un compuesto representado por la siguiente estructura:

40

45



50

o una sal farmacéuticamente aceptable de este;

en donde R^1 es H, alquilo, cicloalquilo, $-OR$, amino, sulfonamido, sulfamido, $-OC(O)R^5$, $-N(R^5)C(O)R^5$, o un azúcar;

R^2 es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, nitrilo, heterocicloalquilo o heteroarilo;

o R^1 y R^2 tomados juntos forman $=O$, $=S$, $=N(OR)$, $=N(R)$, $=N(NR_2)$, $=C(R)_2$;

R^3 es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, o alquinilo;

R^4 es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, haloalquilo, $-OR^5$, $-C(O)R^5$, $-CO_2R^5$, $-SO_2R^5$, $-C(O)N(R^5)(R^5)$, $-[C(R)_2]_qR^5$, $-[(W)-N(R)C(O)]_qR^5$, $-[(W)-C(O)]_qR^5$, $-[(W)-C(O)O]_qR^5$, $-[(W)-OC(O)]_qR^5$, $-[(W)-SO_2]_qR^5$, $-[(W)-N(R^5)SO_2]_qR^5$, $-[(W)-C(O)N(R^5)]_qR^5$, $-[(W)-O]_qR^5$, $-[(W)-N(R)]_qR^5$, $-W-NR_3^+X^-$ o $-[(W)-S]_qR^5$;

en donde cada W es independientemente un biradical seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, y grupos divalentes heteroaralquilo;

cada q es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, o 6;

X⁻ es un haluro;

cada R⁵ es independientemente H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo o [C(R)₂]_p-R⁶; en donde p es 0-6; o cualquiera de las apariciones de R⁵ pueden tomarse juntas para formar un anillo opcionalmente sustituido de 4-8 miembros que contiene 0-3 heteroátomos seleccionados de N, O, S, y P;

cada R⁶ es independientemente hidroxilo, -N(R)COR, -N(R)C(O)OR, -N(R)SO₂(R), -C(O)N(R)₂, -OC(O)N(R)(R), -SO₂N(R)(R), -N(R)(R), -COOR, -C(O)N(OH)(R), -OS(O)₂OR, -S(O)₂OR, -OP(O)(OR)(OR), -NP(O)(OR)(OR), o -P(O)(OR)(OR); y

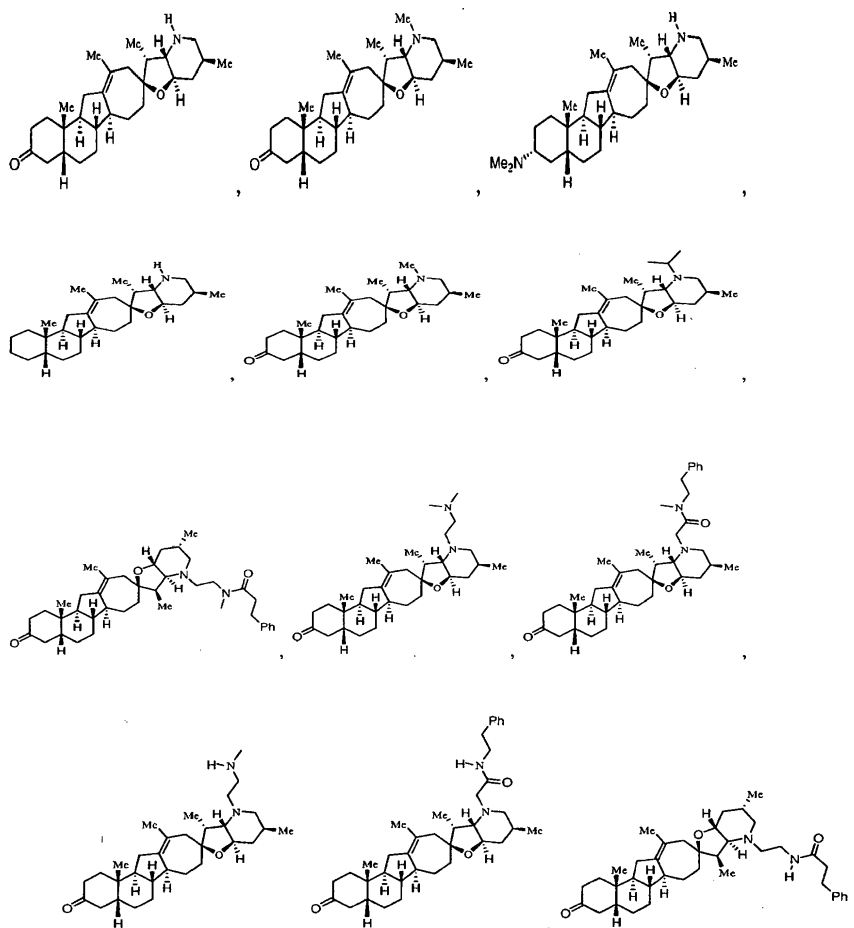
cada R es independientemente H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, aralquilo o heteroaralquilo;

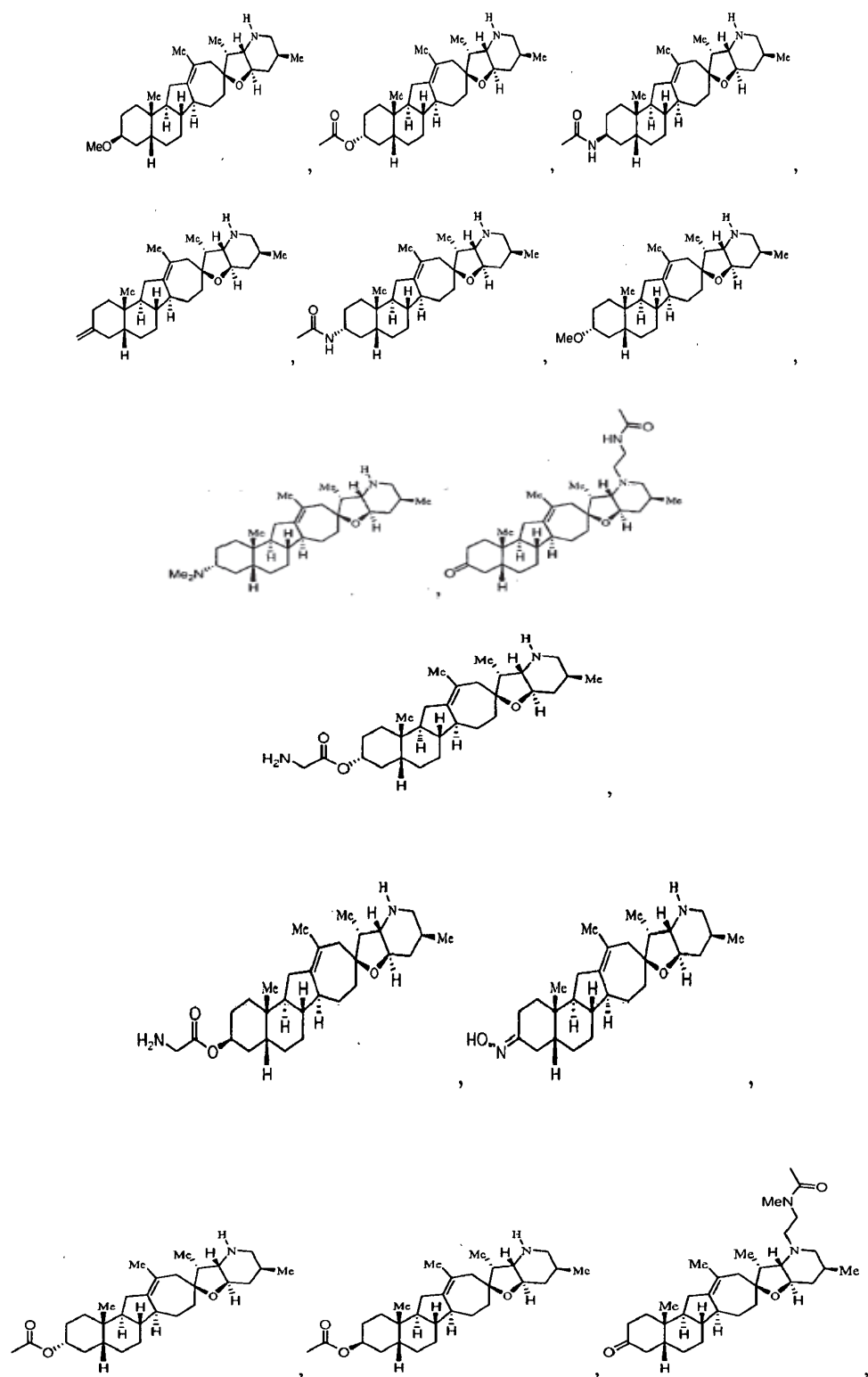
siempre y cuando R², R³, y R⁴ sean H; R¹ no es hidroxilo o un azúcar; además

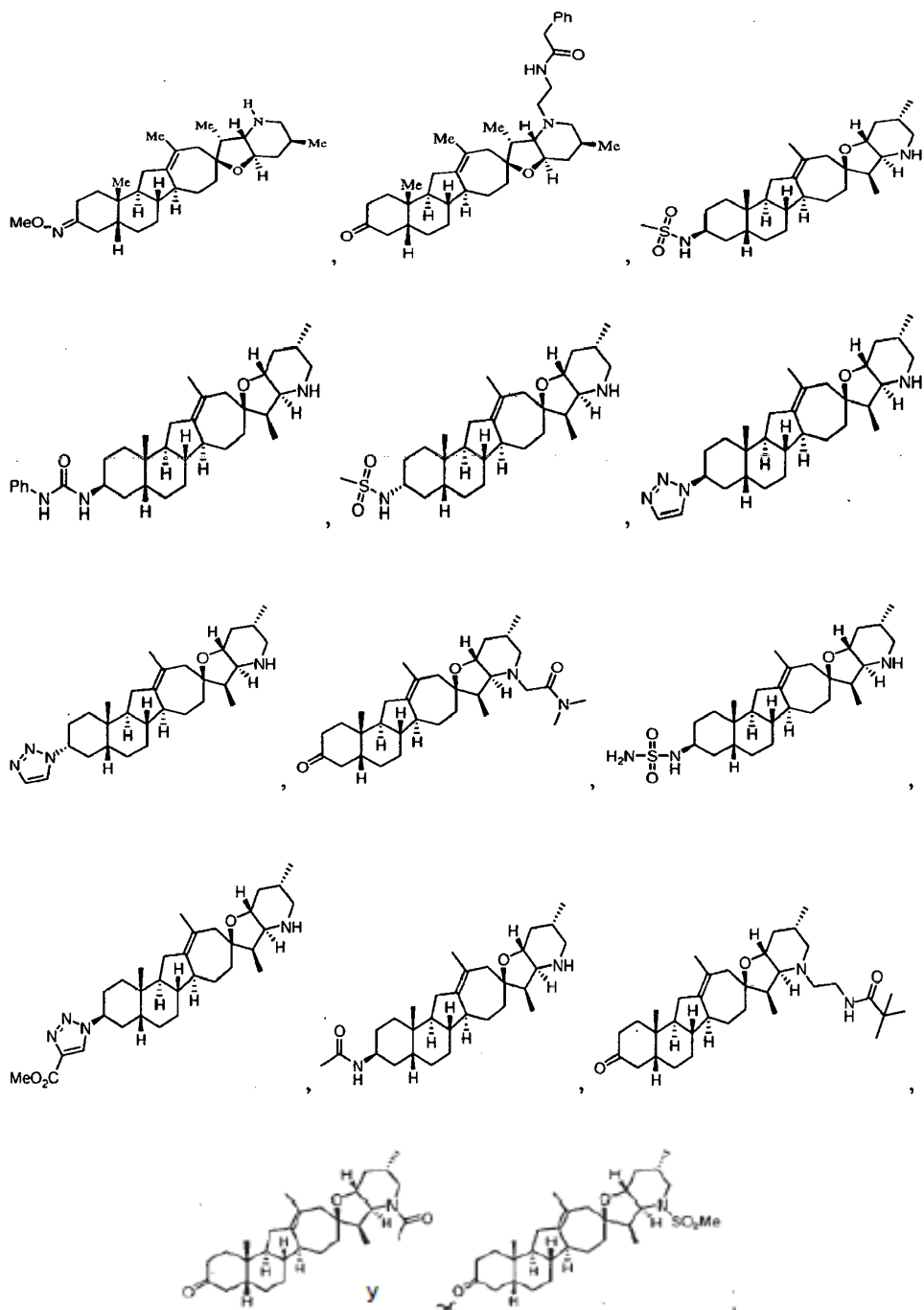
siempre y cuando R⁴ es hidroxilo, entonces R¹ no es un azúcar o hidroxilo, y R¹ y R² no son C=O.

En ciertas modalidades, R¹ es H, hidroxilo, alcoxilo, ariloxi, o amino. En otras modalidades, R¹ y R² tomados juntos conjuntamente con el carbono al cual están unidos, forman =O, =N(OR), o =S. En otras modalidades, R³ es H y/o R⁴ es H, alquilo, hidroxilo, aralquilo, -[C(R)₂]_q-R⁵, -[(W)-N(R)C(O)]_qR⁵, -[(W)-N(R)SO₂]_qR⁵, -[(W)-C(O)N(R)]_qR⁵, -[(W)-O]_qR⁵, -[(W)-C(O)]_qR⁵, o -[(W)-C(O)O]_qR⁵. En otros aspectos, R¹ es H u -OR, R² es H o alquilo, y R es H. En otros, R² es H o alquilo, R³ es H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, o aralquilo; y/o R⁴ es H, alquilo, aralquilo, -[(W)-N(R)C(O)]_qR⁵, -[(W)-N(R)SO₂]_qR⁵, -[(W)-C(O)N(R)]_qR⁵, -[(W)-O]_qR⁵, -[(W)-C(O)]_qR⁵, o -[(W)-C(O)O]_qR⁵. En otras modalidades, R¹ es sulfonamido.

En otra modalidad, la presente invención se relaciona con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



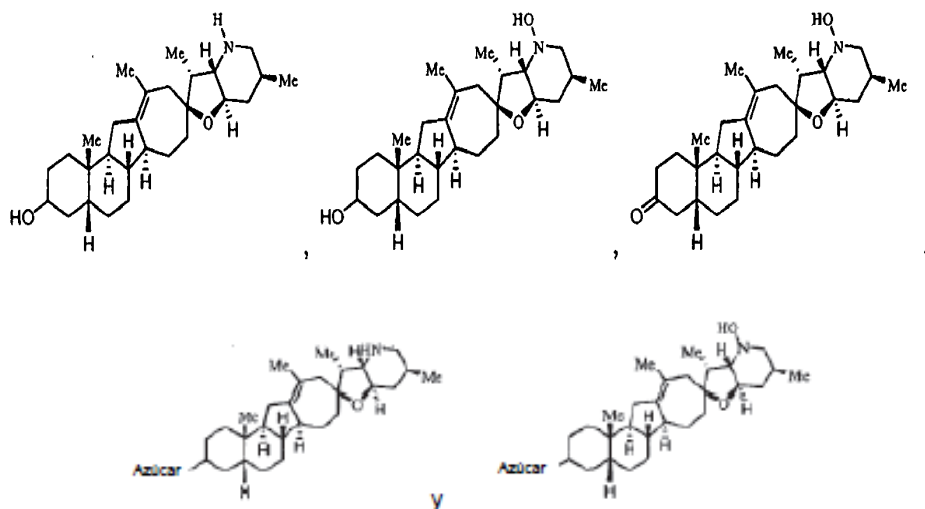




o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunos aspectos, los compuestos mencionados anteriormente son aislados.

En otros aspectos, se describe un compuesto aislado seleccionado del grupo que consiste en:

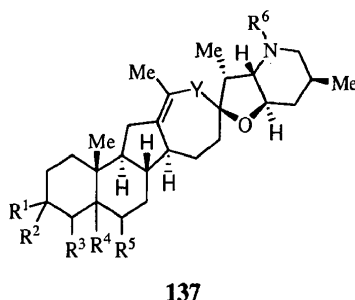


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunos aspectos, los compuestos anteriores son empíricamente puros y/o aislados.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que incluye cualquiera de los compuestos anteriormente mencionados, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se describen métodos para preparar un compuesto de la fórmula **137**:



en donde

Y es CR^7R^8 ;

R^1 es H, alquilo, amino, hidroxilo, carboxilo, carbamoilo, alcoxi, hidroxilo, azúcar o un grupo hidroxilo protegido;

R^2 es H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, nitrilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; o R^1 y R^2 tomados juntos forman $=O$, $=S$, $=N(OR^9)$, $=N(R^9)$, $=C(R^9)_2$, o $=N(N(R^9)_2)$;

cada uno de R^3 , R^4 , y R^5 es, independientemente, H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; o R^3 y R^4 o R^4 y R^5 tomados juntos forman un enlace;

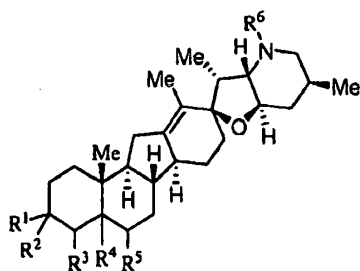
R^6 es H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, haloalquilo, $-OR^9$, $-C(O)R^9$, $-CO_2R^9$, $-SO_2R^9$, $-C(O)N(R^9)(R^9)$, $-[C(R^9)_2]_qR^9$, $-[(W)-N(R^9)C(O)]_qR^9$, $-[(W)-C(O)]_qR^9$, $-[(W)-C(O)O]_qR^9$, $-[(W)-OC(O)]_qR^9$, $-[(W)-SO_2]_qR^9$, $-[(W)-N(R^9)SO_2]_qR^9$, $-[(W)-C(O)N(R^9)]_qR^9$, $-[(W)-O]_qR^9$, $-[(W)-N(R^9)]_qR^9$, $-[(W)-S]_qR^9$, o un grupo protector de nitrógeno;

en donde cada W es, independientemente, un biradical que, en una cierta modalidad, es un biradical alquenoilo que tiene 1-6 átomos de carbono;

cada q es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, o 6;

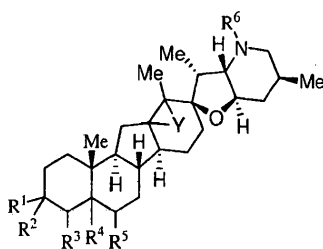
cada uno de R^7 y R^8 es, independientemente, H, alquilo, alquenoilo, arilo, nitrilo, amido, haluro, o éster; y

cada R^9 es independientemente H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo. El proceso incluye las etapas de: primero contactar un compuesto de la fórmula 137a con un agente de ciclopropanación de fosfato haloalquilo de cinc;

**137a**

en donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 son como se definen en el compuesto 137; para formar un compuesto con la fórmula 137b

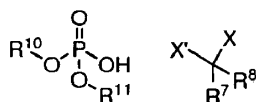
**137b**

en donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y Y son como se definen en el compuesto 137; y después poner en contacto el compuesto de la fórmula **137b** con un ácido para dar un compuesto de la fórmula **137**.

En algunos aspectos, R^7 y R^8 pueden ser ambos H; en otros aspectos R^1 puede ser un hidroxilo protegido; y/o R^6 es un grupo protector de nitrógeno.

En algunos aspectos, el agente de ciclopropanación fosfato de haloalquilcinc se forma al combinar a ácido fosfórico de la fórmula **141a**, un dialquilo de cinc, y un dihaloalquilano de la fórmula **141b**:

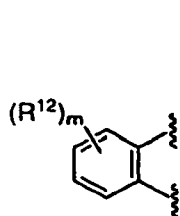
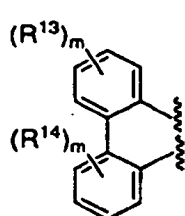
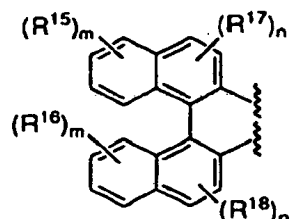
**141a****141b**

en donde

cada uno de X y X' es, independientemente, cloruro, bromuro, o yoduro;

cada uno de R^7 y R^8 es, independientemente, H, alquilo, haluro, amido, nitro, o éster;

cada uno de R^{10} y R^{11} tomad

**141c****141d****141e**

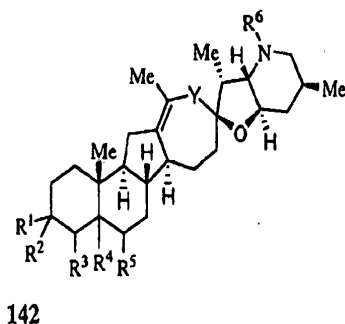
o aralquilo; o

en donde

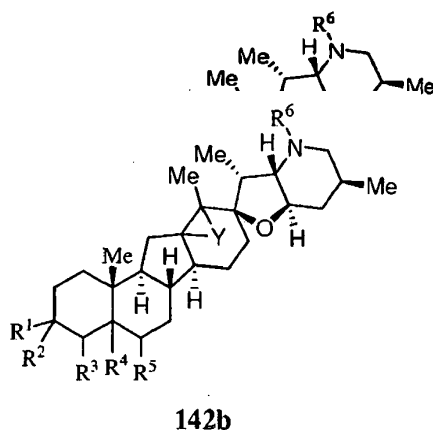
m es, independientemente para cada aparición, 0, 1, 2, 3, o 4; n es, independientemente para cada aparición, 0, 1, o 2; y cada uno de R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} y R^{18} es, independientemente, alquilo, arilo, aralquilo, o haluro.

en una cierta modalidad, R^{10} y R^{11} son cada uno, 2,6-dimetilfenilo.

En otro aspecto, se describe un proceso para preparar un compuesto de la fórmula 142:



El proceso incluye las etapas de poner en contacto un compuesto de la fórmula 142a con un agente de ciclopropanación para formar un compuesto de la fórmula 142b; y



combinar el compuesto de la fórmula **142b** con un ácido para dar el compuesto de la fórmula **142**; en donde

Y es CR⁷R⁸; R¹ es un grupo hidroxilo protegido;

R² es H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; cada uno de R³, R⁴, y R⁵ es, independientemente, H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; o

R³ y R⁴ o R⁴ y R⁵ tomados juntos forman un enlace; R⁶ es a grupo protector de nitrógeno;

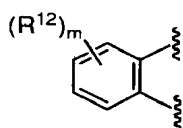
cada uno de R⁷ y R⁸ es, independientemente, H, alquilo, alquenoilo, arilo, nitrilo, amido, haluro, o éster; y

cada R⁹ es, independientemente, H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo.

En algunos aspectos, R⁷ y R⁸ pueden ser ambos H; en otros aspectos el grupo hidroxilo protegido puede ser un éster o un carbonato; el nitrógeno protector puede ser un carbamato o una amida; R⁷ y R⁸ pueden ser ambos H y el nitrógeno protector puede ser un carbamato o una amida; R² y R³ pueden ser H y R⁴ y R⁵ tomados juntos pueden formar un enlace y/o el agente de ciclopropanación se genera a partir de un dihaloalcano y una especie metálica (por ejemplo, dialquilo de cinc o un par cinc cobre).

En ciertos aspectos el agente de ciclopropanación se genera a partir de una especie de dihaloalcano y una especie de dialquilo de cinc, y una especie de ácido fosfórico o una sal de este. La especie de ácido fosfórico puede tener una estructura de la fórmula **151**:

cada uno de R¹⁰ y R¹¹ es independientemente alquilo, alquenoilo, aralquilo, arilo, heteroarilo, heteroaralquilo; o R¹⁰ y R¹¹ tomados juntos tienen la fórmula **151a**, **151b**, o **151c**;

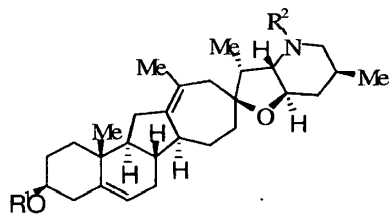


The chemical structure shows a fluorene core, which consists of three fused benzene rings. The structure is substituted with four groups: $(R^{15})_m$ at the 1-position, $(R^{16})_m$ at the 6-position, $(R^{17})_n$ at the 9-position, and $(R^{18})_n$ at the 8-position. Wavy lines are shown at the 2 and 7 positions, indicating potential for further substitution.

151c

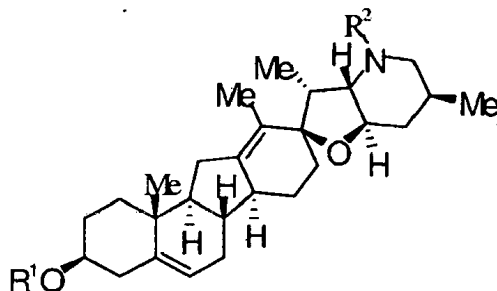
m independientemente para cada aparición es 0, 1, 2, 3, o 4; n independientemente para cada aparición es 0,1, o 2; cada uno de R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} y R^{18} es, independientemente, alquilo, arilo, aralquilo, o haluro.

La presente descripción se relaciona además con un proceso para preparar un compuesto de la fórmula **156**:

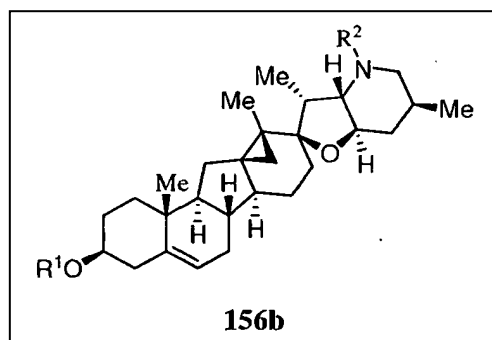


156

poner en contacto un compuesto de la fórmula **156a** con un agente de ciclopropanación para formar un compuesto de la fórmula **156b**; y



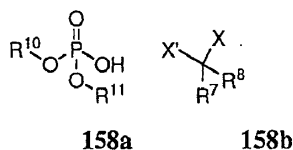
156a



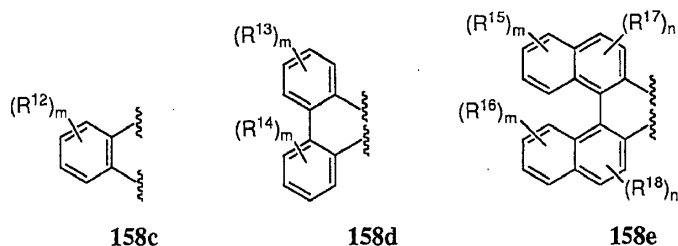
combinar el compuesto de la fórmula 156b con un ácido para dar el compuesto de la fórmula 156;

donde R^1 es un grupo protector de oxígeno seleccionando del grupo que consiste en formiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, pivalato, benzoato, alquil carbonato, alquénil carbonato, aril carbonatos, aralquil carbonato, 2,2,2-tricloroetil carbonato, alcoxiéter de metilo, aralcoxiéter de metilo, alquiltiometil éter, aralquiltio éter, ariltio éter, trialquilsilil éter, alquilarilsilil éter, éter bencílico, ariléter de metilo, alil éter; y R^2 es a grupo protector de nitrógeno seleccionando del grupo que consiste en formilo, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, fenil acetilo, benzoilos, alquil carbamatos, aralquil carbamatos, aril carbamatos, alilo, aralquilo, triarilmétilo, alcoximatilo, aralcoximatilo, *N*-2-cianoetilo, diarilfosfinamidas, dialquifosfinamidatos, diarilfosfinamidatos, y trialquilsililo.

En ciertos aspectos el agente de ciclopropanación se forma al combinar un ácido fosfórico de la fórmula 158a, un dialquilo de cinc, y un dihaloalquilano de la fórmula **158b**:



en donde cada uno de X y X' es, independientemente, cloruro, bromuro, o yoduro; cada uno de R^7 y R^8 es, independientemente, H, alquilo, haluro, amido, o éster; cada uno de R^{10} y R^{11} es, independientemente, alquilo, alquénilo, aralquilo, arilo, heteroarilo, heteroaralquilo; o R^{10} y R^{11} tomados juntos tienen la fórmula **158c**, **158d**, o **158e**;



en donde m independientemente para cada aparición es 0, 1, 2, 3, o 4; n independientemente para cada aparición es 0, 1, o 2; cada uno de R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} y R^{18} es, independientemente, alquilo, arilo, aralquilo, o haluro.

El grupo protector de oxígeno puede ser, en algunos aspectos, seleccionado de alquil carbonatos, aralquil carbonatos (por ejemplo, bencilcarbonato), benzoatos, pivalato, o formiato. El grupo protector de nitrógeno puede seleccionarse de benzoilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, formilo, alquil carbamatos, aralquil carbamatos (por ejemplo, bencilcarbamato), aril carbamatos, diarilfosfinamidas, dialquifosfinamidatos, o diarilfosfinamidatos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

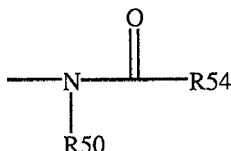
Definiciones

Las definiciones de los términos usados en la presente están destinadas a incorporar las definiciones actuales del estado de la técnica reconocidas para cada término en los campos de química y farmacéutica. Cuando sea apropiado, se proporciona ejemplificación. Las definiciones se aplican a los términos tal como se usan en toda esta

descripción, a menos que limite de otro modo en ejemplos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más grande.

5 Como se usa en la presente, la definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, m, n, etc., cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en otra parte en la misma estructura.

El término "acilamino" se refiere a una porción que puede representarse por la fórmula general:



10 en donde R50 y R54 independientemente representan un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(\text{CH}_2)_m\text{-R61}$, donde R61 representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y es cero o entero en el intervalo de 1 a 8.

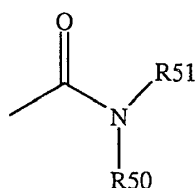
15 Los términos "alquenilo" y "alquinilo" se refieren a grupos alifáticos insaturados análogos en longitud y posible sustitución a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple, respectivamente.

20 Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo, como se define anteriormente, que tiene un radical oxígeno unido a él. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc-butoxi.

25 El término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, que incluyen grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, y grupos alquilo cicloalquilo sustituidos. "Cicloalquilo" se refiere al radical de grupos alicíclicos saturados, que incluyen grupos cicloalquilo alquilo sustituidos. En ciertas modalidades, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su estructura (por ejemplo, $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ para cadena lineal, $\text{C}_3\text{-C}_{30}$ para cadena ramificada), 20 o menos. Asimismo, ciertos cicloalquilos tienen de 3-10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y otros tienen 5, 6 o 7 carbonos en la estructura de anillo.

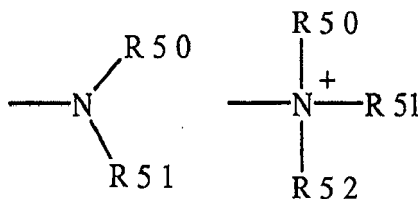
30 El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo, como se define anteriormente, que tiene un radical de azufre unido a él. En ciertas modalidades, la porción de "alquiltio" se representa por uno de $-\text{S-alquilo}$, $-\text{S-alquenilo}$, $-\text{S-alquinilo}$, y $-\text{S}-(\text{CH}_2)_m\text{-R61}$, en donde m y R61 se definen anteriormente. Los grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etil tio.

35 El término "amido" es reconocido en la técnica como un carbonilo amino sustituido e incluye una porción que puede ser representada por la fórmula general:



40 en donde R50 y R51 cada uno independientemente representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(\text{CH}_2)_m\text{-R61}$, R61 representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un entero en el intervalo de 1 a 8, o R50 y R51, tomados juntos con el átomo de N al cual se unen completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo. Ciertas modalidades de la amida en la presente invención no incluirán las imidas las cuales pueden ser inestables.

45 Los términos "amina" y "amino" son reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas no sustituidas y sustituidas, por ejemplo, una porción las generales:



50 en donde R50 y R51 (y opcionalmente R52) cada uno independientemente representan un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, o $-(\text{CH}_2)_m\text{-R61}$, donde R61 se define como anteriormente. Así, el término "alquilamina" incluye un grupo

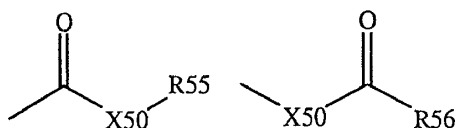
amina, tal como se define anteriormente, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido a él, es decir, al menos uno de R50 y R51 es un grupo alquilo.

El término "aralquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo. "Heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo heteroaromático.

El término "arilo" como se usa en la presente incluye grupos aromáticos de 5, 6 y 7 miembros de un solo anillo por ejemplo, benceno, antraceno, naftaleno, y pireno. "Heteroarilo" incluye grupos aromáticos de 5, 6 y 7 miembros de un solo anillo que incluye de uno a cuatro heteroátomos, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina. Aquellos grupos aromáticos que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también pueden ser denominados como "heterociclos de arilo" o "heteroaromáticos." El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcóxido, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, porciones aromáticas o heteroaromáticas, $-\text{CF}_3$, o $-\text{CN}$. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son "anillos fusionados") en donde al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos y/o heterociclos.

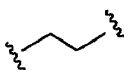
El término "ácido de Bronsted" se refiere a cualquier sustancia que puede actuar como un donante de ion de hidrógeno (protón).

El término "carboxilo" se define que incluye ésteres, tiocarboxilo, aldehídos, cetonas y similares y por tanto incluye tales porciones como se puede representar por las fórmulas generales:

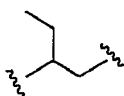


en donde X50 es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y cada uno de R55 y R56 representa independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(\text{CH}_2)_m\text{-R61}$, donde m y R61 se definen anteriormente.

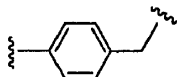
El término "biradical" se refiere a cualquiera de una serie de grupos divalentes de grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilalquilo, heteroarilo, y heteroaralquilo. Por ejemplo,



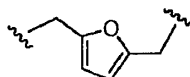
es un alquilo biradical;



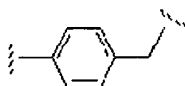
es además un alquilo biradical;



es un aralquilo biradical; y



es un (alquil)heteroaralquilo biradical. Los ejemplos típicos incluyen alquilenos de estructura general $(\text{CH}_2)_x$ donde x es 1-6, y los correspondientes alquenileno y enlazadores de alquinileno que tienen 2-6 átomos de carbono y uno o más enlaces dobles o triples; grupos cicloalquilenos que tienen 3-8 miembros en el anillo; y grupos aralquilo en donde uno de valencia abierta está en el anillo arilo y uno está en la porción alquilo tal como



y sus isómeros.

5

El término "haloalquilo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo alquilo donde en cualquier lugar de 1 a todos los hidrógenos han sido sustituidos con un haluro. Un "perhaloalquilo" es donde todos los hidrógenos han sido sustituidos con un haluro.

10 El término "heteroátomo" como se usa en la presente significa un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Los ejemplos de heteroátomos incluyen boro, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre y selenio.

15 Los términos "heterociclilo" o "grupo heterocíclico" se refieren a estructuras de anillo de 3 a 10 miembros, en algunos ejemplos a los anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policiclos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, phenarsazine, fenotiazina, furazan, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas, y similares. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, una porción aromática o heteroaromática, -CF₃, -CN.

25 El término "aislado" en relación con un compuesto de la presente invención significa que el compuesto no está en una célula u organismo y el compuesto se separa de algunos o todos los componentes que típicamente lo acompañan en la naturaleza.

30 El término "ácido de Lewis" se refiere a cualquier sustancia que puede actuar como un aceptor de par de electrones.

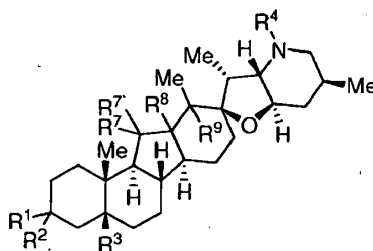
A menos que se especifique de otro modo el número de carbonos, "alquilo inferior" tal como se usa en la presente significa un grupo alquilo, como se definió anteriormente, pero que tiene de uno a diez carbonos, en algunas modalidades de uno a seis átomos de carbono en su estructura de la cadena principal. Del mismo modo, "alqueno inferior" y "alquino inferior" tienen longitudes de cadena similares. Ciertos grupos alquilo son alquilos inferiores. En algunas modalidades, un sustituyente designado en la presente como alquilo es un alquilo inferior.

40 Como se usa en la presente, el término "nitro" significa -NO₂; el término "halógeno" designa -F, -Cl, -Br o -I; el término "sulfhidrilo" significa -SH; el término "hidroxilo" significa -OH; y el término "sulfonilo" significa -SO₂-.

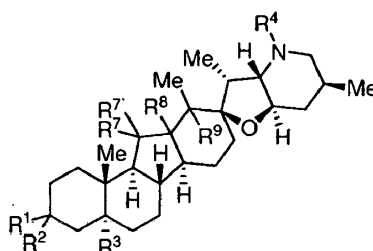
El término "oxo" se refiere a un oxígeno del carbonilo (=O).

45 Los términos "policiclilo" o "grupo policíclico" se refieren a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos y/o heterociclos) en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, por ejemplo, los anillos son "anillos condensados". Los anillos que están unidos a través de átomos no adyacentes se denominan anillos "puenteados". Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, una porción aromática o heteroaromática, -CF₃, -CN.

50 El término "epiméricamente puro" en relación con un compuesto de la presente invención significa que el compuesto está sustancialmente libre de estereoisómeros del compuesto en donde la configuración del centro estereogénico que R³ está unido se invierte. Por ejemplo un compuesto epiméricamente puro representado por la siguiente fórmula:

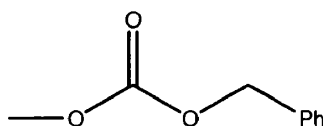


5 en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁷, R^{7'}, R⁸, y R⁹ son como se definen más abajo, es sustancialmente libre de los compuestos representados por la siguiente fórmula:

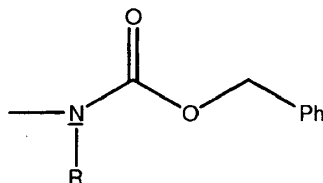


10 en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁷, R^{7'}, R⁸, y R⁹ son como se definen más abajo. Los compuestos epiméricamente puros contienen menos de aproximadamente 20% en masa, menos de aproximadamente 15% en masa, menos de aproximadamente 10% en masa, menos de aproximadamente el 5% en masa, o menos de aproximadamente 3% en masa de compuestos estereoisómeros en donde la configuración del centro estereogénico que R³ está unido se invierte en relación con el compuesto.

15 La frase "grupo protector" como se usa en la presente significa sustituyentes temporales que protegen un grupo funcional potencialmente reactivo de transformaciones químicas no deseadas. Ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, silil éteres de alcoholes, y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. El campo de la química del grupo protector ha sido revisado (Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd ed.; Wiley: New York, 1991). En algunos casos, el grupo funcional que está protegido y el grupo protector se denominan conjuntamente como una porción. Por ejemplo, el fragmento que se muestra a continuación se refiere a veces como un carbonato de bencilo; es decir, el O protegido (subrayado) forma parte del carbonato.



De manera similar, el fragmento que se muestra a continuación, en el que el N protegido forma parte del carbamato, se conoce como un carbamato de bencilo.



El término "azúcar" como se usa en la presente se refiere a un monosacárido natural o no natural, disacárido u oligosacárido que comprende uno o más anillos de piranosa o furanosa. El azúcar puede estar unido covalentemente al alcaloide esteroideo de la presente invención a través de un enlace éter o a través de un enlace alquilo. En ciertas modalidades la porción de sacárido puede estar unido covalentemente a un alcaloide esteroideo de la presente invención en un centro anomérico de un anillo de sacárido. Los azúcares pueden incluir, pero no se limitan a ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, glucosa, y trehalosa.

El término "sulfonamido" o "sulfonamida" como se usa en la presente incluye una porción que tiene alguna de las siguientes fórmulas:



en donde R50 y R56 son como se definieron anteriormente.

Los términos "triflilo", "tosilo", "mesilo", y "nonaflilo" se refieren a grupos trifluorometanosulfonilo, p-toluenosulfonilo, metanosulfonilo, y nonafluorobutanossulfonil, respectivamente. Los términos "triflato", "tosilato", "mesilato", y "nonaflato" a éster de trifluorometanosulfonato, éster p-toluenosulfonato, éster de metanosulfonato, y grupos éster nonafluorobutanossulfonato funcionales y moléculas que contienen los grupos, respectivamente.

El término "tioxo" se refiere a un azufre carbonilo (=S).

Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que tal sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que los resultados de sustitución en un compuesto estable, por ejemplo, que no lo hace de forma espontánea experimenta una transformación tal como mediante reorganización, ciclación, eliminación, etc.

Pueden existir ciertos compuestos de la presente invención, en particular, formas geométricas o estereoisómeras. Todos estos compuestos, que incluyen *cis*- y *trans*-isómeros, *R*- y *S*-enantiómeros, diastereómeros, (D)-isómeros, (L)-isómeros, las mezclas racémicas de estos, y otras mezclas de estos pueden existir.

Átomos de carbono asimétricos adicionales pueden estar presentes en un sustituyente tal como un grupo alquilo.

Como se establece anteriormente, ciertas modalidades de los presentes compuestos pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino, y son, por lo tanto, capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en este sentido, se refiere a las sales de adición de ácido relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o al reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada durante la purificación subsiguiente. Las sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y laurilsulfonato y similares. (Ver, por ejemplo, Berge y otros (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19)

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las sales convencionales no tóxicas o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isotiónico, y similares.

En otros casos, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de base relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden asimismo ser preparadas *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o al reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. (Ver, por ejemplo, Berge y otros, *supra*)

Síntesis de Compuestos Alcaloides Esteroideos

Los derivados alcaloides esteroideos de anillo expandido descritos anteriormente puede prepararse directamente a partir alcaloides esteroideos de origen natural o análogos sintéticos de estos. En algunos casos, los materiales de partida de alcaloides esteroideos pueden ser ciclopamina o jervina. Estos alcaloides esteroideos se pueden comprar comercialmente o se extrae de *Veratrum Californicum*. Brevemente, el proceso comprende las etapas de ciclopropanar derivados de alcaloides esteroideos adecuados seguido por la transposición de la expansión del anillo de los derivados de ciclopropilo. En algunos casos, puede ser deseable proteger adecuadamente o transformar de cualquier otra forma funcionalidades reactivas presentes en la molécula antes de la ciclopropanación. Por ejemplo, tanto un alcohol presente en R¹ como un nitrógeno secundario presente en el anillo de furano-piperidina fusionado pueden estar protegidos antes de ciclopropanación. En ciertas modalidades, puede preferirse los grupos protectores que se añaden eficientemente y se retiran del alcaloide, rinden intermediarios en el proceso sintético con propiedades de manejo mejoradas y que permiten la purificación eficiente de los intermediarios sintéticos formados.

Los ejemplos de grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan a formiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, pivaloato, benzoatos, carbonato de alquilo, carbonato de alqueno, carbonatos de arilo, carbonato de aralquilo (por ejemplo, carbonato de bencilo), 2,2,2-carbonato de tricloroetil, alcoximetil éter, aralcoximetil éter, alquiltiometil éter, aralquiltio éter, ariltio éter, trialkilsilil éter, alquilarilsilil éter, éter bencilico, éter arilmetilo, y éter de alilo.

Los ejemplos de grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero sin limitarse a formilo, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, fenil acetilo, benzoilos, benzamidas, alquil carbamatos, aralquil carbamatos (por ejemplo, bencil carbamatos), aril carbamatos, alilo, aralquilo, alcoximatilo, aralcoximatilo, N-2-cianoetil, diarilfosfinamidas, dialquilfosfinamidatos, diarilfosfinamidatos, y trialkilsililo.

Los grupos protectores adicionales que pueden usarse en los métodos se describen en Green T.W.; Wuts P.G. Protective Groups in Organic Synthesis 3ra Edición, John Wiley & Sons, Inc. 1999.

Una variedad de agentes de ciclopropanación se puede usar para ciclopropanar el alcaloide esteroideo. Los complejos 1,1-haloalquilmetálicos y especies reactivas referidas como carbenoides, se utilizan comúnmente para ciclopropanar olefinas. Estos reactivos se hacen típicamente usando un diyodoalcano o diazoalcano y especies metálicas u organometálicas tales como Et₂Zn, *i*Bu₃ Al, samario, cobre, rodio, o paladio. En ciertas modalidades, Et₂Zn y diyodometano se usan para generar las especies 1,1-haloalquilmetálicas.

La reactividad y la facilidad de manejo de los complejos de 1,1- haloalquilo de cinc pueden ser modificados por la adición de ciertos reactivos, tales como ácidos. Se cree que la adición de un ácido a las especies 1,1- haloalquilo de cinc genera una sal mixta de alquilo de cinc. En los ejemplos descritos a continuación un ácido biarilfosfórico se combina con diyodometano y dietilo de cinc para generar un agente de ciclopropanación de fosfato haloalquilo de cinc putativo. Una variedad de ácidos fosfóricos se puede usar para generar el fosfato de haloalquilo de cinc putativo.

Otros métodos de ciclopropanación conocidos, tales como los que usan iluros de azufre para reaccionar con una olefina conjugada a un carbonilo para añadir un grupo CH₂ o alquil-CH o aril-CH, y la descomposición catalizada por metales de compuestos diazoalquilo y α-diazo-carbonilo, tales como diazometano y diazoacetato de etilo, también se pueden utilizar: estos métodos proporcionan fácilmente ciclopropanos que tienen sustituyentes de alquilo, arilo, alcoxycarbonilo (-COOR), o acilo. Los agentes de ciclopropanación adicionales se describen en Masalov y otros, Organic Letters (2004) Vol. 6, págs. 2365-8 y Hansen y otros, Chem. Comm. (2006) 4838-40.

El anillo de ciclopropilo puede estar sustituido o no sustituido. En los casos donde se sustituye el anillo ciclopropilo, los grupos unidos al metileno del ciclopropano se instalarán en el anillo D después de la transposición y expansión del anillo.

Las reacciones de ciclopropanación pueden llevarse a cabo en un disolvente aprótico. Los disolventes adecuados incluyen éteres, tales como éter dietílico, 1,2-dimetoxietano, diglimo, t-butil metil éter, tetrahidrofurano y similares; disolventes halogenados, tales como cloroformo, diclorometano, dicloroetano, y similares; disolventes alifáticos o hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, xileno, tolueno, hexano, pentano y similares; ésteres y cetonas, tales como acetato de etilo, acetona, y 2-butanona; disolventes apróticos polares, tales como acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, y similares; o combinaciones de dos o más disolventes. En una cierta modalidad, diclorometano es el disolvente usado para la ciclopropanación cuando se usa dialquilo de cinc y diyodometano.

En los ejemplos descritos a continuación, una solución que contiene el agente de ciclopropanación se prepara al añadir primero una solución de un ácido fosfórico a una solución de cinc, seguido de la adición de diyodometano a la solución de reacción. El sustrato de ciclopropanación se añade después a esta solución. Alternativamente, el agente de ciclopropanación se puede preparar en presencia del sustrato de ciclopropanación cambiando el orden de adición de los reactivos. En ciertas modalidades, la reacción de ciclopropanación se lleva a cabo al añadir primero el ácido

fosfórico a una solución de dialquilo de cinc, seguido por la adición del sustrato de ciclopropanación, y finalmente se añade el dihaloalcano. Mediante el uso de este método, el agente de ciclopropanación se genera en condiciones controladas y reacciona inmediatamente con el sustrato de ciclopropanación. Los métodos de de ciclopropanación descritos en la presente se pueden usar también para ciclopropanar otros compuestos policíclicos, por ejemplo, aquellos con cadena principal esteroideal.

Después de la síntesis del núcleo alcaloide esteroideo ciclopropanado, el compuesto se puede derivatizar mediante el uso de una variedad de reacciones de funcionalización conocidas en la técnica. Los ejemplos representativos incluyen reacciones de acoplamiento de paladio a alquénilhaluros o haluros de arilo, oxidaciones, reducciones, reacciones con nucleófilos, reacciones con electrófilos, reacciones pericíclicas, reacciones de radicales, instalación de grupos protectores, eliminación de grupos protectores, y similares.

En presencia de ácidos de Lewis o de Bronsted los análogos de ciclopropilo experimentan una transposición y expansión de anillo para proporcionar análogos de alcaloides esteroideos en los que el anillo D se ha expandido en un átomo de carbono.

La ciclopropanación y la expansión del anillo pueden tener lugar en un proceso de un recipiente de reacción de dos etapas o en un proceso de dos recipientes de reacción en dos etapas. Cuando la ciclopropanación y la expansión del anillo se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción el ácido usado para iniciar la transposición de la expansión de anillo se añade después de la terminación de la reacción de ciclopropanación. Bajo ciertas condiciones, las sales de cinc que se generan en el curso de ciclopropanar el alcaloide esteroideo pueden actuar por sí mismos como ácidos de Lewis para catalizar la transposición de la expansión del anillo. La reactividad de las sales de cinc generadas después de la ciclopropanación se puede modificar por la adición de ácidos para generar ácidos de Lewis más activos.

Como se describe a continuación en la sección de ejemplos, se añade el ácido metanosulfónico al recipiente de reacción de ciclopropanación después de la finalización de la ciclopropanación. Los ejemplos adicionales de ácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a sales de cinc, compuestos de boro, sales de magnesio, sales de titanio, sales de indio, sales de aluminio, sales de estaño, sales de lantano, ácido trifluorometanosulfónico, ácidos diariloxifosfóricos, ácido acético, y HCl. En uno de ciertos aspectos, el ácido de Lewis usado es una sal de cinc o BF_3 .

Estos análogos de anillo expandido pueden ser funcionalizados aún más mediante el uso de una variedad de reacciones de funcionalización conocidas en la técnica. Los ejemplos representativos incluyen reacciones de acoplamiento de paladio a alquénilhaluros o haluros de arilo, oxidaciones, reducciones, reacciones con nucleófilos, reacciones con electrófilos, reacciones pericíclicas, reacciones de radicales, instalación de grupos protectores, eliminación de grupos protectores, y similares.

Utilidad de los compuestos

La señalización hedgehog es fundamental en muchas etapas de desarrollo, especialmente en la formación de la simetría izquierda-derecha. La pérdida o reducción de la señalización hedgehog conduce a múltiples déficits de desarrollo y malformaciones, uno de los más llamativos de los cuales es la ciclopia.

Muchos tumores y condiciones proliferativas se han demostrado que dependen de la vía hedgehog. El crecimiento de tales células y la supervivencia pueden ser afectados por el tratamiento con los compuestos descritos en la presente invención. Recientemente, se ha informado de que la activación de mutaciones de la vía hedgehog tiene lugar en el carcinoma de células basales esporádico (Xie y otros (1998) *Nature* 391: 90-2) y tumores neuroectodérmicos primitivos del sistema nervioso central (Reifenberger y otros (1998) *Cancer Res* 58: 1798-803). La activación incontrolada de la vía hedgehog también se ha demostrado en numerosos tipos de cáncer, tales como cánceres del tracto GI incluyendo páncreas, de esófago, cáncer gástrico (Berman y otros (2003) *Nature* 425: 846-51, Thayer y otros (2003) *Nature* 425: 851-56) cáncer de pulmón (Watkins y otros (2003) *Nature* 422: 313-317, cáncer de próstata (Karhadkar y otros (2004) *Nature* 431: 707-12, Sheng y otros (2004) *Molecular Cancer* 3: 29-42, Fan y otros (2004) *Endocrinology* 145: 3961-70), cáncer de mama (Kubo y otros (2004) *Cancer Research* 64: 6071-74, Lewis y otros (2004) *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2: 165-181) y cáncer hepatocelular (Sicklick y otros (2005) Conferencia de ASCO, Mohini y otros (2005) Conferencia de AACR).

Por ejemplo, la inhibición de pequeña molécula de la vía hedgehog se ha demostrado que inhibe el crecimiento de carcinoma de células basales (Williams, y otros, 2003 *PNAS* 100: 4616-21), meduloblastoma (Berman y otros, 2002 *Science* 297: 1559-61), cáncer de páncreas (Berman y otros, 2003 *Nature* 425: 846-51), cánceres gastrointestinales (Berman y otros, 2003 *Nature* 425: 846-51, solicitud del PCT publicada WO 05/013800), cáncer de esófago (Berman y otros, 2003 *Nature* 425: 846-51), cáncer de pulmón (Watkins y otros, 2003. *Nature* 422: 313-7), y cáncer de próstata (Karhadkar y otros, 2004. *Nature* 431: 707-12).

Además, se ha demostrado que muchos tipos de cáncer tienen la activación incontrolada de la vía hedgehog, por

ejemplo, cáncer de mama (Kubo y otros, 2004. Cancer Research 64: 6071-4), cáncer heptacelular (Patil y otros, 2005. 96th Annual AACR conference, resumen #2942 Sicklick y otros, 2005. ASCO annual meeting, resumen #9610), neoplasias hematológicas (Watkins y Matsui, resultados no publicados), carcinoma basal (Bale & Yu, 2001. Human Molec. Genet. 10:757-762 Xie y otros, 1998 Nature 391: 90-92), meduloblastoma (Pietsch y otros, 1997. Cancer Res. 57: 2085-88), y cáncer gástrico (Ma y otros, 2005 Carcinogenesis, 19 de mayo de 2005 (Epub)). Como se muestra en los ejemplos, los compuestos descritos en la presente se ha demostrado que modulan la vía hedgehog, y compuestos seleccionados se ha demostrado que inhiben el crecimiento del tumor. Por tanto, se cree que estos compuestos pueden ser útiles para tratar una variedad de trastornos, tales como varios tipos de cánceres.

10 Composiciones farmacéuticas

En otra modalidad, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos descritos anteriormente, formuladas junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser formuladas especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, enjuagues (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, por ejemplo, las destinadas para la absorción bucal, sublingual, y sistémica, cápsulas, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un parche de liberación controlada o atomizador aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; (8) por vía pulmonar, o (9) por vía nasal.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, lubricantes, y/o antioxidantes. La prevención de la acción de microorganismos sobre los compuestos de la presente invención puede ser asegurada mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede efectuar por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación un compuesto de la presente invención con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dar forma al producto.

Cuando los compuestos descritos en la presente memoria se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, que se pueden administrar per se o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, aproximadamente 0.1 a 99%, o aproximadamente 10 a 50%, o aproximadamente 10 a 40%, o aproximadamente 10 a 30, o aproximadamente 10 a 20%, o aproximadamente 10 a 15% de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular empleado de la presente invención, o el éster, sal o amida de este, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción o metabolismo del compuesto particular que es empleado, la velocidad y grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que es tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Generalmente, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será la cantidad del compuesto que es la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los

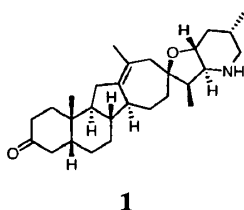
factores descritos anteriormente. Generalmente, las dosis orales, intravenosas y subcutáneas de los compuestos de la presente invención para un paciente, cuando se usa para los efectos indicados, estará en el intervalo de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 0.001 a aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 0.01 a aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal por día.

El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, que incluyen primates, en particular humanos, y otros mamíferos tales como equinos, ganado, cerdos y ovejas; y las aves de corral y animales domésticos en general.

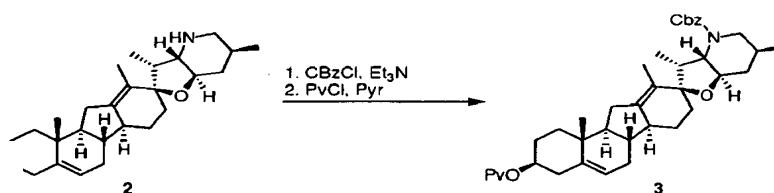
Ejemplificación

La invención se describirá ahora de manera general y se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1



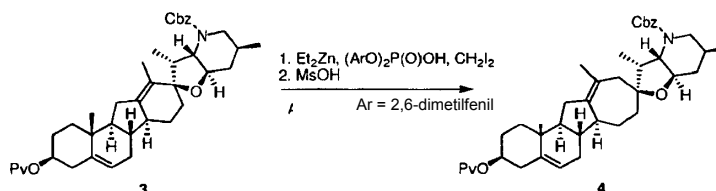
Etapa A



La ciclopamina recristalizada **2** (14.1 g, 34.0 mmol, 1 eq) se disuelve en DCM anhidro (70 ml) y MeOH anhidro (29 ml). La solución clara se enfría, y se añade trietilamina (10.4 g, 102.7 mmol, 3 eq) seguido por cloroformiato de bencilo (6.20 g, 36.3 mmol, 1.1 eq). Después que se completa la adición, la solución se agita en el baño de hielo por 30 min. Tres porciones de cloroformiato de bencilo (3 X 0.35 g, 3.46 mmol, 0.03 eq) se añaden durante las 3 h. La reacción se apaga lentamente con agua (71 ml), mientras se mantiene la temperatura por debajo de 20 °C. La mezcla se agita por 15 min antes que las capas se asientan y se separan. La capa orgánica se seca sobre sulfato sódico y se filtra. El filtrado combinado se tampona con piridina anhidra (30 ml), se concentra, y se somete a intercambio del solvente con piridina anhidra adicional (43 ml) y se concentra.

La solución del compuesto en piridina (43 ml) se diluye adicionalmente con piridina anhidra adicional (85 ml). Cloruro de trimetilacetilo (8.3 g, 68.7 mmol, 2 eq) se añade lentamente a la mezcla de reacción, y la reacción se calienta hasta 45 °C. La reacción se agita a 45 °C por 30 min. La reacción se enfría y se apaga por la adición de MeOH anhidro (4.5 ml). La mezcla de reacción apagada se agita a temperatura ambiente por 40 min y después se diluye con tolueno (97 ml) y se trata secuencialmente con agua (35 ml) y una 10 % en peso solución de carbonato sódico acuoso (100 ml). Después de agitar vigorosamente, las capas se separan y la capa orgánica se lava dos veces con agua (2 x 100 ml), se seca sobre sulfato sódico, y se filtra. La torta del filtro se enjuaga con tolueno (49 ml) y se desecha. Los filtrados combinados se concentran, y el solvente se intercambia con concentración hasta tolueno (145 ml) y se concentra adicionalmente hasta secarse. El producto se recristaliza a partir de tolueno y heptano. El producto cristalino se aísla mediante filtración por succión, se lava con heptano frío y se seca hasta un peso constante para proporcionar 15.1 g del producto deseado.

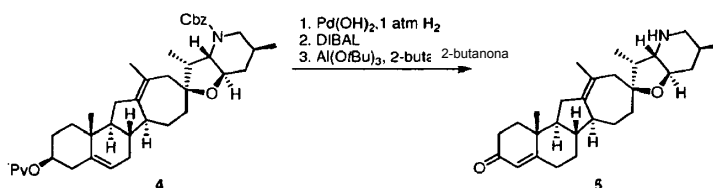
Etapa B



Bis (2,6-dimetilfenil) fosfato (10.65 g, 34.8 mmol, 3.1 eq) se secó por concentración de DCM anhidro (42 ml) y se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno. El fosfato se redissuelve a continuación en DCM anhidro (110 ml). En un matraz separado, se prepara una solución de dietilo de cinc puro (4.17 g, 33.8 mmol, 3.0 eq) en DCM anhidro (35 ml) y se enfría hasta -25 °C. La solución de fosfato se transfiere lentamente al recipiente que contiene la solución de dietilo de cinc durante 1 h, manteniendo la temperatura en o por debajo de -10 °C. La solución de fosfato de etilo de cinc clara se calienta a 0 °C y se agita durante 15 min. Se añade diyodometano (9.25 g, 34.5 mmoles, 3.0 eq) lentamente a la solución de fosfato de etilo de cinc, manteniendo la temperatura de reacción entre 0 y 5 °C. Después que se completa la adición, la solución carbenoide de cinc se agita durante unos 20 min adicionales.

En un matraz separado, se disuelve el compuesto 3 (7.20 g, 11.4 mmol, 1 eq) en DCM anhidro (36 ml) y se transfiere al matraz de reacción. Después que se completa la adición, el baño de hielo se elimina y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. Después de 6 h los contenidos del matraz se enfriaron hasta -53 °C. Una solución de ácido metanosulfónico (3.38 g, 35.2 mmol, 3.1 eq) en DCM anhidro (3 ml) se añade, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de -45 °C. Después de 10 min morfina (20 g, 230 mmol, 20 eq) se añade a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de -40 °C. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. Las sales de morfina se eliminan por filtración y la torta del filtro se enjuaga con DCM (22 ml). Los filtrados combinados se lavan con 2N ácido clorhídrico acuoso (2 x 140 ml), 5 % bicarbonato sódico acuoso (140 ml), 5 % bicarbonato sódico acuoso (70 ml) y 5 % bisulfito sódico acuoso (70 ml), y salmuera (144 ml). La capa orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se filtra. Sin llegar a secarse, la solución de DCM solución se concentra y el solvente se intercambia con metanol (280 ml). La suspensión se enfría con un baño de hielo y se agita por 40 minutos. Los sólidos se aíslan por filtración, se lavan dos veces con metanol frío (2 x 25 ml), y se secan hasta un peso constante para proporcionar 5.94 g del producto deseado.

Etapas C



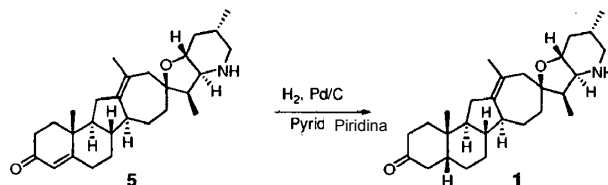
En un matraz de fondo redondo, el compuesto 4 (11.67 g, 18.1 mmol, 1 eq) y hidróxido de paladio al 20 % sobre carbono húmedo (2.40 g, 1.71 mmol, 0.09 eq) se colocan bajo una atmósfera de nitrógeno y se diluyen con EtOAc (115 ml) y tolueno (60 ml). La solución se desgasifica con nitrógeno (3X), con ciclos de evacuación/purga, y el proceso se repite para hidrógeno. La suspensión se agita vigorosamente a temperatura ambiente por 1.5 h. La atmósfera de hidrógeno se reemplaza con nitrógeno. Etilendiamina (0.57 g, 9.5 mmol, 0.52 eq) se añade a la reacción, y la mezcla resultante se agita por 20 min. La solución se filtra bajo nitrógeno, y el filtrado se lava con una solución acuosa de etilendiamina al 2 % (p/p) (125 ml), después agua (130 ml), y después se seca sobre sulfato sódico. El agente de secado se elimina por filtración y el filtrado se concentra hasta secarse al vacío. Los sólidos que quedaron se atrapan con tolueno (2 x 55 ml) en el evaporador rotatorio y el material resultante se usa sin purificación adicional en la siguiente etapa.

El material de la etapa anterior se disolvió en DCM anhidro (26 ml). La solución clara resultante se añade a una solución 1 M de DIBAL en DCM (65 ml, 65 mmol, 3.6 eq) mientras se mantiene la temperatura de reacción entre -10 y -25 °C. Después de 30 min la reacción se apaga con acetona (13 ml), manteniendo la temperatura de reacción a o por debajo de 0 °C. Después de agitar la mezcla de reacción apagada por 17 min, esta se añade en porciones a un matraz que contenía una solución fría agitada de 20 % (p/p) sal de Rochelle acuosa (200 ml). La suspensión gelatinosa resultante se agita a temperatura ambiente por 15 h. Después de agitar, las capas limpias se separan y la capa acuosa se extrae nuevamente con DCM (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua (60 ml) y se secan sobre sulfato sódico. El agente de secado se elimina por filtración y se desecha. El filtrado se concentra al vacío y el solvente se intercambia a tolueno (225 ml se añaden en porciones). La solución resultante se concentra adicionalmente hasta una suspensión (50 ml) y se diluye con heptano (115 ml). La mezcla resultante se calienta hasta que se vuelve homogénea (92 °C). La solución se enfría lentamente durante 12 h hasta 15 °C, y después se mantiene por 16 h adicionales. El producto cristalino se aísla mediante filtración por succión, se lava con heptano (2 x 75 ml) y se seca hasta un peso constante para proporcionar 7.70 g del producto deseado.

Un matraz de fondo redondo se carga secuencialmente con el alcohol homo-alílico (7.50 g, 17.6 mmol, 1 eq), aluminio tri-*tert*-butóxido (6.10 g, 24.8 mmol, 1.4 eq), tolueno anhidro (115 ml), y 2-butanona (90 g, 1.24 mol, 7 eq). La suspensión se calienta bajo una atmósfera de nitrógeno hasta 75 °C por 16 h. La temperatura de reacción se deja enfriar después hasta 49 °C. Una 20 % (p/p) solución de tartrato sódico potásico (226 g) se añade a la suspensión

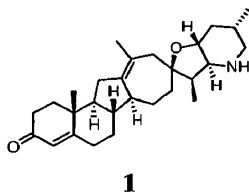
agitada. La suspensión se agita a temperatura ambiente por 3.5 h. Las capas se separan. La capa orgánica se lava con 20 % sal de Rochelle acuosa (2 x 250 ml) y agua (225 ml), después se seca sobre sulfato sódico y se filtra. El residuo se enjuaga con tolueno (30 ml) y se desecha. Los productos orgánicos combinados se concentran hasta secarse. Los disolventes de la reacción residual se eliminan a partir del material mediante la concentración de 2-propanol (250 ml añadido en porciones) a una masa solución final de 44 g. El intercambio de disolvente de 2-propanol a heptano (275 ml añadido en porciones) a una masa solución final es 41 g que precipita completamente el producto deseado. La suspensión se diluye con heptano adicional (40 ml), se agita a temperatura ambiente por 1 h, y se filtra. El producto se lava con n-heptano (17 ml) y se seca para proporcionar 5.4 g del producto deseado.

10 Etapa D

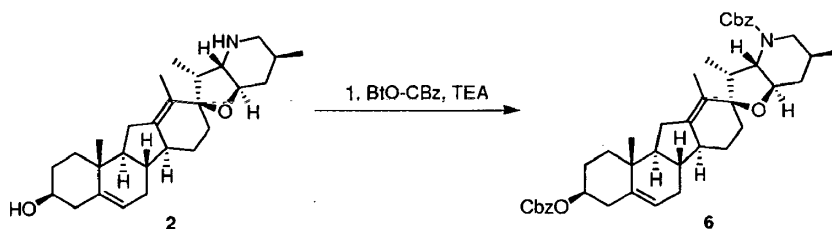


15 Un matraz de fondo redondo se carga con material de partida (110 mg, 0.26 mmol, 1 eq) y 10% paladio sobre carbono (106 mg). Los sólidos se suspenden en piridina (4 ml). La suspensión se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno (1 atm) y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite® y el filtrado se concentra *al vacío*. El material crudo se purifica usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 5:95) para proporcionar 93 mg del compuesto deseado. ([M+H] = 426.6 m/z).

20 Ejemplo 2

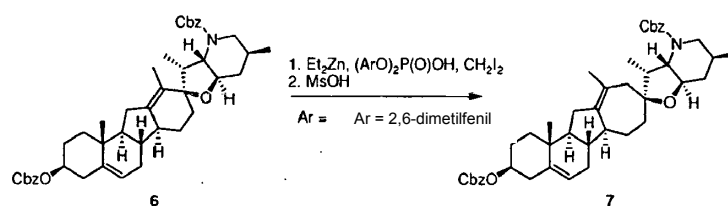


25 Etapa A



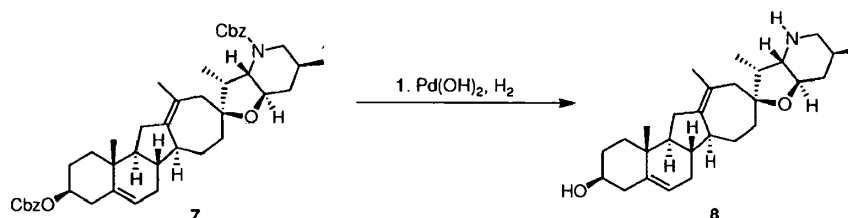
30 Ciclopamina 2 (5.02 g, 12.2 mmol, 1.0 eq) se disuelve en piridina anhidra (25 ml). Se añaden DMAP (300 mg, 2.44 mmol, 0.2 eq.) y trietil amina (5.5 ml, 39.1 mmol, 3.2 eq), seguido por BtO-Cbz (10.5 g, 39.1 mmol, 3.2 eq) y se calienta a 40 °C por 2h. La mezcla se enfría hasta la temperatura ambiente, se trata con 30 ml agua, se calienta hasta obtener una solución homogénea y se deja enfriar hasta la temperatura ambiente. El precipitado blanco que se forma se recoge por filtración. La torta del filtro se lava con porciones de agua (3 X 50 ml), y se seca al aire para proporcionar 9.53 g del material crudo el cual se cristaliza a partir de tolueno/heptanos (1:9, 70 ml) para dar 6.75 g del producto deseado.

Etapa B



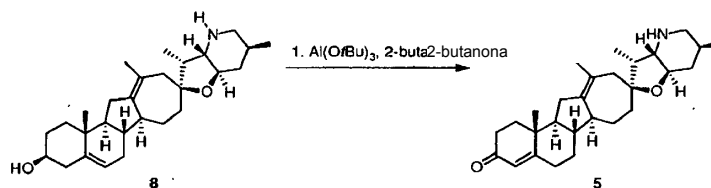
A una solución de dietil zinc (572 mg, 482 μ l, 4.63 mmol, 3.00 eq) en 5.0 ml DCM a -20 °C se añade una solución de ácido bis-(2,6-dimetilfenil)fosfórico (1.42 g, 4.63 mmol, 3.00 eq) en DCM (15 ml) manteniendo la temperatura de reacción por debajo de -8 °C. La solución se afeja por 15 min. a 0 °C, se añade diyodometano puro (1.24 g, 374 μ l, 3.00 eq), se afeja por 15 min. a 0 °C antes de añadir una solución de (BisCBzciclopamina, 1.05 g, 1.54 mmol, 1.0 eq), en DCM (10 ml). El baño de enfriamiento se reemplaza por un baño de agua a temperatura ambiente y se mantiene a temperatura ambiente por 4.5 h. La mezcla se enfría hasta -76 °C con un baño de hielo seco-acetona y se trata gota a gota con solución DCM ácido metanosulfónico (0.6 ml 50% v/v solución 4.63 mmol, 3.0 eq) manteniendo la temperatura de reacción por debajo de -74 °C. La mezcla se afeja por 15-20 min. y se apaga gota a gota con morfina (2.69 g, 2.70 ml, 20 eq) manteniendo la temperatura de reacción por debajo de -65 °C. El baño de enfriamiento se elimina, la mezcla de reacción se agita por 16-18 h., el precipitado blanco se filtra, y el filtrado se lava sucesivamente con 2.0 M HCl (2 x 20 ml), bicarbonato sódico sat. (2 x 20 ml), agua (2 x 20 ml) y salmuera (20 ml). Se seca sobre sulfato magnésico, se concentra *al vacío* hasta secarse y el producto crudo se purifica por cromatografía rápida en gel de sílice (hexanos/EtOAc 17:3→4:1) para proporcionar 924 mg (1.33 mmol, 86%) del producto deseado.

Etapa C

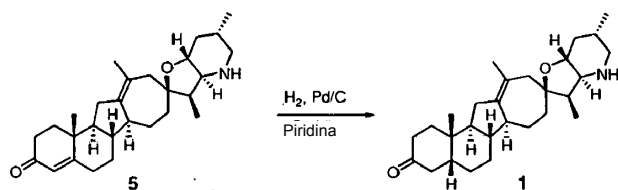


A una solución del compuesto 7 (4.05 g, 5.83 mmol, 1 eq) en una solución de EtOAc:tolueno (2:1, 60 ml) se añade 20% hidróxido de paladio sobre carbono (823 mg, 0.583 mmol, 0.1 eq.). El matraz se evacua y se llena con hidrógeno tres veces. La mezcla se agita bajo una atmósfera de hidrógeno por 1h. Se añade etileno diamina pura (0.38 ml), se agita por 1h., y el catalizador se filtra. La torta del filtro se lava dos veces con EtOAc:tolueno (2:1, 12 ml). Los filtrados combinados se lavan con una 2% solución acuosa de etileno diamina (3 X 20 ml), se secan sobre sulfato sódico y se concentran *al vacío* para dar 2.46 g como un sólido blanco cristalino.

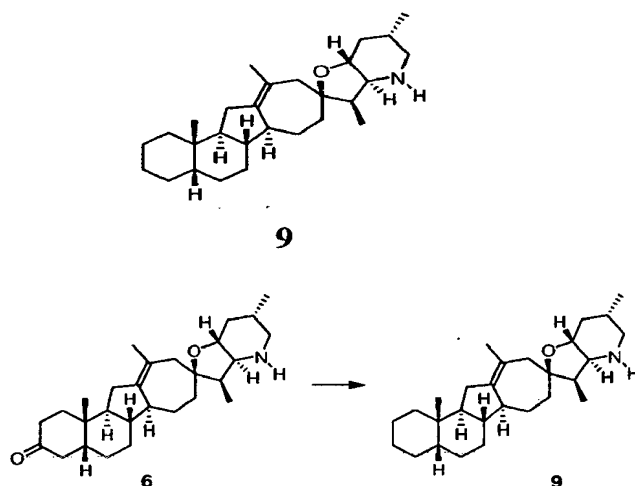
Etapa D



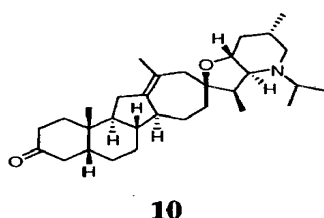
Un matraz de fondo redondo se carga secuencialmente con el alcohol homo-alílico 8 (7.50 g, 17.6 mmol, 1 eq), aluminio tri-*terc*-butóxido (6.10 g, 24.8 mmol, 1.4 eq), tolueno anhidro (115 ml), y 2-butanona (90 g, 1.24 mol, 7 eq). La suspensión se calienta bajo una atmósfera de nitrógeno hasta 75 °C por 16 h. La temperatura de reacción se deja enfriar después hasta 49 °C. La solución de tartrato sódico potásico acuosa al 20 % (p/p) (226 g) se añade a la suspensión agitada. La suspensión se agita a temperatura ambiente por 3.5 h. Las capas se separan. La capa orgánica se lava con sal de Rochelle acuosa al 20 % (2 x 250 ml) y agua (225 ml), después se seca sobre sulfato sódico y se filtra. El residuo se enjuaga con tolueno (30 ml) y se desecha. Los productos orgánicos combinados se concentran hasta secarse. Los solventes de reacción residuales se eliminan del material mediante concentración de 2-propanol (250 ml añadidos en porciones) hasta una masa de solución final de 44 g. El intercambio de solvente a partir de 2-propanol a *n*-heptano (275 ml añadidos en porciones) hasta una masa de solución final de 41 g precipitó completamente el producto deseado. La suspensión se diluye con *n*-heptano adicional (40 ml), se agita a temperatura ambiente por 1 h, y se filtra. El producto se lava con *n*-heptano (17 ml) y se seca para proporcionar 5.4 g del producto deseado.

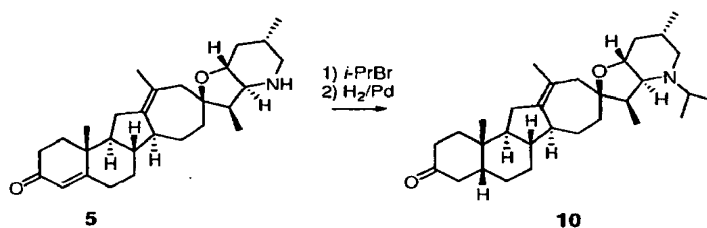
Etapas E

Un matraz de fondo redondo se carga con material de partida (110 mg, 0.26 mmol, 1 eq) y 10% paladio sobre carbono (106 mg). Los sólidos se suspenden en piridina (4 ml). La suspensión se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno (1 atm) y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite® y el filtrado se concentra *al vacío*. El material crudo se purifica usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 5:95) para proporcionar 93 mg del compuesto deseado. ([M+H] = 426.6 m/z).

Ejemplo 3

En un tubo sellado, se cargó cetona 6 (85 mg, 0.199 mmol, 1 equiv.) y se añadió trietilenoglicol (2 ml) seguido por monohidrato de hidrazina (500 mg, 10 mmol, 50 equiv.) y carbonato potásico (138 mg, 1 mmol, 5 equiv.). El tubo se selló y la reacción se calentó a 150 °C por 16 h. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió agua. El residuo se extrajo con cloroformo (3X). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua, se secan sobre Na₂SO₄, y se concentran hasta secarse. El aceite incoloro se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (DCM/MeOH 96:4). Las fracciones purificadas se mezclan y se concentran hasta secarse. El aceite resultante se disolvió en MTBE y se lavó con agua (2X), 2N NaOH, y después salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se evaporan para proporcionar 64 mg del material deseado como una espuma blanca. ([M+H] = 412.7 m/z).

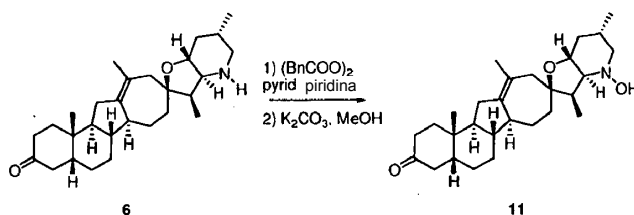
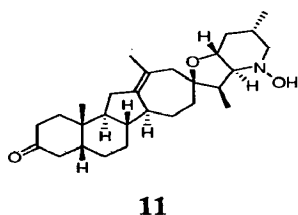
Ejemplo 4



Un tubo sellado se cargó con el compuesto 5 (223 mg, 0.52 mmol, 1 eq) y DMF (1ml). 2-bromopropano (1.3 g, 10.5 mmol, 20 eq) y Na_2CO_3 (73 mg, 0.68 mmol, 1.3 eq) se añadieron y el matraz se selló y se calentó hasta 50 °C. La mezcla se agitó por 16 h en cuyo punto se observó -70% de conversión. Se añadió (0.26 g, 2.12 mmol, 4 eq) adicional. La reacción se agitó por 2 h y se añadió 2-bromopropano adicional (0.13 g, 1.1 mmol, 2 eq). La reacción se agitó por otra h. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió agua. El residuo se extrajo con MTBE (3X). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron hasta secarse. La espuma blanca se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (DCM/MeOH 99:1) para dar 206 mg del derivado de N-isopropilo como una espuma blanca.

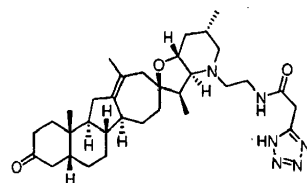
El derivado de N-isopropilo (205 mg, 0.44 mmol, 1 eq) se disolvió en 4-metoxipiridina (1.5 ml). El matraz se colocó bajo una atmósfera inerte y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 40 mg). El matraz se selló y se purgó tres veces con hidrógeno y se dejó 16 h bajo 1 atm de hidrógeno. Celite® se añadió a la mezcla de reacción. La mezcla se filtró a través de una pequeña almohadilla de Celite® y se lavó con EtOAc. La capa orgánica se lavó con 1N HCl ac. (2x) después con agua. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró a través de algodón y se evaporó para dar 34 mg del producto crudo. La capa acuosa se neutralizó con 2N KOH y se extrajo con DCM (3X). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron a través de algodón y se combinaron con los 34 mg iniciales del producto crudo. El material crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice hexano/EtOAc (6:4) para proporcionar 80 mg del producto deseado. ([M+H] = 468.7 m/z).

Ejemplo 5



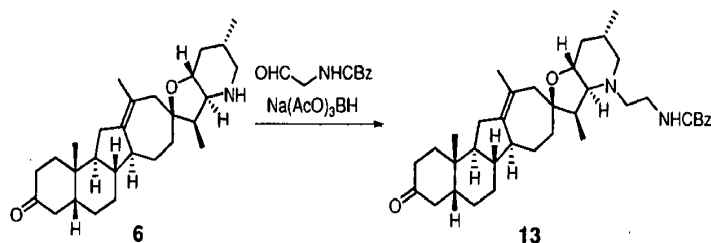
En un matraz de fondo redondo, el compuesto 6 (88 mg, 0.21 mmol, 1 eq) se disolvió en THF anhidro (1 ml). La mezcla se enfrió hasta 0 °C. Piridina (84 µl, 1 mmol, 5 eq) y benzoilperóxido (150 mg, 0.62 mmol, 3 eq) se añadieron sucesivamente. La mezcla homogénea se calentó gradualmente hasta la temperatura ambiente durante 2 h y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se apagó mediante la adición de NaHCO_3 saturado. El residuo se extrajo con MTBE. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (hexano/EtOAc (9:1 a 4:1)) para dar el producto derivado de N-O (60 mg, 0.11 mmol) como una espuma blanca. Esta espuma se disolvió en 2 ml de MeOH seguido por 2N KOH acuoso (0.4 ml). La mezcla de reacción se agitó por 1h. La mayor parte del MeOH se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y se añadió 1N HCl (500 µl). El material se extrajo con DCM (3X). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (hexanos/EtOAc (de 88:12→1:1)) para producir 11 mg del producto deseado. ([M+H] = 442.5 m/z).

Ejemplo 6



12

Etapa A

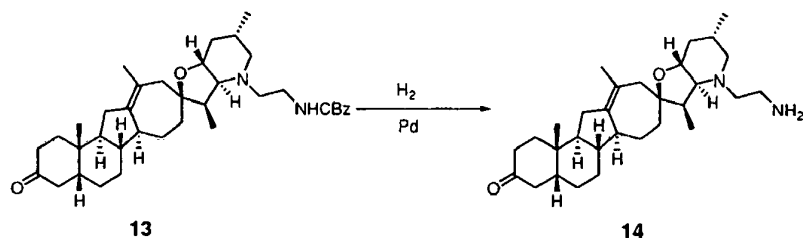


6

13

En un matraz de fondo redondo, el compuesto 6 (89 mg, 0.209 mmol, 1 eq) y *N*-(benciloxycarbonil)-aminoacetaldehído (148 mg, 0.85 mmol, 4 eq) se disolvieron en DCM (2 ml). Se añadió triacetoxiborohidruro sódico (177 mg, 0.85 mmol, 4 eq) y la reacción se agitó por 3 h a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en solución de NaHCO_3 saturado acuoso y el residuo se extrajo con DCM (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron a través de algodón y se evaporaron para dar un sólido espumoso (247 mg). El producto crudo se disolvió en EtOAc (2 ml) y se trató con 4M HCl (156 μl). Después de 30 min un precipitado blanco se formó lentamente. La lechada resultante se agitó por 15 min. La filtración dio 120 mg de sólido blanco. El material se disolvió en EtOAc y se trató con a solución de NaHCO_3 saturado acuoso. La capa orgánica se recogió y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2X). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 . La filtración y la evaporación dieron el producto intermedio deseado. Este material se usó en la próxima etapa sin purificación.

Etapa B

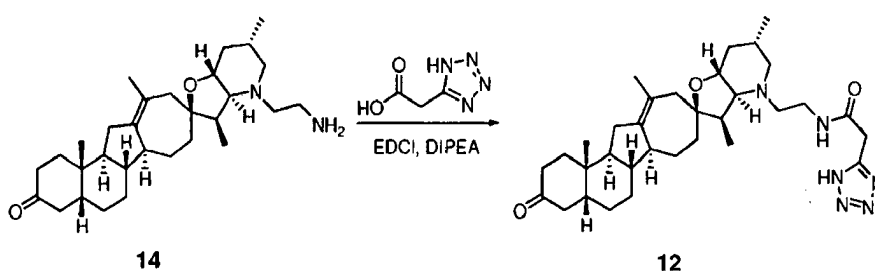


13

14

Todo el material de la Etapa A se disolvió en EtOAc (3 ml) y se trató con Pd/C 10% (30 mg, húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa). El matraz se selló y se purgó tres veces con hidrógeno y se dejó durante la noche bajo 1 atm de hidrógeno. Después de 16 h, la mezcla se filtró a través de una pequeña almohadilla de Celite® y se lavó con EtOAc para proporcionar 52 mg de la amina como una espuma blanca.

Etapa C

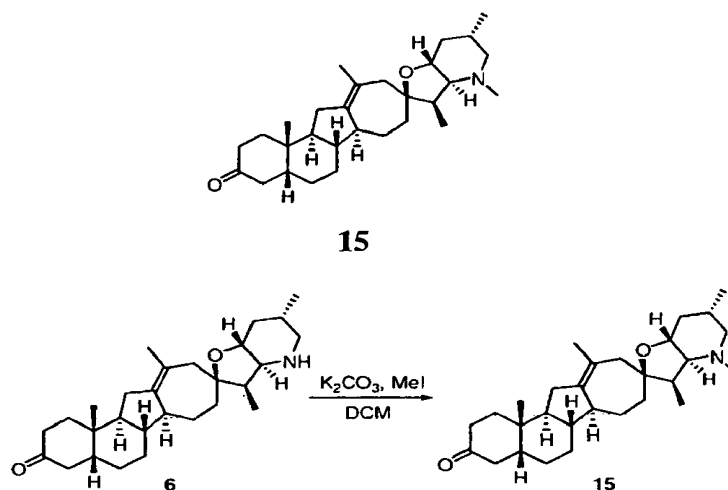


14

12

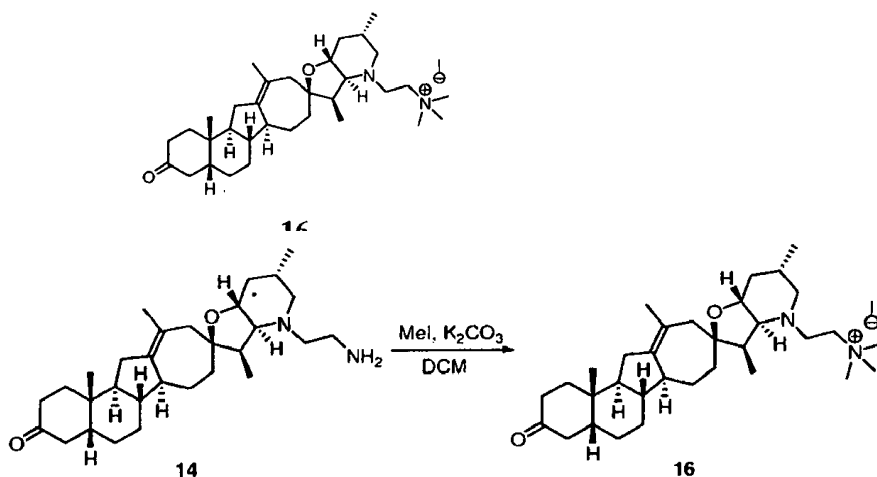
Un matraz de fondo redondo que contenía la amina 14 (52 mg, 0.11 mmol, 1 eq) se cargó con el ácido 1H-tetrazol-5-acético (21 mg, 0.166 mmol, 1.5 eq), DCM (2 ml), EDCI (42 mg, 0.22 mmol, 2 eq) y N,N-diisopropiletilamina (57 mg, 0.44 mmol, 4 eq). La solución amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente por 4 h. La reacción se apagó por la adición de solución de NaHCO₃ saturado acuoso y el residuo se extrajo con DCM (3X). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de algodón y se evaporaron para dar 62 mg de sólido blanco hueso. Este material se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 5:95→10:90) para proporcionar 31 mg del producto deseado. ([M+H]⁺ = 579.7 m/z).

Ejemplo 7



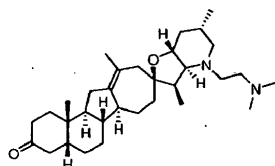
Un matraz de fondo redondo se cargó con material de partida (47 mg, 0.110 mmol, 1 eq) y carbonato potásico (150 mg, 1.09 mmol, 10 eq). Los sólidos se suspendieron en 2 ml de DCM. Se añadió yodometano (14 µl, 0.22 mmol, 2 eq) y la mezcla se agitó por 2 h a temperatura ambiente. La TLC (DCM/MeOH 95:5) indicó >90% de completamiento. Yodometano (14 µl, 0.22 mmol, 2 eq) se añadió a la mezcla de reacción, la cual se agitó por 2 h. A la mezcla de reacción se añadió agua. Las fases se separaron y los productos orgánicos se secaron y se concentraron hasta secarse. El residuo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (DCM/MeOH 100:0→98:2) para proporcionar 34 mg del producto deseado ([M+H]⁺ = 440.5 m/z).

Ejemplo 8



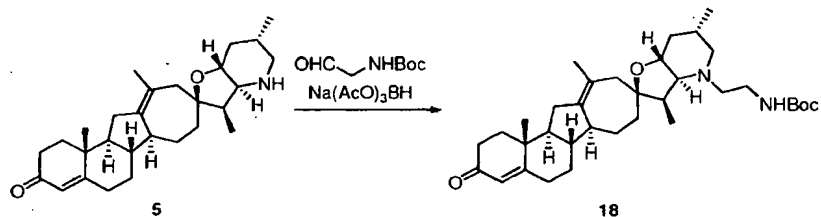
Un matraz de fondo redondo se cargó con material de partida (59 mg, 0.126 mmol, 1 eq) y carbonato potásico (350 mg, 2.5 mmol, 20 eq). Los sólidos se suspendieron en 3 ml de DCM. La reacción se cargó con yodometano (80 µl, 1.29 mmol, 10 eq) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se cargó con agua. La fase orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo nuevamente con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron y se concentraron hasta secarse. El residuo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice DCM/MeOH (95:5→90:10) para proporcionar 52 mg del producto deseado. ([M+H]⁺ = 639.5 m/z).

Ejemplo 9



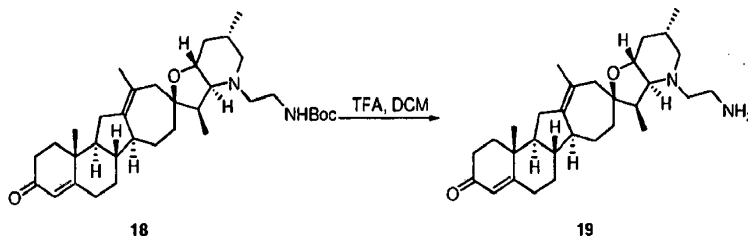
17

Etapa A



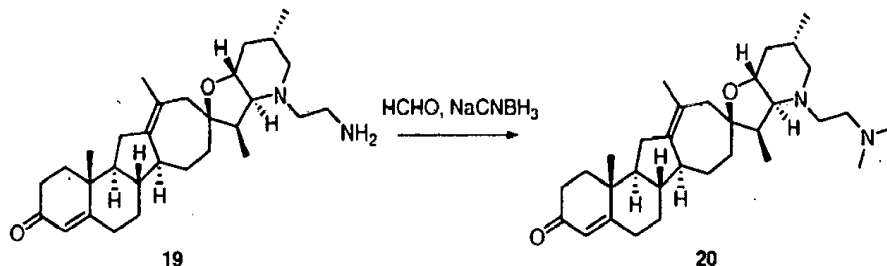
En un matraz de fondo redondo, el compuesto 5 (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) y *N*-(*t*-butoxicarbonil)-aminoacetaldehído (6 mg, 0.38 mmol, 3.1 eq) se disolvieron en DCM (2 ml). Se añadió triacetoxiborohidruro sódico (8 mg, 0.38 mmol, 3.1 eq) y la reacción se agitó por 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en solución de NaHCO_3 saturado acuoso y el residuo se extrajo con DCM (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron a través de algodón y se evaporaron para dar un sólido espumoso (95 mg). El material crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos 1:1) para producir 55 mg del compuesto 18.

Etapa B



Un matraz de fondo redondo se cargó con material de partida 18 (800 mg, 1.4 mmol, 1 eq). El sólido se disolvió en una solución de DCM y TFA (10 ml, 1:1). La solución se agitó por 45 min a temperatura ambiente. La reacción se particionó entre una solución de 10% carbonato sódico y DCM. El producto orgánico se separó y se lavó con 10% carbonato sódico. La fase orgánica se concentró hasta secarse. El residuo se usó sin purificación adicional para la próxima etapa.

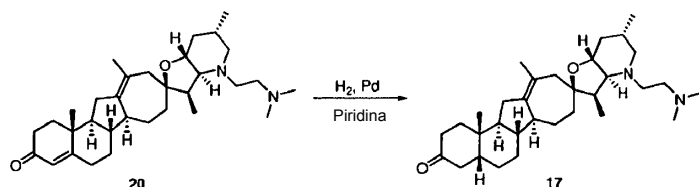
Etapa C



Un matraz de fondo redondo se cargó con material de partida (300 mg, 0.64 mmol, 1 eq) se disolvió en THF/ACN (1:1, 4 ml). A la reacción se cargó 37% formaldehído en agua (240 μl , 3.22 mmol, 5 eq) y cianoborohidruro sódico (64 mg, 1 mmol, 1.6 eq). La mezcla se agitó por 30 min a temperatura ambiente. La reacción se particionó después entre una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y DCM. El producto orgánico se separó, se secó y se

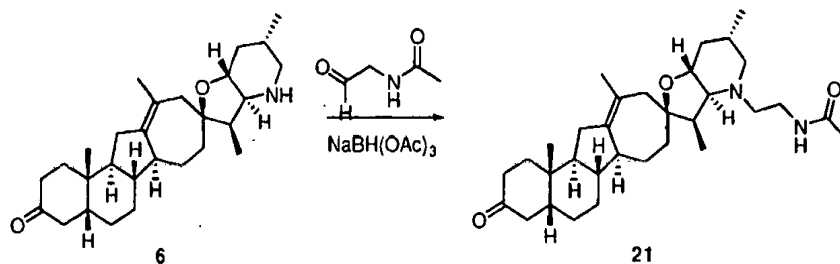
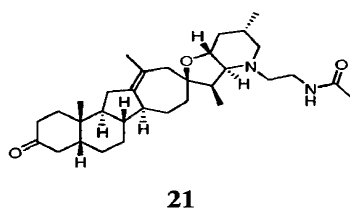
concentró hasta secarse. El material crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 5:95→10:90) para dar el material deseado.

Etapas D



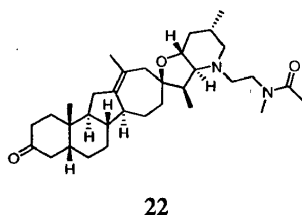
Un matraz de fondo redondo se cargó con material de partida 20 (30 mg, 0.06 mmol, 1 eq) y 10% paladio sobre carbono (30 mg). Los sólidos se suspendieron en piridina (2 ml). La suspensión se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite® y el filtrado se concentró hasta secarse. El material crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 5:95→10:90) para dar el material deseado. ($[M+H]^+$ = 497.7 m/z).

Ejemplo 10



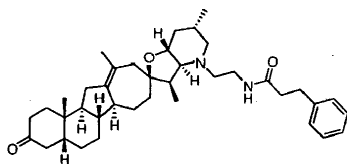
Un matraz de fondo redondo se cargó con material de partida (85 mg, 0.20 mmol, 1 eq) disuelto en DCM (4 ml). La reacción se cargó con N -(2-oxoetil)acetamida (80 mg, 0.70 mmol, 3.5 eq) y triacetoxiborohidruro sódico (170 mg, 0.80, 4 eq). La mezcla se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se particionó entre una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y DCM. El producto orgánico se separó, se secó y se concentró hasta secarse. El material crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 5:95) para dar el material deseado. ($[M+H]^+$ = 511.7 m/z).

Ejemplo 11



El compuesto 22 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 9, usando *N*-metil-*N*-(2-oxoetil)acetamida en lugar de *N*-(2-oxoetil)acetamida. ([*M*+*H*] = 525.7 *m/z*).

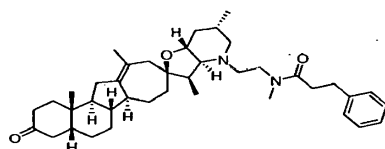
Ejemplo 12



23

El compuesto 23 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 10, usando *N*-(2-oxoetil)-3-fenilpropanamida en lugar de *N*-(2-oxoetil)acetamida. ([*M*+*H*] = 601.8 *m/z*).

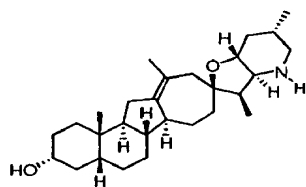
Ejemplo 13



24

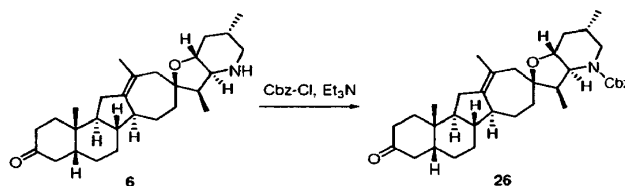
El compuesto 23 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 10, usando *N*-metil-*N*-(2-oxoetil)-3-fenilpropanamida en lugar de *N*-(2-oxoetil)acetamida. ([*M*+*H*] 615.9 *m/z*)

Ejemplo 14

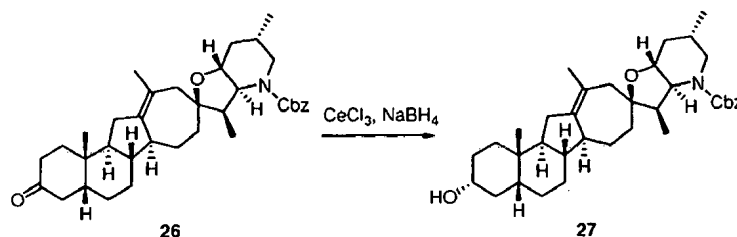


25

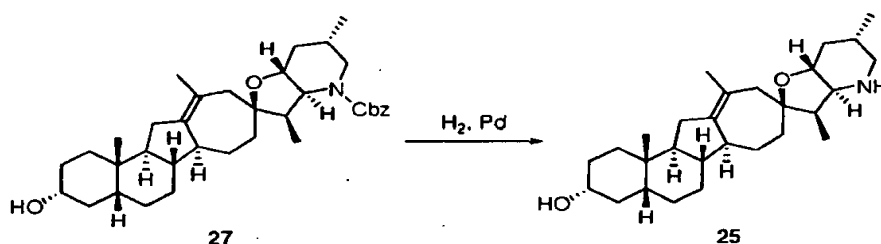
Etapa A



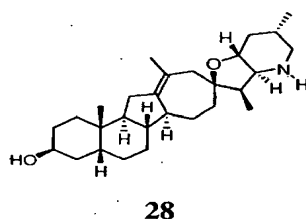
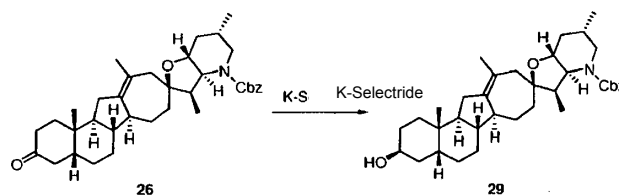
Un matraz de fondo redondo se cargó con el compuesto 6 (4.23 g, 9.94 mmol, 1 eq) y THF (60 ml). Trietilamina (6.92 ml, 49.7 mmol, 5.0 eq) y clorofornato de bencilo (1.54 ml, 10.93 mmol, 1.1 eq) se añadieron y la mezcla se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se particionó entre bicarbonato acuoso saturado (100 ml) y EtOAc (100 ml). Las fases se separaron y los productos orgánicos se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron hasta secarse. El material crudo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos 2:98→14:86) para dar 3.75g de material.

Etapa B

Una solución de MeOH (10 ml) de triclورو de cerio heptahidrato (260 mg, 0.69 mmol, 1.3 eq.) a 0 °C se trató con borohidruro sódico (24 mg, 0.65 mmol, 1.2 eq), se agitó por 15 min, y después se enfrió hasta -78 °C. Se añadió una solución de THF (10 ml) de cetona 26 (300 mg, 0.54 mmol, 1 eq), y la mezcla se agitó por 1 h y después se calentó hasta la temperatura ambiente. Se añadieron agua (50 ml) y EtOAc (50 ml), se mezclaron, y las capas se dividieron. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró hasta un residuo blanco. El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (éter/hexanos 2:3→1:1) para dar 235 mg de 3-beta alcohol 27.

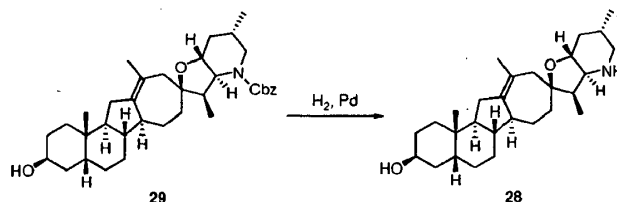
Etapa C

El compuesto 27 (235 mg, 0.42 mmol, 1 eq) se disolvió en EtOAc (7 ml) en un matraz con barra de agitación y septo de goma. La solución se depuró con nitrógeno, y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 50 mg). Esta mezcla se depuró con nitrógeno y después gas hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente por 3h. La mezcla se depuró después con nitrógeno, se filtró a través de una membrana de polietileno de 0.45 µm y se concentró hasta un aceite claro. El aceite se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (NH₄OH(ac.)/MeOH/DCM 0.5:2:97.5→0.5:6:93.5) para dar 130 mg del compuesto 25 como un polvo blanco. ([M+H]⁺ = 427.4 m/z)

Ejemplo 15Etapa A

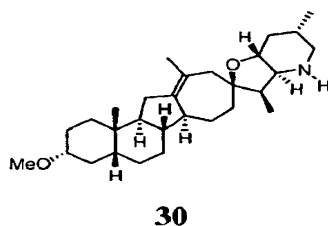
Una solución de THF (10 ml) de cetona 26 (300 mg, 0.54 mmol, 1 eq) a -78 °C se trató con K-Selectride® (tri-sec-butilborohidruro potásico) (0.58 ml, 0.58 mmol, 1.1 eq) y se agitó por 60 min. Se añadió metanol (1 ml) y la solución se calentó hasta la temperatura ambiente. Se añadieron agua (50 ml) y EtOAc (50 ml), se mezclaron, y las capas se dividieron. La capa orgánica se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró hasta un residuo blanco. El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (éter/hexanos 2:3→1:14) para dar 170 mg de 3-alfa alcohol puro 29.

Etapa B

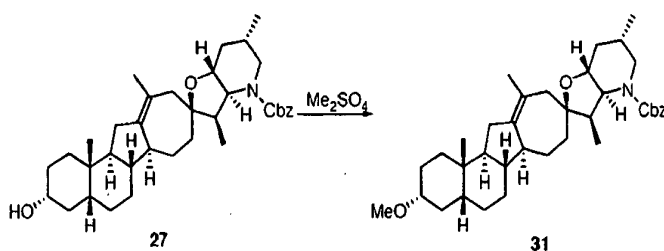


El compuesto 29 (170 mg, 0.30 mmol, 1 eq) se disolvió en EtOAc (5 ml) en un matraz con barra de agitación y septo de goma. La solución se depuró con nitrógeno, y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 35 mg). Esta mezcla se depuró con nitrógeno y después gas hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente por 3h. La mezcla se depuró después con nitrógeno, se filtró a través de una membrana de polietileno de 0.45 μ m y se concentró hasta un aceite claro. El aceite se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice ($NH_4OH(ac.)$ /MeOH/DCM 0.5:2:97.5→0.5:6:93.5) para proporcionar 76 mg del compuesto 28 como un polvo blanco ($[M+H] = 427.4$ m/z).

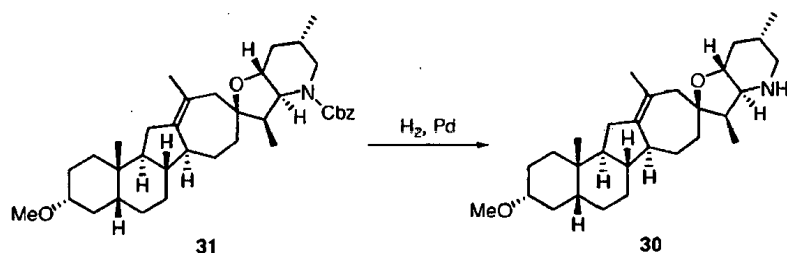
Ejemplo 16



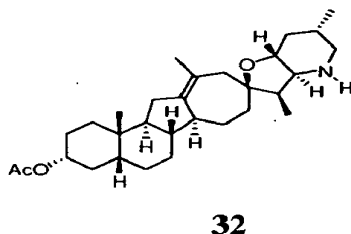
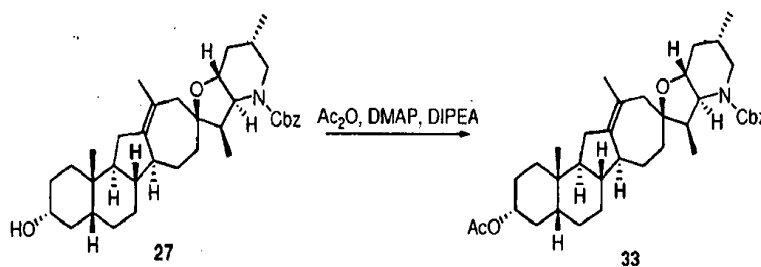
Etapa A



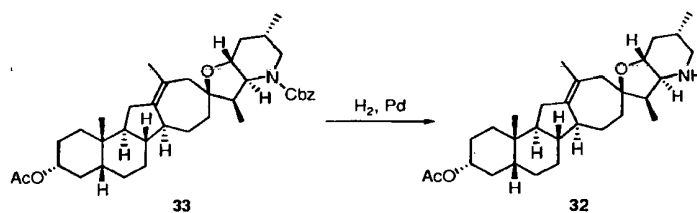
El compuesto 27 (100 mg, 0.18 mmol, 1 eq) con cloruro de benciltriethylamonio (8 mg, 0.36 mmol, 0.2 eq) se disolvió en DCM (5 ml) y se agitó vigorosamente con sulfato de dimetilo (130 μ l, 1.43 mmol, 8 eq) y 50% hidróxido potásico acuoso (0.5 ml) a temperatura ambiente por 18h. La mezcla se particionó entre agua (30 ml) y EtOAc (30 ml), y la capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró hasta un aceite claro. El éter crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (éter/hexanos 3:7→9:113) para dar 75 mg del éter de metilo como un aceite claro.

Etapa B

El compuesto 31 (66 mg, 0.115 mmol, 1 eq) se disolvió en EtOAc (5 ml) en un matraz con barra de agitación y septo de goma. La solución se depuró con nitrógeno, y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 20 mg). Esta mezcla se depuró con nitrógeno y después gas hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente por 3h. La mezcla se depuró después con nitrógeno, se filtró a través de una membrana de polietileno de 0.45 μm y se concentró hasta un aceite claro. El aceite se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice ($NH_4OH(ac.)/MeOH/DCM$ 0.5:2:97.5 $\rightarrow$ 0.5:6:93.5) para dar 22 mg del compuesto 30 como un polvo blanco ($[M+H] = 441.4$ m/z).

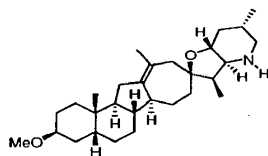
Ejemplo 17Etapa A

El compuesto 27 (100 mg, 0.18 mmol, 1 eq) se disolvió en DCM (5 ml), y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 0.35 mmol, 0.2 eq), N,N-diisopropiletilamina (0.15 ml, 0.9 mmol, 5 eq), y anhídrido acético (0.070 ml, 0.72 mmol, 4 eq) se añadieron. Después de agitar por 12h a temperatura ambiente, la solución se dividió entre EtOAc (30 ml) y 5% bicarbonato sódico acuoso (15 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró hasta un aceite claro. El éster crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter/hexanos 3:7 $\rightarrow$ 9:113) para dar 100 mg del éster como un aceite claro.

Etapa B

El compuesto 33 (100 mg, 0.18 mmol, 1 eq) se disolvió en EtOAc (5 ml) en un matraz con barra de agitación y septo de goma. La solución se depuró con nitrógeno, y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 20 mg). Esta mezcla se depuró con nitrógeno y después gas hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente por 3h. La mezcla se depuró después con nitrógeno, se filtró a través de una membrana de polietileno de 0.45 μm y se concentró hasta un aceite claro. El aceite se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice ($\text{NH}_4\text{OH}(\text{ac.})/\text{MeOH}/\text{DCM}$ 0.5:2:97.5 $\rightarrow$ 0.5:6:93.5) para dar 45 mg del compuesto 32 como un polvo blanco ($[\text{M}+\text{H}] = 469.4$ m/z).

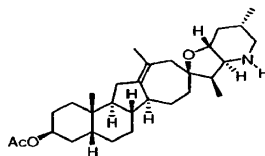
Ejemplo 18



34

El compuesto 34 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 16, usando el compuesto 29 en lugar del compuesto 27. ($[\text{M}+\text{H}] = 441.4$ m/z).

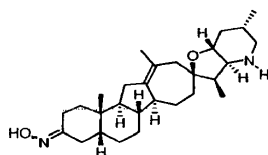
Ejemplo 19



35

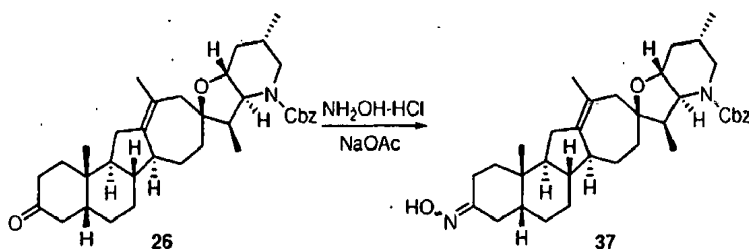
El compuesto 34 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 17, usando el compuesto 29 en lugar del compuesto 27. MS ($[\text{M}+\text{H}] = 469.4$ m/z)

Ejemplo 20

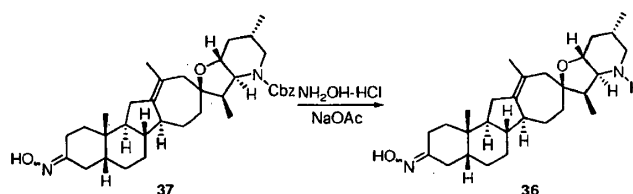


36

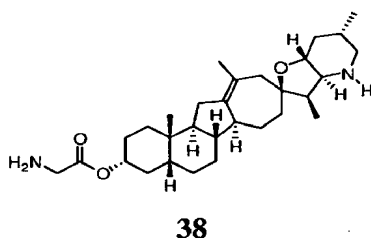
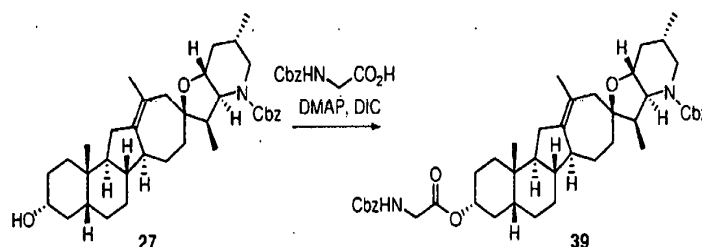
Etapa A



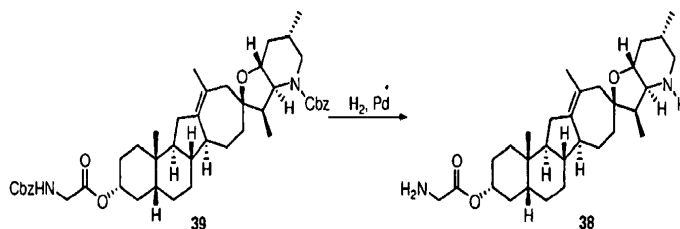
Una solución de etanol (5 ml) del compuesto 26 (185 mg, 0.3 mmol, 1 eq) se trató con hidrocloreto de hidroxilamina (140 mg, 2 mmol, 6 eq), acetato sódico (160 mg, 2 mmol, 6 eq), y agua (0.5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1 hr. La mezcla se dividió entre EtOAc y agua (50 ml cada uno). La capa orgánica se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró hasta un residuo blanco. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter/hexanos 2:3 $\rightarrow$ 1:1) para dar 193 mg de oxima 37.

Etapla B

El compuesto 37 (65 mg, 0.113 mmol) se disolvió en EtOAc (7 ml) en un matraz con barra de agitación y septo de goma. La solución se depuró con nitrógeno, y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 20 mg). Esta mezcla se depuró con nitrógeno y después gas hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente por 3h. La mezcla se depuró después con nitrógeno, se filtró a través de una membrana de polietileno de 0.45 μm y se concentró hasta un aceite claro. El aceite se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice ($\text{NH}_4\text{OH}(\text{ac.})/\text{MeOH}/\text{DCM}$ 0.5:2:97.5 $\rightarrow$ 0.5:6:93.5) para dar 15 mg del compuesto 36 como un polvo blanco, una mezcla de isómeros cis y trans oxima de oxima ([M+H] = 440.3 m/z).

Ejemplo 21Etapla A

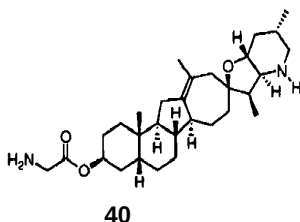
El compuesto 27 (42 mg, 0.075 mmol, 1 eq) se disolvió en DCM (5 ml), y se añadieron 4-dimetilaminopiridina (2 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq), N-Cbz glicina (23 mg, 0.110 mmol, 1.5 eq), y diisopropilcarbodiimida (0.023 ml, 0.150 mmol, 2 eq). Después de agitar por 12h a temperatura ambiente, la solución se dividió entre EtOAc (30 ml) y 5% bicarbonato sódico acuoso (15 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró hasta un aceite claro. El éster crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (éter/hexanos 2:3 $\rightarrow$ 1:1) para dar 35 mg del éster como un aceite claro

Etapla B

El compuesto 39 (235 mg, 0.42 mmol, 1 eq) se disolvió en EtOAc (7 ml) en un matraz con barra de agitación y septo de goma. La solución se depuró con nitrógeno, y se añadió Pd/C 10% (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa, 50

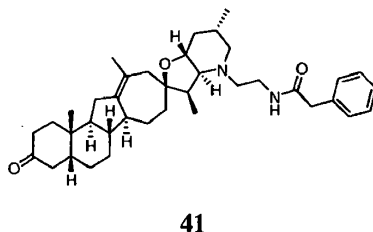
mg). Esta mezcla se depuró con nitrógeno y después gas hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente por 3h. La mezcla se depuró después con nitrógeno, se filtró a través de una membrana de polietileno de 0.45 μm y se concentró hasta un aceite claro. El aceite se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice ($\text{NH}_4\text{OH}(\text{ac.})/\text{MeOH}/\text{DCM}$ 0.5:2:97.5 $\rightarrow$ 0.5:6:93.5) para dar 17 mg del producto deseado como un polvo blanco ($[\text{M}+\text{H}] = 452.4$ m/z).

Ejemplo 22



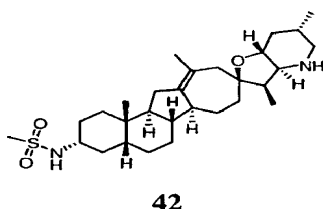
El compuesto 40 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 21, usando el compuesto 29 en lugar del compuesto 27. ($[\text{M}+\text{H}] = 452.4$ m/z)

Ejemplo 23

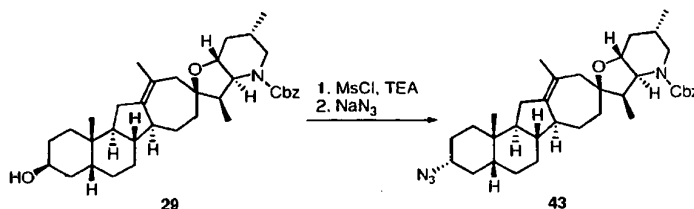


El compuesto 41 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 10, usando *N*-(2-oxoetil)-2-fenilacetamida en lugar de *N*-(2-oxoetil)acetamida. ($[\text{M}+\text{H}] = 587.7$ m/z).

Ejemplo 24



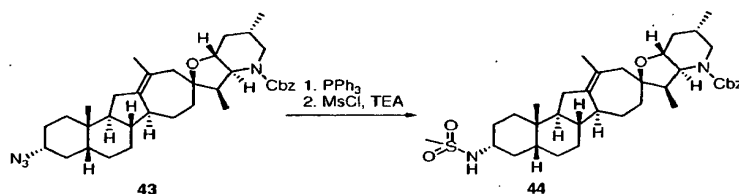
Etapas A



Un matraz de fondo redondo se cargó con alcohol 29 (7.60 g, 13.53 mmol, 1 eq) y se disolvió en DCM (115 ml). La reacción se cargó con trietilamina (8.21 g, 81 mmol, 6.0 eq). La mezcla se enfrió hasta 0°C y se cargó con metanosulfonilcloruro (1.86 g, 16.2 mmol, 1.2 eq). Después de 30 min, la mezcla de reacción se particionó entre una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró hasta secarse. El residuo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos 10 $\rightarrow$ 25%) y dio el material deseado mesilato.

Un matraz de fondo redondo se cargó con el mesilato (9.1 g, 14.22 mmol, 1 eq) y se disolvió en 50 ml de DMPU. La reacción se cargó con azida sódica (4.62 g, 71.1 mmol, 5.0 eq) y se calentó hasta 60°C. La mezcla se agitó por 17 h. La mezcla de reacción se enfrió después hasta la temperatura ambiente y se cargó con agua. La mezcla se agitó por 30 min. La mezcla se filtró al vacío, se enjuagó con agua y se secó al aire y se usó directamente sin purificación en la próxima etapa.

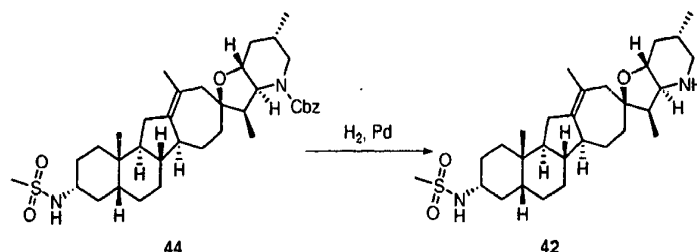
Etapa B



Un matraz de fondo redondo se cargó con azida 43 (8.35 g, 14.23 mmol, 1 eq) y se añadió THF (120 ml). La reacción se cargó después con trifetilfosfina (11.2 g, 42.7 mmol, 3.0 eq). La mezcla se calentó hasta 50°C y se agitó por 20 h. La mezcla de reacción se enfrió después hasta la temperatura ambiente y el solvente se eliminó al vacío. El residuo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (MeOH/DCM 10% → 20%) para proporcionar la amina.

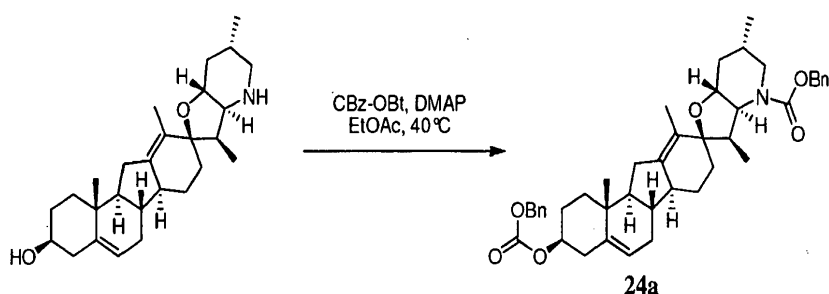
Un matraz de fondo redondo se cargó con la amina (5.10 g, 9.09 mmol, 1 eq) y se disolvió en DCM (60 ml). La reacción se cargó con N,N-diisopropiletilamina (5.88 g, 45.5 mmol, 5.0 eq). La mezcla se enfrió hasta 0°C y se cargó con metanosulfonilcloruro (2.08 g, 18.2 mmol, 2.0 eq). Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se particionó entre una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y EtOAc. La capa orgánica se recogió, se secó sobre sulfato sódico y se concentró hasta secarse. El residuo se purificó usando cromatografía rápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos 10 → 30%) para proporcionar la Cbz metanosulfonamida protegida.

Etapa C

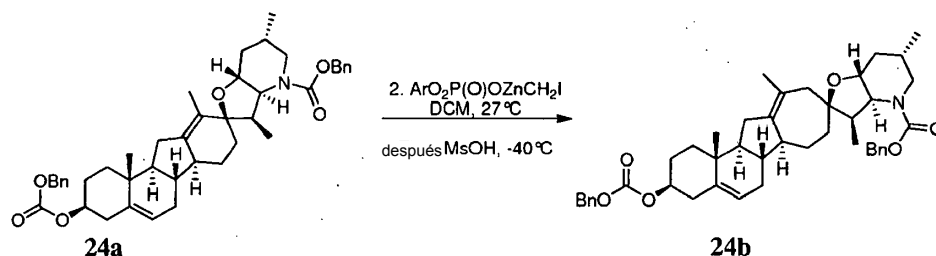


Un matraz de fondo redondo se cargó con la Cbz metanosulfonamida protegida (5.37 g, 8.41 mmol, 1 eq) y 10% de paladio sobre carbono (1.0 g). Los sólidos se suspendieron en 2-propanol (50 ml). La suspensión se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó por 4 h a 25°C. La mezcla de reacción se filtró después sobre Celite® y el filtrado se concentró hasta secarse. El residuo se purificó después usando cromatografía rápida en gel de sílice (DCM/MeOH 0 → 5%) para proporcionar el producto deseado. [M+H] = 505.6 m/z.

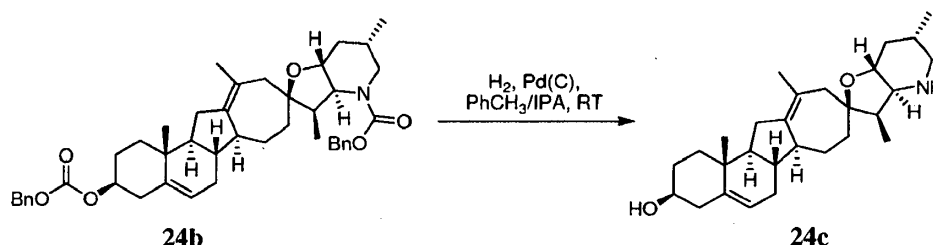
Síntesis alterna del compuesto 42



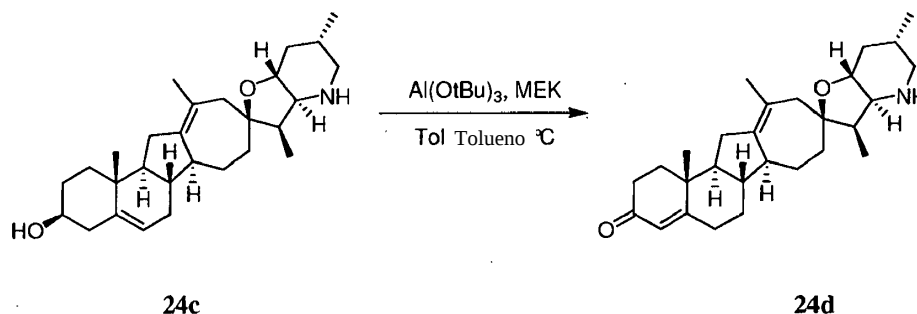
La ciclopamina recristalizada (2.07 g) se carga en un recipiente de reacción de tamaño adecuado y se coloca bajo una atmósfera inerte. EtOAc (7.6 g), trietilamina (1.53 g), y DMAP (307 mg) se añaden secuencialmente. La suspensión se calienta hasta 40°C. Cbz-OBt se añade en tres porciones durante 90 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de 45°C. La mezcla de reacción se agita a 40°C por 90 minutos. La temperatura se mantiene mientras el metanol (26.4 g) se añade lentamente a la mezcla de reacción. La suspensión resultante se enfría hasta la temperatura ambiente y se agita por al menos 15 horas. El producto crudo se recoge por filtración y se enjuaga con metanol (5 g). El sólido blanco se seca al vacío hasta un peso constante y se recristaliza a partir de heptano (30.3 g) y tolueno (3.2 g) para proporcionar el compuesto 24a (3.0 g).



Hidrogenofosfato de bis(2,6-dimetilfenil) sólido y 24a se secan previamente y se colocan bajo una atmósfera de nitrógeno. Dietil zinc puro (722 mg) se carga en un recipiente de reacción de tamaño adecuado que contenía DCM (9.0 g). Soluciones en DCM del fosfato (1.83 g en 17.9 g) e IPI-332690 (1.34 g in 3.6 g) se añaden secuencialmente a o por debajo de 25 °C. Diyodometano (1.58 g) se carga y la reacción se agita a 28°C por 4-6 horas. La reacción se enfría hasta -45°C y se carga una solución de ácido metanosulfónico en DCM (566 mg en 1.5 g). Después de 15 minutos, se añade morfolina (1.711 g) y la mezcla se deja calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. La capa orgánica se lava dos veces con 2N HCl (2 x 13.6 g) después secuencialmente con 4.8 % en peso carbonato sódico (ac.), 4.8 % en peso de sulfito sódico (ac.), y 4.8 % en peso de salmuera (13.6 g cada uno). La capa orgánica se seca, se filtra, se concentra hasta 4 g y se diluye con isopropanol (4 g). El producto se cristaliza a partir de la solución mediante la adición lenta de metanol (9.3 g). La filtración con un enjuague de metanol (2.6 g) y secado proporcionó 1.09 g de 24b (79% de rendimiento del aislado).

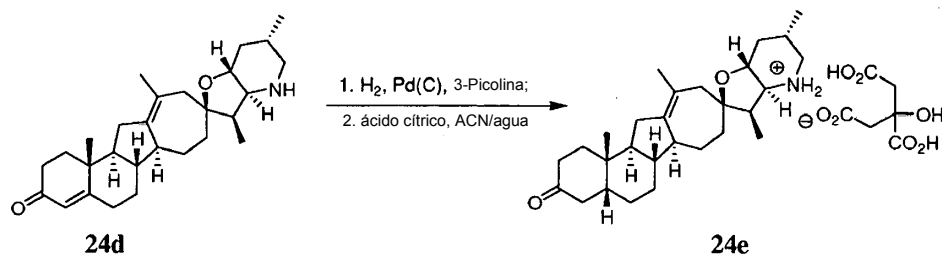


El catalizador de Pd/C A-305038-5 de Johnson Matthey (890 mg) se carga en un recipiente de reacción de tamaño adecuado, seguido por 24b (2.24 g). El recipiente de reacción se purgó con N₂ y tolueno (21.8 g) y 2-propanol (6.7 g) se añaden secuencialmente. El sistema se desgasifica y se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno, y el proceso se repite con hidrógeno. El sistema se agita vigorosamente y la manta de hidrógeno se mantiene a una atmósfera por 4-5 horas. La reacción se monitorea por TLC o HPLC. Si es incompleta, se inertiza la reacción, se carga catalizador adicional (145 mg), y la atmósfera de hidrógeno retorna por una hora. Se carga etilenodiamina (12.9 mg) y la mezcla se agita por 15 minutos. El catalizador se elimina por filtración con un enjuague de tolueno:IPA (3:1). El filtrado y enjuagues se concentran y el solvente se intercambia con tolueno. El producto se cristaliza a partir de tolueno (19.0 g) y heptano (18.0 g) para proporcionar 24c como un sólido blanco cristalino (1.34 g, 98% de rendimiento).

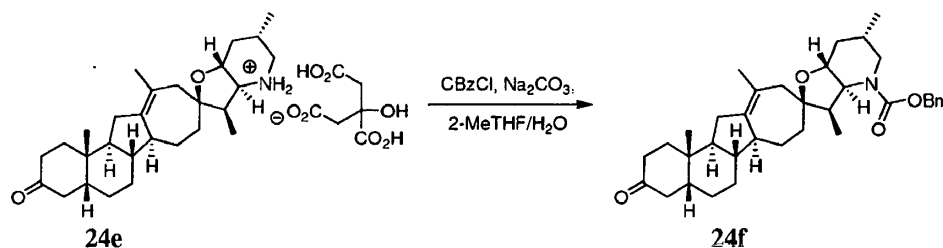


24c (644 mg) se carga en un recipiente de reacción de tamaño adecuado seguido por t-butoxido de aluminio (525

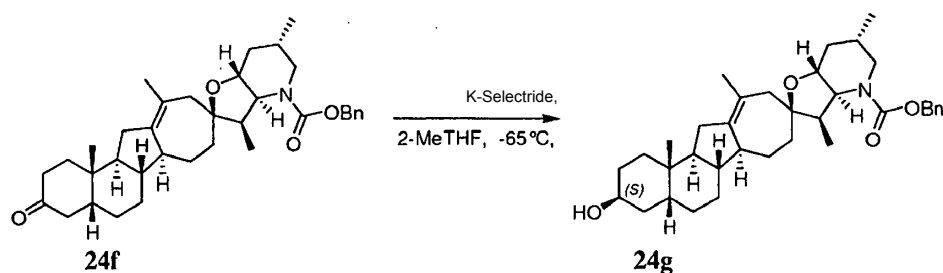
mg), tolueno (8.34 g, 15 vol), y 2-butanona (7.83 g, 15 vol). Los contenidos del matraz se desgasifican con ciclos de evacuación/purga de nitrógeno para eliminar el oxígeno y la mezcla de reacción se calienta a 75°C con agitación vigorosa por 16-18 horas. La reacción se apaga por la adición de sal de Rochelle acuosa (2.6 g en 10.3 g agua) y la mezcla se agitó vigorosamente por una hora a 45°C. Las capas acuosa y orgánica se separan. La capa acuosa se extrae nuevamente con una mezcla de tolueno (2.9 g) y EtOAc (2.9 g). Las capas orgánicas se combinan y se lavan con una nueva solución de sal de Rochelle (2.6 g en 10.3 g agua) y después con agua (12.9 g). La capa orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico (1.97 g), se filtra, y se concentra al vacío. El producto se cristaliza a través de un intercambio de carga y solvente de concentración primero a IPA (6.5 g) y después heptano (7.7 g). La suspensión espesa de heptano (-2.7 g) se agita durante la noche y los sólidos se recogen por filtración. El secado al vacío proporciona 24d (550 mg) con un rendimiento de 85%.



La enona 24d (459 mg) y el paladio sobre carbono de Johnson-Matthey al 5% (A503023-5, 101 mg) se cargaron en un recipiente de reacción de múltiples cuellos de tamaño adecuado. El recipiente se purgó con nitrógeno y 3-picolina (2.2 g) se carga como el solvente. La agitación comenzó y el recipiente se desgasifica primero usando nitrógeno y después se agitó bajo hidrógeno a presión atmosférica por 8 horas. Al final de la reacción, el catalizador se elimina por filtración a través de un medio de 0.2 micras, y se enjuaga con ACN (1.4 ml). El filtrado y enjuague se combinan en un recipiente de reacción limpio equipado con agitador mecánico, una sonda de temperatura interna, y una atmósfera de nitrógeno. Una solución de ácido cítrico (3.7 g) en agua (9.2 ml) se carga en el recipiente de reacción a o por debajo de 30°C, e IPI-335589 se deja cristalizar lentamente a partir de la solución como la sal de citrato a 20 y después 0°C. El producto cristalino se recupera mediante filtración por succión y se lava con agua (3.7 ml). Después de secado, la sal de citrato, 24e, se aísla como un hidrato (3-5 % en peso agua) en 89.5% de rendimiento (622 mg) con una relación β : α de aproximadamente 90:1.

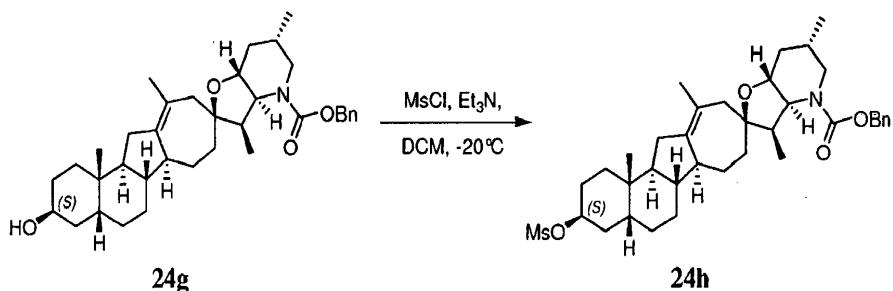


24e (1.50 g) se carga en el reactor de tamaño adecuado junto con 2-metiltetrahidrofurano (7.7 g) y 1M carbonato sódico (9.0 ml) una solución de cloromato de bencilo (454 mg) en 2-metiltetrahidrofurano (300 mg) se añade a través de un embudo de adición y la reacción está a temperatura ambiente por 1-2 horas. Cuando la reacción se completa, se detiene la agitación, las capas se separan y la capa orgánica se lava dos veces con agua (2 x 6 g). La capa orgánica se seca sobre sulfato sódico (3 g), se filtra y se concentra. El agua residual se reduce adicionalmente por concentración a partir de 2-metiltetrahidrofurano fresco (6.5 g) y el material se transfiere como solución en 2-metiltetrahidrofurano anhidro a la siguiente reacción.

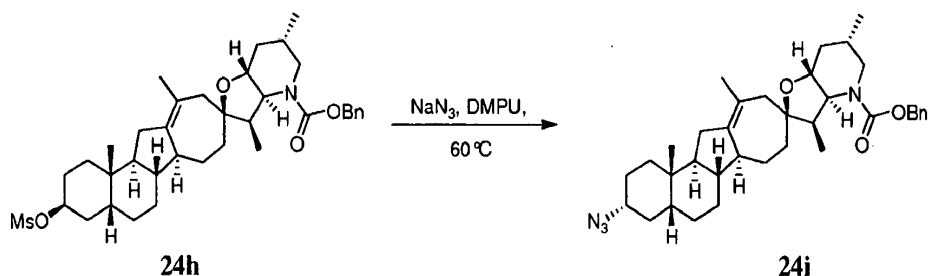


1 M K-Selectride comercial en THF (1.20 g) se carga en un recipiente de reacción seco bajo una atmósfera de nitrógeno, se diluye con 2-metiltetrahidrofurano anhidro (2.10 g) y se enfría hasta -65°C. la solución of 24f (0.41 g) en 2-metiltetrahidrofuran (1.5 g), is then lentamente added to La recipiente de reacción to control the internal

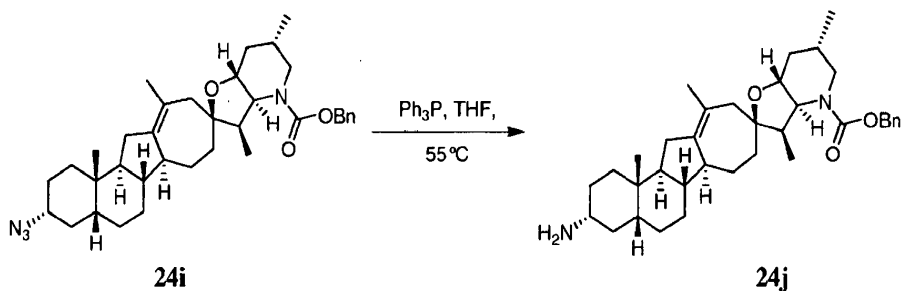
temperature a $-65\pm 5^\circ\text{C}$. La reacción se agita por 2 horas y se calienta a -20°C durante aproximadamente 1 hora y se agita por una hora adicional. La reacción se monitorea por HPLC y las reacciones que son incompletas se conducen hasta la terminación con K-selectride adicional. La reacción se apaga a baja temperatura con MeOH (0.33 g), después 3M NaOH (2.4 g) a -20°C y 15% de peróxido de hidrógeno en agua (1.04 g) a o por debajo de 5°C , después se agita durante la noche a temperatura ambiente. Las capas se separan y la capa orgánica se lava secuencialmente con 1M NaOH acuoso (2 ml), 0.5 M Na_2SO_3 acuoso (2 ml), y agua (2 ml) ajustada a un pH de 3 con HCl. La capa orgánica se seca sobre sulfato sódico (0.82 g), se filtra y se concentra. El producto 24g (0.457 g) se vuelve a concentrar a partir de DCM (0.9 g) y se usa en la próxima reacción.



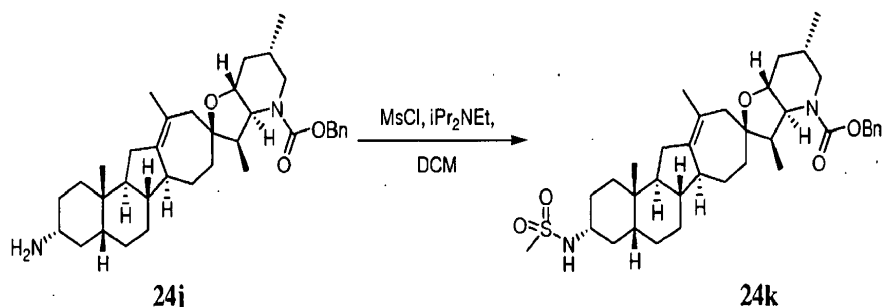
24g (1.36 g) se carga con DCM anhidro (18.1 g) en un recipiente de reacción de tamaño adecuado, se coloca bajo una atmósfera inerte y se enfría hasta -20°C . Trietilamina (0.61 mg) se carga seguido por la adición lenta de metanosulfonil cloruro (373 mg) en DCM anhidro (300 mg). La reacción se agita por 1 hora a -20°C . La reacción se monitorea por HPLC. Las reacciones incompletas se llevan hasta la terminación con metanosulfonil cloruro adicional. Cuando se completa, la reacción se apaga con agua (13.6 g) y se deja calentar. Las capas se separan y la capa orgánica se lava con 2.5 % en peso de bicarbonato sódico (13.8 g) y después agua (10.9 g). La capa orgánica se seca sobre sulfato sódico (4 g), se filtra, y se concentra. La solución del producto se intercambia de solvente vía carga y concentración a t-butil metil éter (10.9 ml) y después 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU, 4.7 ml). La solución de DMPU se usa directamente en la siguiente reacción.



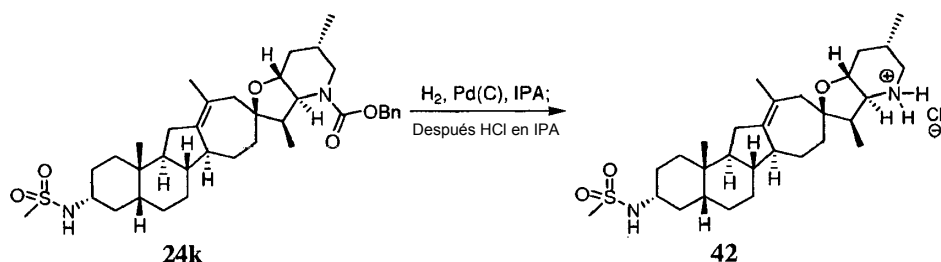
Azida sódica (0.74 g) se carga en un recipiente de reacción de tamaño adecuado. La solución de 24h (1.46 g) en DMPU (5.9 g) se carga en el recipiente de reacción, se enjuaga con DMPU adicional (1.9 g). La suspensión se calienta hasta 60°C por 15 horas, manteniendo el pase de nitrógeno por toda la reacción. La reacción se enfría hasta la temperatura ambiente y se diluye con MTBE (11.7 g). La solución orgánica se lava 3 veces con 2% solución salina (3 x 8 g), se seca sobre sulfato sódico (4.4 g), se filtra, y se concentra. El producto se concentra a partir de THF (6.4 g) y se usa directamente en la próxima reacción.



El producto crudo 24i (1.34 g) se disuelve y se transfiere a un recipiente de reacción de tamaño adecuado con THF (12.6 g). Trifenilfosfina (0.70 g) y agua (0.44 g) se cargan y la reacción se calienta hasta 55°C por 15-24 horas. Cuando se completa, la reacción se enfría hasta la temperatura ambiente, se seca con sulfato magnésico (1.4 g), se filtra y se concentra. Los sólidos se disuelven y se concentra a partir de tres porciones de DCM (3 x 9 g) y se purifican por cromatografía en gel de sílice usando gradientes DCM/MeOH/Et₃N para eliminar las impurezas basadas en el reactivo. Las fracciones se concentran hasta secarse, se disuelven en DCM (6.8 g) y se concentran hasta secarse nuevamente para proporcionar un sólido amorfo (1.12 g) que se usa en la siguiente reacción.

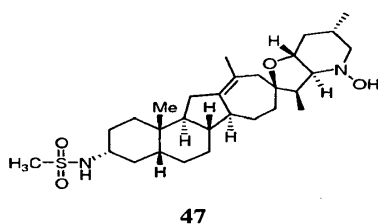


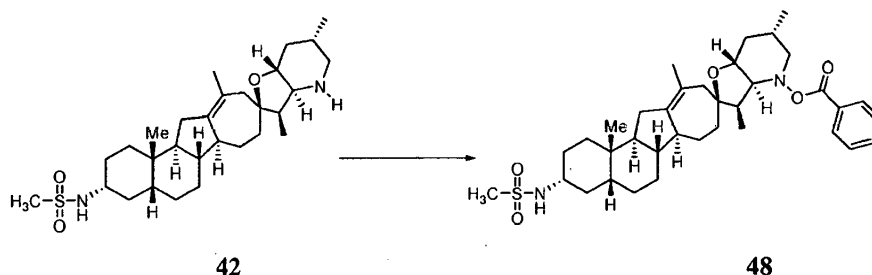
24j (1.09 g) se disuelve y transfiere a un recipiente de reacción de tamaño adecuado con DCM anhidro (15.8 g) y se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución se enfría hasta 0°C. N,N-diisopropiletilamina (357 mg) y metanosulfonil cloruro puro (0.165 ml) se cargaron secuencialmente mientras se mantiene la temperatura entre por debajo de 5 °C. La reacción se monitorea por HPLC. Las reacciones incompletas se llevan hasta la terminación con metanosulfonil cloruro adicional. La reacción se apaga con 0.4 M bicarbonato sódico acuoso (11.4 g) y se calienta hasta la temperatura ambiente. Las capas se separan y la fase acuosa se extrae nuevamente con DCM (5.8 g). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato magnésico (0.55 g), se filtran y se concentran. El producto 24k se disuelve y despoja de 2-propanol (4.0 g) para eliminar el DCM residual y se usó directamente en la siguiente reacción.



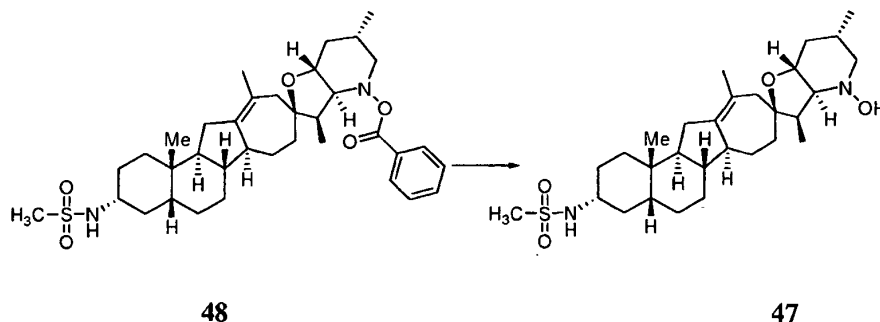
10% de Pd/C tipo E101 de Aldrich Degussa NE/W (249 mg) se carga en un recipiente de reacción de tamaño adecuado y se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno. Una solución de 2-propanol (9.8 g) de 24k (1.24 g) se carga en el recipiente de reacción. El sistema se desgasifica y se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno, y el proceso se repite con hidrógeno. La reacción se agita bajo 1 atm de hidrógeno a temperatura ambiente por 8 horas. Una atmósfera inerte retorna al recipiente y una segunda carga de catalizador (125 mg) diluido en 2-propanol (0.5 g) se añade a la reacción. La mezcla de reacción se desgasifica y se coloca bajo una atmósfera de nitrógeno, y el proceso se repite con hidrógeno. La reacción se agita bajo 1 atm de hidrógeno por otras 15 horas a temperatura ambiente. La reacción se monitorea por HPLC. Las reacciones incompletas se tratan con catalizador adicional e hidrógeno. Cuando se completa, la reacción se filtra, se trata con vapor de carbón activo (200 mg), y se filtra otra vez. La solución se seca por concentración parcial y se transfiere a un recipiente de reacción y se diluye con 2-propanol anhidro a 0.09 M basado en el rendimiento teórico. Una solución de HCl 1.25 M en 2-propanol (1.64 g) se carga durante 20 minutos. La sal de hidrocloreuro cristaliza lentamente con agitación suave y se aísla por filtración. Los cristales se lavan con 2-propanol (2.5 g) y se secan al vacío para proporcionar el Compuesto 42 (916 mg, 80% de rendimiento) como un solvato IPA 1:1.

Ejemplo 25

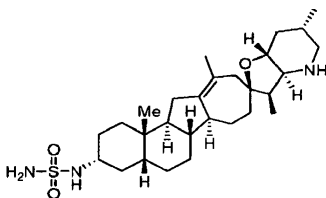


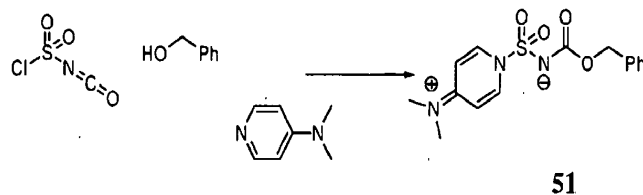
Etapla A

Un matraz de fondo redondo se cargó con la amina 42 (1.1 g, 2.1 mmol, 1 equiv.), tetrahidrofurano seco (10 ml) y piridina (880 μ L, 10.9 mmol, 5 equiv.). La mezcla fría (0°C) se trató con benzoylperóxido (1.6 g, 6.5 mmol, 3 equiv.). La mezcla se agitó por 2 horas a 0°C después durante la noche a 25°C. La mezcla de reacción se diluye con MTBE y se lava con una mezcla de NaHCO₃ saturado acuoso con 1 N NaOH hasta la separación de la capa. La capa orgánica se recogió y lo acuoso se re-extrajo una vez con MTBE. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron hasta secarse. El aceite crudo se disolvió en 5 ml de CH₂Cl₂, se cargó en una columna de SiO₂ (40 g) y se eluyó a partir de hexanos/EtOAc (10% a 50%) para dar el derivado de benzoilo 48 (380 mg) ([M+H] = 625.4 m/z).

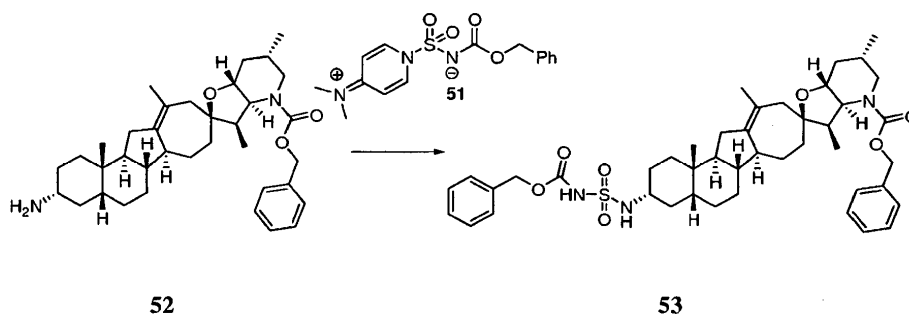
Etapla B

Un matraz de fondo redondo se cargó con 48 (374 mg, 0.6 mmol, 1 equiv.) y MeOH (5 ml). La solución se trató a 25°C en presencia de 2 N KOH (0.3 ml, 0.6 mmol, 1 equiv.). La mezcla se agitó por 3h. El solvente se eliminó al vacío. MTBE se añadió al residuo, el cual se neutralizó con 1N HCl. Las capas se cortaron y la capa acuosa se extrajo con dos porciones de CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtra, y se concentra hasta secarse. El material crudo (380 mg) se disolvió con CH₂Cl₂, se cargó en una columna SiO₂ (12 g) y se eluyó con hexanos/EtOAc (0% a 100%) para dar la hidroxilamina 47. El material se liofilizó a partir de t-BuOH/7% H₂O para dar 213 mg de 47 como un polvo blanco ([M+H] = 521.4 m/z).

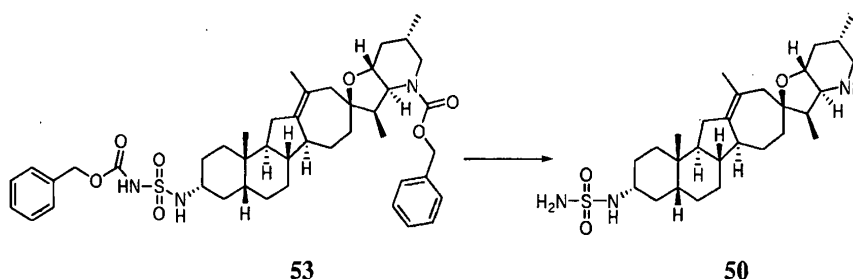
Ejemplo 26

Etapa A

Un matraz seco con una pistola de calor se cargó con CH_2Cl_2 seco (5 ml) y bencil alcohol (785 μL , 7.58 mmol, 1.3 equiv.). La solución fría (0°C) se trató con clorosulfonil isocianato (506 μL , 5.83 mmol, 1 equiv.). Después, DMAP (1.4 g, 11.6 mmol, 2 equiv.) se añadió y la mezcla se agitó por 1 h a 25°C . Después de complete disolución of DMAP, la reacción fue clara por un corto periodo. Después, se formó un precipitado blanco esponjoso. La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (30 ml) y se lavó con tres porciones (30 ml cada) de agua. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se evaporó hasta secarse. El sólido blanco deseado 51 se tomó en la siguiente etapa sin purificación.

Etapa B

Un matraz de fondo redondo se cargó con 52 (30 mg, 0.053 mmol, 1 equiv.) y 51 (18 mg, 0.053 mmol, 1 equiv.). Ambos reactivos se disolvieron en CH_2Cl_2 (2 ml) y la solución se agitó a 25°C . El material crudo se cargó en una SiO_2 columna (4 g) y se eluyó con hexanos/ EtOAc (0% a 50%) para dar 16 mg del derivado sulfamoilato 53 ($[\text{M}+\text{Na}] = 796.4 \text{ m/z}$).

Etapa C

Un matraz de fondo redondo se cargó con 53 (16 mg, 0.021 mmol, 1 equiv.) y 11 mg de 10% Pd/C (húmedo, tipo E101 de Aldrich Degussa). El material se suspendió en 2-propanol (3 ml). El matraz se selló y se purgó tres veces con hidrógeno y se dejó durante la noche bajo 1 atm de hidrógeno. La suspensión se filtró a través de Acrodisc 0.2 micras, se lavó con 2-propanol, y el solvente se eliminó al vacío. El residuo se purificó por columna SiO_2 (1 g) eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5% to 10%). El producto principal se liofilizó a partir de t-BuOH/7% H_2O para dar 9 mg de sulfamida 50 ($[\text{M}+\text{H}] = 506.4 \text{ m/z}$).

Ejemplo 28: Inhibición de la vía Hedgehog en el cultivo celular

Los efectos de muerte de la célula cancerosa específica por la vía Hedgehog pueden determinarse mediante el siguiente ensayo. Células C3H10T1/2 se diferencian en osteoblastos cuando contactan con el péptido sónico hedgehog (Shh-N). Tras la diferenciación; estos osteoblastos producen altos niveles de fosfatasa alcalina (AP) que puede medirse en un ensayo enzimático (Nakamura y otros, 1997 BBRC 237: 465). Los compuestos que bloquean la diferenciación de C3H10T1/2 en los osteoblastos (un evento dependiente de Shh) puede por lo tanto identificarse por una reducción en la producción de AP (van der Horst y otros, 2003 Bone 33: 899). Los detalles del ensayo se describen más abajo. Los resultados aproximados (EC_{50} para inhibición) del ensayo de diferenciación se muestran más abajo en la Tabla 1.

Protocolo de ensayoCultivo celular

Células C3H10T1/2 de fibroblastos mesodérmico embrionario de ratón (obtenido de ATCC) se cultivaron e medio MEM basal (Gibco/Invitrogen) suplementado con 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone), 50 unidades/ml de penicilina y 50ug/ml de estreptomycin (Gibco/Invitrogen) a 37C con 5% CO2 en atmósfera de aire.

Ensayo de fosfatasa alcalina

Las células C3H10T1/2 se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 8×10^3 células/pocillo. Células se cultivaron hasta la confluencia (72hrs). Después de Hedgehog sónico (250ng/ml), y/o el tratamiento del compuesto, las células se lisaron en 110 µl de tampón de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 0.1% TritonX100), las placas se sonicaron y los lisados se centrifugaron a través de placas de PVDF de 0.2 µm (Coming). 40 µl de los lisados se ensayó para la actividad AP en solución tampón alcalina (Sigma) que contenía 1mg/ml p-Nitrofenil fosfato. Después de incubar por 30 min a 37 °C, las placas se leyeron en un lector de placa Envision a 405 nm. La proteína total se cuantificó con un kit de ensayo de proteína BCA de Pierce de acuerdo con instrucciones del fabricante. La actividad AP se normalizó contra la proteína total. Note que "A" indica que IC_{50} es menor que 20 nM, "B" indica que IC_{50} es 20-100 nM, "C" indica que IC_{50} es > 100 nM.

Tabla 1 -- EC_{50} aproximado para Inhibición

Compuesto	Ensayo de diferenciación EC_{50}
1	A
7	C
8	C
9	C
10	C
13	A
20	A
21	B
22	A
23	A
24	A
27	B
29	B
31	B
33	C
35	A
37	A
39	B
40	A
42	A

Ejemplos 29: Modelo de cáncer pancreático

La actividad del compuesto 42 se probó en un modelo pancreático humano: células BXP-3 se implantaron subcutáneamente en los flancos de las patas derechas de los ratones. El día 42 post-implante del tumor, los ratones se aleatorizaron en dos grupos para recibir el vehículo (30%HPBCD) o Compuesto 42. El Compuesto 42 se dosificó a 40mg/kg/día. Después de recibir 25 dosis diarias, el Compuesto 42 redujo estadísticamente el crecimiento del volumen del tumor en 40% cuando se compara con el vehículo control ($p=0.0309$). Al final del estudio, los tumores se cosecharon 4 horas posterior a la última dosis para evaluar una respuesta en el objetivo por análisis q-RT-PCR de los genes de la vía HH. El análisis del Gli-1 humano resultó en no modulación. El análisis de los niveles de ARNm. Gli-1 murino resultó en una regulación descendente robusta en el grupo tratado con el Compuesto, cuando se compara con el grupo tratado con el vehículo.

Ejemplo 30: Modelo del meduloblastoma

La actividad del compuesto 42 se evaluó además en un modelo de ratón transgénico de meduloblastoma. Los ratones que son heterocigotos para la pérdida de las mutaciones de la función en los supresores de tumor Patched1 (Ptc1) e Hypermetilated en Cancer (Hic1) desarrollaron meduloblastoma espontáneo. Similar al meduloblastoma humano, estos tumores demuestran hipermetilación completa del promotor del alelo Hic1 remanente, así como también la pérdida de expresión del alelo Ptc1 silvestre. Cuando se pasan como aloinjertos subcutáneos, estos tumores crecen agresivamente y son dependientes de la vía Hedgehog. Este modelo se empleó para evaluar la eficacia del Compuesto administrado oralmente, y para correlacionar la actividad con la exposición del fármaco en plasma y tumores. La administración oral (PO) de una sola dosis del compuesto 42 condujo a la regulación descendente dependiente de la dosis de la vía HH en tumores implantados subcutáneamente, medido por la expresión de ARNm Gli-1 disminuida 8 horas posteriores a la administración de la dosis.

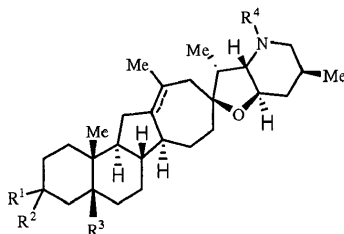
La administración diaria (QD) del compuesto PO condujo a una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del tumor, con franca regresión del tumor observada a dosis superiores. La dosis oral diaria eficaz aproximada para 50% inhibición del crecimiento del tumor (ED50) es 4mg/kg. Cuando los animales se trataron QD por 21 días, se observó una supervivencia a largo plazo seguido al cese del tratamiento (>60 días), con poco a ningún crecimiento del tumor.

Ejemplo 31: Modelo de cáncer de pulmón

Para probar la actividad del compuesto 42 en un modelo de tumor humano SCLC, células LX22 se implantaron subcutáneamente en el flanco de la pata derecha. LX22 es modelo de xenoinjerto primario de SCLC derivado de pacientes de quimioterapia -naive, que se mantienen por pase ratón a ratón. Este tumor responde a quimioterapia con etoposido/carboplatino en forma que se asemeja al entorno clínico. LX22 regresa durante el tratamiento de quimioterapia, pasa a través de un periodo de remisión, y después comienza a repetirse. En el modelo LX22, se probó la actividad del agente de un solo Compuesto y su capacidad para modular la recurrencia a la quimiorresistencia. El día 32 post implante del tumor, los ratones se aleatorizaron en tres grupos de dosificación para recibir el vehículo (30% HPBCD), Compuesto, o la combinación de quimioterapia con etoposido y carboplatino (E/P). El Compuesto 42 se administró a una dosis de 40mg/kg/día, y después de 16 dosis consecutivas no hubo diferencia medible entre los grupos tratados y vehículo. El etoposido se administró i.v a 12mg/kg los días 34, 35, 36, y 48, mientras que el Carboplatino se administró i.v. a 60mg/kg los días 34, 41, y 48, post implante del tumor. El día 50, los ratones tratados con E/P se aleatorizaron adicionalmente para recibir tratamiento de seguimiento con el vehículo (30%HPBCD) o el Compuesto. El Compuesto se administró a la dosis oral múltiple MTD de 40mg/kg/día, y después de 35 dosis consecutivas hubo un retraso sustancial en la recurrencia del tumor en el grupo tratado, comparado con el grupo vehículo ($p=0.0101$).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este;

en donde R^1 es H, alquilo, cicloalquilo, -OR, amino, sulfonamido, sulfamido, -OC(O) R^5 , -N(R^5)C(O) R^5 , o un azúcar;

R^2 es H, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo, nitrilo, heterocicloalquil o heteroarilo; o R^1 y R^2 tomados juntos forman =O, =S, =N(OR), =N(R), =N(NR₂), o =C(R)₂;

R^3 es H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, o alquino;

R^4 es H, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, haloalquilo, -OR⁵, -C(O) R^5 , -CO₂ R^5 , -SO₂ R^5 , -C(O)N(R^5)(R^5), -[C(R)₂]_q- R^5 , -[(W)-N(R)C(O)]_q R^5 , -[(W)-C(O)]_q R^5 , -[(W)-C(O)O]_q R^5 , -[(W)-OC(O)]_q R^5 , -[(W)-SO₂]_q R^5 , -[(W)-N(R^5)SO₂]_q R^5 , -[(W)-C(O)N(R^5)]_q R^5 , -[(W)-O]_q R^5 , -[(W)-N(R)]_q R^5 , -W-NR₃⁺X⁻ o -[(W)-S]_q R^5 ;

en donde cada W es, independientemente, un biradical seleccionando del grupo que consiste de alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, y grupos divalentes heteroaralquilo;

cada q es independientemente para cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, o 6;

X⁻ es un haluro;

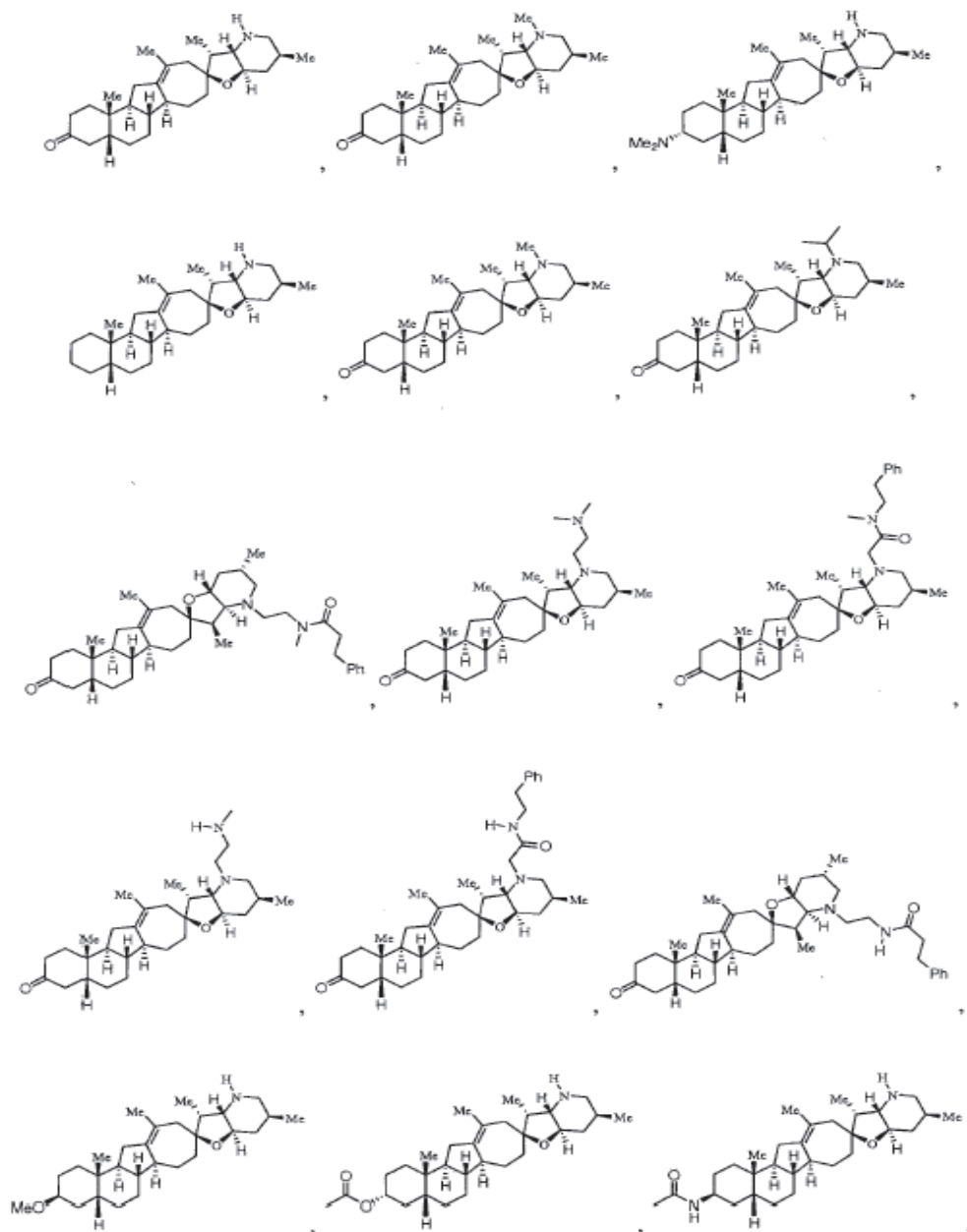
cada R^5 es, independientemente, H, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo o -[C(R)₂]_p- R^6 ; en donde p es 0-6; o cualquiera dos apariciones de R^5 en el mismo sustituyente pueden tomarse juntas para formar a anillo opcionalmente sustituido de 4-8 miembros que contiene 0-3 heteroátomos seleccionados de N, O, S, y P;

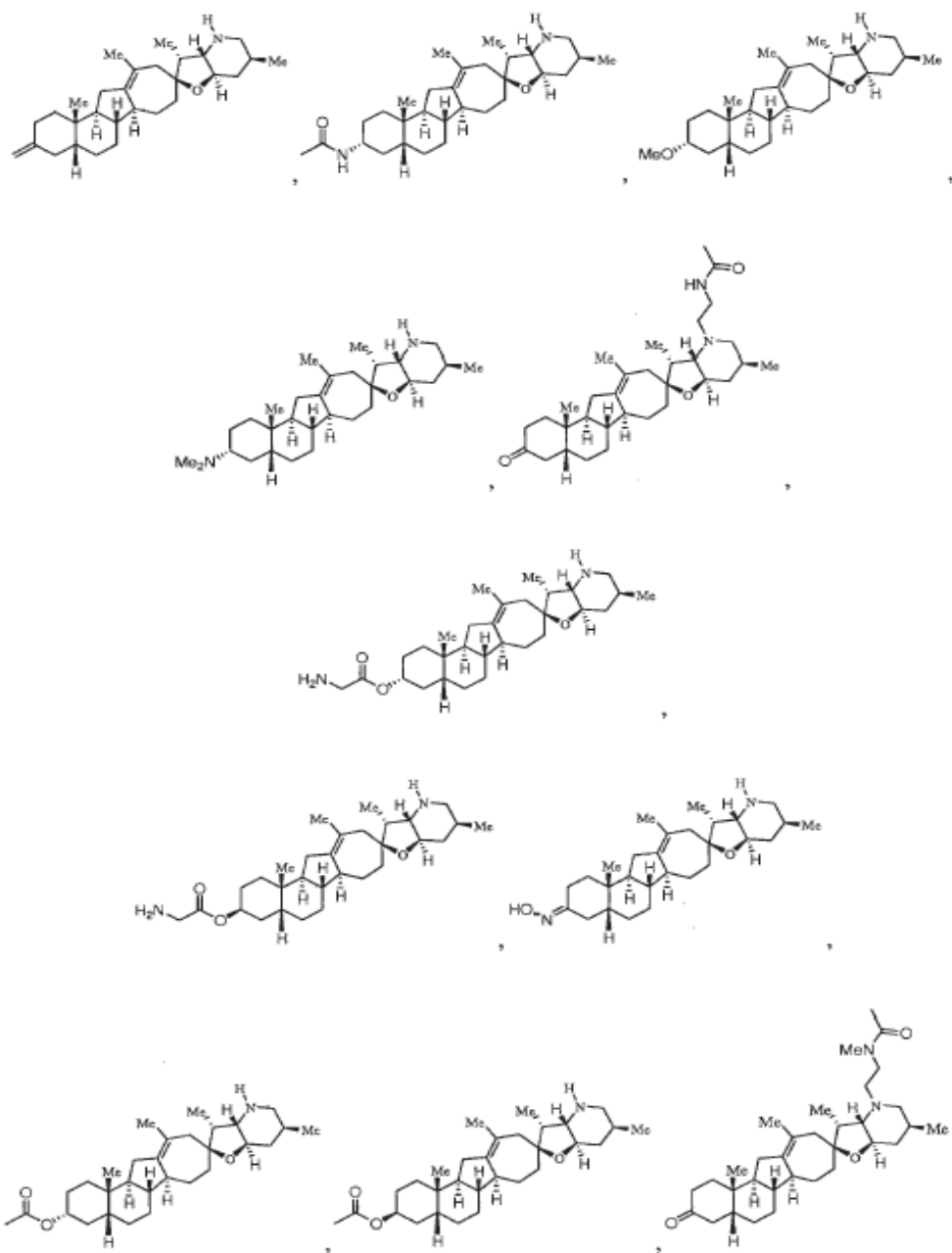
cada R^6 es independientemente hidroxilo, -N(R)COR, -N(R)C(O)OR, -N(R)SO₂(R), -C(O)N(R)₂, -OC(O)N(R)(R), -SO₂N(R)(R), -N(R)(R), -COOR, -C(O)N(OH)(R), -OS(O)₂OR, -S(O)₂OR, -OP(O)(OR)(OR), -NP(O)(OR)(OR), o -P(O)(OR)(OR);

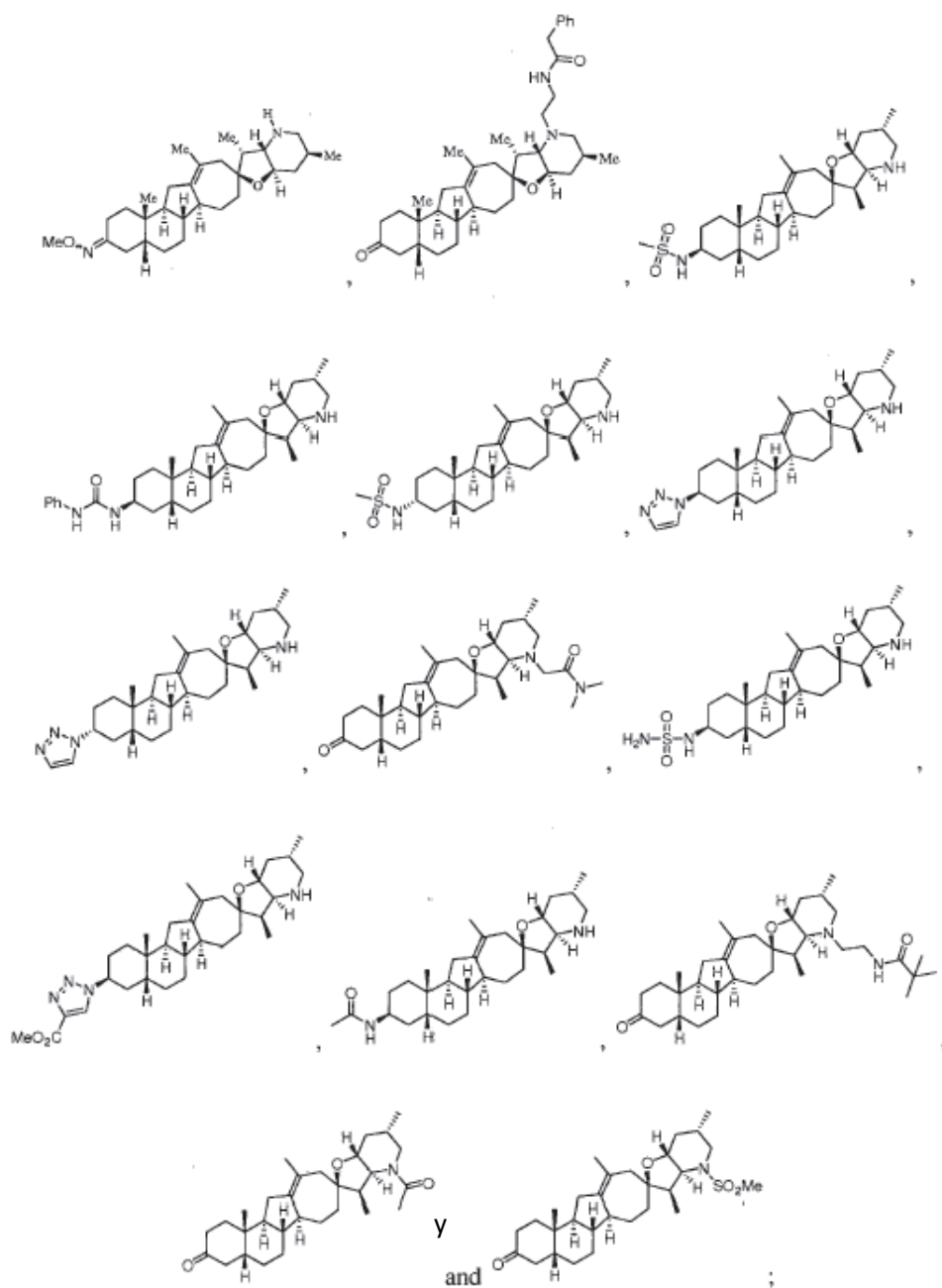
cada R es independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, aralquilo o heteroaralquilo;

siempre y cuando R^2 , R^3 , y R^4 sean H; R^1 no es hidroxilo o un azúcar; además, siempre y cuando R^4 es hidroxilo, entonces R^1 no es una azúcar o hidroxilo; además, siempre y cuando R^4 es hidroxilo, entonces R^1 y R^2 juntos no son C=O.

2. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde R^1 es H, hidroxilo, alcoxilo, ariloxi, o amino o en donde R^1 y R^2 tomados juntos conjuntamente con el carbono al cual están unidos, forman =O, =N(OR), o =S.
3. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde R^3 es H.
4. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde R^4 es H, alquilo, hidroxilo, aralquilo, -[C(R)₂]_q- R^5 , -[(W)-N(R)C(O)]_q R^5 , -[(W)-N(R)SO₂]_q R^5 , -[(W)-C(O)N(R)]_q R^5 , -[(W)-O]_q R^5 , -[(W)-C(O)]_q R^5 , o -[(W)-C(O)O]_q R^5 .
5. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde R^3 es H o alquilo y R^2 es H o alquilo.
6. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde R^1 es sulfonamido.
7. Un compuesto de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste de:

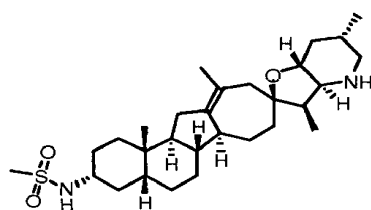






5

8. Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

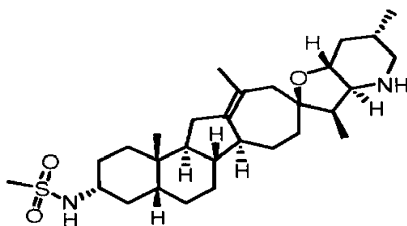


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

9. El compuesto o la sal de la reivindicación 8, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de hidrócloruro.

10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal como el reivindicado en la reivindicación 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el compuesto tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de hidrócloruro.