

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 941**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| A61P 35/00 | (2006.01) | A61K 31/505 | (2006.01) |
| A61K 31/165 | (2006.01) | A61K 31/5375 | (2006.01) |
| A61K 31/18 | (2006.01) | A61K 31/5377 | (2006.01) |
| A61K 31/277 | (2006.01) | A61K 31/541 | (2006.01) |
| A61K 31/40 | (2006.01) | A61K 31/55 | (2006.01) |
| A61K 31/44 | (2006.01) | A61K 31/551 | (2006.01) |
| A61K 31/4433 | (2006.01) | | |
| A61K 31/4453 | (2006.01) | | |
| A61K 31/4545 | (2006.01) | | |
| A61K 31/496 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008 E 08770130 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2162190**

54 Título: **Derivados de bifenilcarboxamida como moduladores de la ruta de hedgehog**

30 Prioridad:

07.06.2007 US 942654 P

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

13.05.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DIERKS, CHRISTINE;
WARMUTH, MARKUS y
WU, XU**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 569 941 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

Derivados de bifenilcarboxamida como moduladores de la ruta de hedgehog

Campo de la invención

- 5 Se describe un método para modular la actividad de la ruta de señalización de hedgehog. En particular, se describe un método para inhibir estados de crecimiento aberrante que resultan de fenotipos de pérdida de función de Ptc, ganancia de función de hedgehog, ganancia de función de smoothened, ganancia de función de Gli o sobreexpresión de ligandos de hedgehog, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula I.

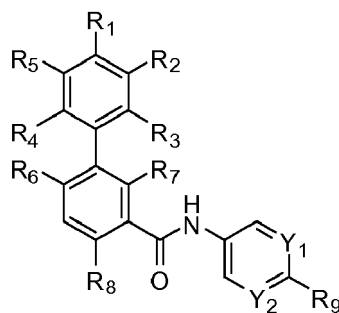
Antecedentes de la invención

- 10 Durante el desarrollo embrionario, la ruta de señalización de hedgehog es esencial para numerosos procesos tales como el control de la proliferación, diferenciación celular y formación de patrones tisulares. Sin embargo, la actividad aberrante de la ruta de señalización de hedgehog, por ejemplo, como resultado de activación potenciada, puede tener consecuencias patológicas. En este sentido, la activación de la ruta de hedgehog en tejidos adultos puede dar como resultado enfermedades tales como psoriasis y tipos específicos de cáncer que incluyen, pero no se limitan a,
- 15 linfoma maligno (LM), mieloma múltiple (MM), cánceres del cerebro, de músculo y de piel, de próstata, meduloblastoma, adenocarcinomas pancreáticos y carcinomas de pulmón de células pequeñas. La activación potenciada de la ruta de señalización de hedgehog contribuye a la patología y/o sintomatología de varias enfermedades. Por consiguiente, moléculas que modulan la actividad de la ruta de señalización de hedgehog son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales enfermedades.

- 20 Sumario de la invención

Se describen en el presente documento métodos para inducir apoptosis de células de linfoma o mieloma. Estos métodos implican poner en contacto las células con un agente que inhibe la ruta de señalización de hedgehog. Algunos de los métodos se dirigen a inducir apoptosis de células tumorales que están presentes en un sujeto. Algunos de los métodos se dirigen a inducir apoptosis de células de linfoma o mieloma que no expresan Gli3.

25 Algunos de los métodos emplean un compuesto de fórmula I para inhibir específicamente la ruta de señalización de hedgehog:



I

en la que

- 30 Y₁ y Y₂ se seleccionan independientemente de N y CR₁₀; en el que R₁₀ se selecciona de hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo y -OXNR_{10a}R_{10b}; en el que R_{10a} y R_{10b} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₆;

R₁ se selecciona de ciano, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo, arilo C₆₋₁₀, dimetilamino, alquil C₁₋₆-sulfanilo y heterocicloalquilo C₃₋₈ opcionalmente sustituido con hasta 2 radicales alquilo C₁₋₆;

- 35 R₂ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno, ciano, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo y dimetilamino;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆ y alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo; u o bien R₁ y R₂ o bien R₁ y R₅ junto con el fenilo al que ambos están unidos forman heteroarilo C₅₋₁₀;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆ y alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo; con la condición de que R₆ y R₇ no sean ambos hidrógeno;

R₈ se selecciona de hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆ y alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo;

- 5 R₉ se selecciona de -S(O)₂R₁₁, -C(O)R₁₁, -OR₁₁, -NR_{12a}R_{12b} y -R₁₁; en los que R₁₁ se selecciona de arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo; R_{12a} y R_{12b} se seleccionan independientemente de alquilo C₁₋₆ y alquilo C₁₋₆ sustituido con hidroxilo;

10 en los que dicho arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo de R₉ pueden estar opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 radicales seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo, aril C₆₋₁₀-alquilo C₀₋₄, heteroaril C₅₋₁₀-alquilo C₀₋₄, cicloalquilo C₃₋₁₂ y heterocicloalquilo C₃₋₈;

15 en los que dicho sustituyente aril-alquilo de R₉ está opcionalmente sustituido con de 1 a 3 radicales seleccionados independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido con halo, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido con halo y metil-piperazinilo; y los derivados de N-óxido, derivados de profármaco, derivados protegidos, isómeros individuales y mezclas de isómeros de los mismos; y las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo hidratos) de tales compuestos. Los compuestos descritos en el presente documento también incluyen todas las variaciones isotópicas adecuadas de tales compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, N-óxidos, profármacos e isómeros de los mismos, y composiciones farmacéuticas. Una variación isotópica de un compuesto descrito en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como
20 una en la que al menos un átomo se sustituye por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos descritos en el presente documento y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen pero no se limitan a isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxígeno tales como ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁸O, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl y ¹²³I. Determinadas variaciones isotópicas de los compuestos
25 descritos en el presente documento y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, por ejemplo, aquellos en los que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ³H o ¹⁴C, son útiles en estudios de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. En ejemplos particulares, pueden usarse los isótopos ³H y ¹⁴C por su facilidad de preparación y detectabilidad. En otros ejemplos, la sustitución con isótopos tales como ²H puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, tales como semivida *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos. Las variaciones isotópicas de los compuestos, y las sales farmacéuticamente aceptables, los solvatos, los N-óxidos, los profármacos y los isómeros de los mismos, y las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se preparan mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.

35 Se da a conocer en el presente documento una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula I o un derivado de N-óxido, isómeros individuales y mezcla de isómeros del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable sal del mismo, en mezcla con uno o más excipientes adecuados.

40 Se describe en el presente documento un método de tratamiento o mejora de psoriasis, linfoma o mieloma en un sujeto en el que la modulación de la actividad de la ruta de hedgehog puede prevenir, inhibir o mejorar la patología y/o sintomatología de psoriasis, linfoma o mieloma, método que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o un derivado de N-óxido, isómeros individuales y mezcla de isómeros del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se describe en el presente documento el uso de un compuesto de fórmula I en la fabricación de un medicamento para tratar psoriasis, linfoma o mieloma en un animal en el que la actividad de la ruta de hedgehog contribuye a la patología y/o sintomatología de la enfermedad.

45 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto en la técnica una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith *et al.* (eds.), Oxford University Press (ed. revisada, 2000); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons (3ª ed., 2002); y A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin y Hine (Eds.), Oxford University Press (4ª ed., 2000). Además, se proporcionan las siguientes definiciones para ayudar al lector en la práctica de la invención.

El término "agente" o "agente de prueba" incluye cualquier sustancia, molécula, elemento, compuesto, entidad, o una

combinación de los mismos. Incluye, pero no se limita a, por ejemplo, proteína, polipéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, y similares. Puede ser un producto natural, un compuesto sintético o un compuesto químico, o una combinación de dos o más sustancias. A menos que se especifique lo contrario, los términos “agente”, “sustancia” y “compuesto” pueden usarse indistintamente.

5 “Cáncer”, tal como se usa en el presente documento, incluye tumores sólidos de mamífero así como tumores malignos hematológicos. “Tumores sólidos de mamífero” incluyen cánceres de la cabeza y de cuello, de pulmón, de mesotelioma, de mediastino, de esófago, de estómago, de páncreas, del sistema hepatobiliar, de intestino delgado, de colon, colorrectal, de recto, de ano, de riñón, de uretra, de vejiga, de próstata, de pene, de testículos, de órganos ginecológicos, de ovarios, de mama, del sistema endocrino, de piel, del sistema nervioso central incluyendo el cerebro; sarcomas de hueso y tejidos blandos; y melanoma de origen cutáneo e intraocular. “Tumores malignos hematológicos” incluyen linfomas y leucemia infantil, enfermedad de Hodgkin, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia aguda y crónica, neoplasia de células plasmáticas y cánceres asociados con SIDA. Además, puede tratarse un cáncer en cualquier estadio de progresión, tales como cánceres primarios, metastásicos y recurrentes. Puede encontrarse información referente a numerosos tipos de cáncer, por ejemplo, de la American Cancer Society, o de, por ejemplo, Wilson *et al.* (1991) Harrison’s Principles of Internal Medicine, 12^a edición, McGraw-Hill, Inc. Se contemplan usos tanto humanos como veterinarios. Los cánceres que son particularmente propensos al tratamiento mediante los compuestos y métodos de la divulgación incluyen pero no se limitan a gliomas, meduloblastomas, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), carcinoma de células basales (BCC), cánceres de pulmón de células pequeñas, cánceres de pulmón de células grandes, tumores del tracto gastrointestinal, rhabdomyosarcomas, sarcomas de tejido blando, tumores pancreáticos, tumores de vejiga y tumores de próstata. Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno(s) hiperproliferativo(s) no maligno(s)” incluye pero no se limita a cánceres, trastornos proliferativos neuronales, enfermedades proliferativas de la médula ósea y leucemias. Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno(s) hiperproliferativo(s) no maligno(s)” incluye pero no se limita a trastornos proliferativos no malignos y no neoplásicos, tales como hiperplasia de músculo liso en vasos sanguíneos, cicatrización cutánea y fibrosis pulmonar.

Tal como se usa en el presente documento, “poner en contacto” tiene su significado normal y se refiere a combinar dos o más moléculas (por ejemplo, un compuesto orgánico de molécula pequeña y un polipéptido) o combinar moléculas y células (por ejemplo, un compuesto y una célula). La puesta en contacto puede producirse *in vitro*, por ejemplo, combinando dos o más agentes o combinando un compuesto y una célula o un lisado celular en un tubo de ensayo u otro recipiente. La puesta en contacto también puede producirse en una célula o *in situ*, por ejemplo, poniendo en contacto dos polipéptidos en una célula mediante coexpresión en la célula de polinucleótidos recombinantes que codifican para los dos polipéptidos, o en un lisado celular.

“Trastorno(s) relacionado(s) con hedgehog” tal como se usa en el presente documento incluyen trastornos asociados con una alteración o carácter aberrante de la ruta de hedgehog, así como trastornos asociados con estados de crecimiento normal pero no deseados relacionados con la activación de la ruta de hedgehog. “Trastorno(s) relacionado(s) con hedgehog” incluyen pero no se limitan a formación de tumores, cáncer, neoplasia, trastornos hiperproliferativos malignos y trastornos hiperproliferativos no malignos. “Trastorno(s) relacionado(s) con hedgehog” también incluyen hiperplasia prostática benigna, psoriasis, degeneración macular húmeda, osteopetrosis y crecimiento de cabello no deseado.

El término “hedgehog” se usa para referirse genéricamente a cualquier miembro de la familia de hedgehog, incluyendo sonic, indian, desert y tiggy winkle. El término puede usarse para indicar la proteína o el gen. El término también se usa para describir secuencias homólogas/ortólogas en diferentes especies animales.

Los términos “ruta de señalización de hedgehog (Hh)” y “señalización de hedgehog (Hh)” se usan indistintamente y se refieren a la cadena de acontecimientos mediada normalmente por diversos miembros de la cascada de señalización tales como hedgehog, patched (Ptch), smoothened (Smo) y Gli. La ruta de hedgehog puede activarse incluso en ausencia de una proteína hedgehog mediante la activación de un componente posterior. Por ejemplo, la sobreexpresión de Smo activará la ruta en ausencia de hedgehog.

Componentes de señalización de Hh o miembros de la ruta de señalización de Hh se refieren a productos génicos que participan en la ruta de señalización de Hh. Un componente de señalización de Hh frecuentemente afecta material o sustancialmente a la transmisión de la señal de Hh en células/tejidos, dando como resultado normalmente cambios en el grado de nivel de expresión génica posterior y/o cambios fenotípicos. Los componentes de señalización de Hh, dependiendo de su función biológica y efectos sobre el resultado final de la activación/expresión génica posterior, pueden dividirse en reguladores positivos y negativos. Un regulador positivo es un componente de señalización de Hh que afecta positivamente a la transmisión de la señal de Hh, es decir, estimula acontecimientos biológicos posteriores cuando está presente Hh. Los ejemplos incluyen hedgehog, Smo y Gli. Un regulador negativo es un componente de señalización de Hh que afecta negativamente a la transmisión de la señal de Hh, es decir, inhibe acontecimientos biológicos posteriores cuando está presente Hh. Los ejemplos incluyen (pero no se limitan a) Ptch y SuFu.

Antagonistas de la señalización de hedgehog, antagonistas de la señalización de Hh o inhibidores de la ruta de señalización de Hh se refieren a agentes que inhiben la bioactividad de un componente de señalización de Hh positivo (tal como hedgehog, Ptc, o Gli) o regulan por disminución la expresión del componente de señalización de Hh. También incluyen agentes que regulan por incremento un regulador negativo de componente de señalización de Hh. Un antagonistas de la señalización de hedgehog pueden referirse a una proteína codificada por cualquiera de los genes en la ruta de hedgehog, incluyendo (pero sin limitarse a) sonic, indian o desert hedgehog, smoothened, ptch-1, ptch-2, gli- 1, gli-2, gli-3, etc.

“Ganancia de función de hedgehog” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Ptc, gen hedgehog o gen smoothened, o a una disminución (o pérdida) en el nivel de expresión de un gen de este tipo, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína hedgehog, por ejemplo, activación aberrante de una ruta de hedgehog. La ganancia de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto génico de Ptc para regular el nivel de expresión de genes Gli, por ejemplo, Gli1, Gli2 y Gli3. El término “ganancia de función de hedgehog” también se usa en el presente documento para referirse a cualquier fenotipo celular similar (por ejemplo, que presenta proliferación en exceso) que se produce debido a una alteración en cualquier lugar en la ruta de transducción de señales de hedgehog, incluyendo, pero sin limitarse a, una modificación o mutación del propio hedgehog. Por ejemplo, una célula tumoral con una tasa de proliferación anómalamente alta debido a la activación de la ruta de señalización de hedgehog tendría un fenotipo de “ganancia de función de hedgehog”, incluso si hedgehog no se muta en esa célula.

“Pérdida de función de patched” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Ptc, o a un nivel disminuido de expresión del gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína hedgehog, por ejemplo, activación aberrante de una ruta de hedgehog. La pérdida de función puede incluir una pérdida de la capacidad del producto génico de Ptc para regular el nivel de expresión de genes Gli, por ejemplo, Gli1, Gli2 y Gli3.

“Ganancia de función de Gli” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Gli, o a un nivel disminuido de expresión del gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína hedgehog, por ejemplo, activación aberrante de una ruta de hedgehog.

El término “inhibir” o “inhibición,” en el contexto de crecimiento tumoral o crecimiento de células tumorales, se refiere a una aparición retrasada de tumores primarios o secundarios, a un desarrollo ralentizado de tumores primarios o secundarios, a una existencia disminuida de tumores primarios o secundarios, a una gravedad ralentizada o disminuida de efectos secundarios de la enfermedad, o a un crecimiento tumoral detenido y una regresión de tumores. El término “prevenir” o “prevención” se refiere a una inhibición completa del desarrollo de tumores primarios o secundarios o a cualquier efecto secundario de la enfermedad. En el contexto de modulación de actividades enzimáticas, inhibición se refiere a supresión reversible o reducción de una actividad enzimática incluyendo inhibición competitiva, incompetitiva y no competitiva. Esto puede distinguirse experimentalmente mediante los efectos del inhibidor sobre la cinética de reacción de la enzima, que puede analizarse en cuanto a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten básica. Se produce inhibición competitiva cuando el inhibidor puede combinarse con la enzima libre de un modo tal que compite con el sustrato normal por la unión al sitio activo. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo de enzima-inhibidor [EI], análogo al complejo de enzima-sustrato.

“Ganancia de función de smoothened” se refiere a una modificación o mutación aberrante de un gen Smo, o a un nivel aumentado de expresión del gen, que da como resultado un fenotipo que se asemeja a la puesta en contacto de una célula con una proteína hedgehog, por ejemplo, activación aberrante de una ruta de hedgehog.

El término “sujeto” incluye mamíferos, especialmente seres humanos. También engloba otros animales no humanos tales como vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos.

El término “tratar” o “tratamiento” se refiere a crecimiento tumoral detenido, y a la regresión parcial o completa de tumores. El término “tratar” incluye la administración de compuestos o agentes para prevenir o retrasar el comienzo de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad (por ejemplo, linfoma y mieloma), aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo el desarrollo adicional de la enfermedad, el estado o el trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de síntomas tras la manifestación de la enfermedad.

La presente invención se refiere al descubrimiento de que las rutas de transducción de señales reguladas por hedgehog, patched (Ptc), gli y/o smoothened pueden modularse mediante los compuestos de fórmula I.

Descripción de realizaciones preferidas

Los métodos terapéuticos descritos en el presente documento emplean un antagonista de la ruta de señalización de hedgehog para inhibir el crecimiento y la proliferación de psoriasis, células de linfoma, células de leucemia o células de mieloma. Estos métodos implican poner en contacto una célula tumoral de este tipo (*in vitro* o *in vivo*) con un inhibidor de la ruta de señalización de Hh, un compuesto de fórmula I.

- 5 El compuesto definido en las reivindicaciones es un compuesto de fórmula I que es N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10 Por tanto, se contempla específicamente que compuestos de fórmula I que interfieren con aspectos de la actividad de transducción de señales de hedgehog, Ptc o *smoothened* asimismo podrán inhibir la proliferación (u otras consecuencias biológicas) en células normales y/o células que tienen un fenotipo de pérdida de función de *patched*, un fenotipo de ganancia de función de hedgehog, un fenotipo de ganancia de función de *smoothened*, un fenotipo de ganancia de función de Gli o una sobreexpresión de fenotipo de ligandos de hedgehog. Por tanto, se contempla que, en determinados casos, estos compuestos pueden ser útiles para inhibir la actividad de hedgehog en células normales, por ejemplo, que no tienen una mutación genética que activa la ruta de hedgehog. En realizaciones de referencia preferidas, los compuestos pueden inhibir al menos algunas de las actividades biológicas de proteínas hedgehog, preferiblemente de manera específica en células diana.

20 Por tanto, los métodos descritos en el presente documento incluyen el uso de compuestos de fórmula I que tienen acción agonista sobre la inhibición de Ptc de la señalización de hedgehog, tal como inhibiendo la activación de *smoothened* o componentes posteriores de la ruta de señalización, en la regulación de la reparación y/o rendimiento funcional de una amplia gama de células, tejidos y órganos, incluyendo células, tejidos y órganos normales, así como los que tienen el fenotipo de pérdida de función de Ptc, ganancia de función de hedgehog, ganancia de función de *smoothened* o ganancia de función de Gli. Por ejemplo, el método sujeto tiene aplicaciones terapéuticas y cosméticas que varían desde regulación de tejidos neuronales, formación y reparación de hueso y cartílago, regulación de la espermatogénesis, regulación del músculo liso, regulación del pulmón, del hígado y de otros órganos que surgen del intestino primitivo, regulación de la función hematopoyética, regulación del crecimiento del cabello y de la piel, etc. Además, los métodos sujeto pueden realizarse en células que se proporcionan en cultivo (*in vitro*), o en células en un animal completo (*in vivo*).

25 En otra realización de referencia preferida, el método sujeto puede ser para tratar células epiteliales que tienen un fenotipo de pérdida de función de Ptc, ganancia de función de hedgehog, ganancia de función de *smoothened* o ganancia de función de Gli. Por ejemplo, el método sujeto puede usarse en el tratamiento o la prevención de carcinoma de células basales u otros trastornos relacionados con la ruta de hedgehog.

30 En determinadas realizaciones de referencia, un compuesto de fórmula I puede inhibir la activación de una ruta de hedgehog mediante la unión a *smoothened* o sus proteínas posteriores. En determinadas realizaciones de referencia, un antagonista sujeto puede inhibir la activación de una ruta de hedgehog mediante la unión a *patched*.

35 En otra realización de referencia, el método sujeto puede usarse como parte de un régimen de tratamiento para meduloblastomas malignos y otros tumores neuroectodérmicos malignos del SNC primarios.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, un modulador de la señalización de hedgehog tal como un compuesto de fórmula I, un agonista de Ptc, un antagonista de *smoothened* o un antagonista proteico de la ruta de hedgehog posterior tal como se describe en el presente documento, formulado en una cantidad suficiente para inhibir, *in vivo*, la proliferación u otras consecuencias biológicas de la pérdida de función de Ptc, ganancia de función de hedgehog, ganancia de función de *smoothened* o ganancia de función de Gli.

45 Los tratamientos sujeto que usan un compuesto de fórmula I, agonistas de *patched*, antagonistas de *smoothened* o antagonistas proteicos de la ruta de hedgehog posterior pueden ser eficaces para sujetos tanto humanos como animales. Los sujetos animales a los que la invención puede aplicarse se extienden a tanto animales domésticos como a ganado, criados o bien como mascotas o bien para fines comerciales. Ejemplos son perros, gatos, reses, caballos, ovejas, cerdos y cabras.

Farmacología y utilidad

50 La presente divulgación pone a disposición métodos y compuestos para inhibir la activación de la ruta de señalización de hedgehog, por ejemplo, para inhibir estados de crecimiento aberrante que resultan de fenotipos tales como pérdida de función de Ptc, ganancia de función de hedgehog, ganancia de función de *smoothened* o ganancia de función de Gli, que comprenden poner en contacto la célula con un compuesto de fórmula I, en una cantidad suficiente para someter a agonismo la actividad de Ptc normal, someter a antagonismo la actividad de hedgehog normal, someter a antagonismo la actividad de *smoothened* o someter a antagonismo la actividad de Gli por

ejemplo, para revertir o controlar el estado de crecimiento aberrante.

Miembros de la familia de Hedgehog de moléculas de señalización median en muchos procesos de formación de patrones de corto y largo alcance importantes durante el desarrollo de vertebrados. La formación de patrones es la actividad mediante la cual células embrionarias forman disposiciones espaciales ordenadas de tejidos diferenciados.

5 La complejidad física de los organismos superiores surge durante la embriogénesis a través de la interacción de linaje intrínseco de células y señalización extrínseca de células. Las interacciones de inducción son esenciales para la formación de patrones embrionarios en el desarrollo de vertebrados a partir del primer establecimiento del plan corporal, para la formación de patrones de los sistemas de órganos, para la generación de diversos tipos de células durante la diferenciación tisular. Los efectos de las interacciones celulares en el desarrollo son variados: las células que responden se desvían desde una ruta de diferenciación celular hasta otra induciendo células que difieren de los estados tanto no inducido como inducido de las células que responden (inducciones). Algunas veces las células inducen a sus vecinas a diferenciarse por sí mismas (inducción homeogénica); en otros casos una célula inhibe la diferenciación de sus vecinas por sí misma. Las interacciones celulares en el desarrollo temprano pueden ser secuenciales, de manera que una inducción inicial entre dos tipos de células conduce a una amplificación progresiva de la diversidad. Además, se producen interacciones de inducción no sólo en embriones, sino en células adultas también, y pueden actuar para establecer y mantener patrones morfogénicos así como inducir diferenciación.

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

Una ruta de señalización de hedgehog inactiva es cuando el receptor de proteína transmembrana Patched (Ptc) inhibe la actividad de Smoothened (Smo), una proteína que atraviesa siete veces la membrana. Se impide que el factor de transcripción Gli, un componente posterior de la señalización de Hh, entre en el núcleo a través de interacciones con proteínas citoplasmáticas, incluyendo Fused y Suppressor of fused (Sufu). Como consecuencia, se reprime la activación transcripcional de genes diana de Hedgehog. La activación de la ruta se inhibe a través de la unión de cualquiera de los tres ligandos de mamífero (Dhh, Shh o Ihh) a Ptc. La unión del ligando da como resultado una reversión de la represión de Smo, activando de ese modo una cascada que conduce a la translocación de la forma activa del factor de transcripción Gli al núcleo. Gli nuclear activa la expresión de genes diana, incluyendo los propios Ptc y Gli.

Niveles aumentados de señalización de Hedgehog son suficientes para iniciar la formación de cáncer y se requieren para la supervivencia tumoral. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata ("Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis", Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA., *Nature*. 7 de octubre de 2004; 431(7009):707-12;

40 "Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GL11 signaling", Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A., *Proc Natl Acad Sci USA*. 24 de agosto de 2004; 101(34):12561-6), ("Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells," Mimeault M, Moore E, Moniaux N, *et al* (2006), *International Journal of Cancer*; 118 (4):1022-31) cáncer de mama ("Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer", Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M., *Cancer Res*. 1 de septiembre de 2004; 64(17):6071-4), ("Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells," Liu S, Dontu G, Mantle ID, *et al* (2006) *Cancer Res*; 66 (12):6063-71), ("Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia," Moraes RC, Zhang XM, Harrington N, *et al* (2007), *Development*; 134 (6):1231-42), meduloblastoma ("Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade", Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA., *Science*. 30 de agosto de 2002; 297(5586):1559-61), cáncer de piel distinto de melanoma, es decir carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células basales (BCC) ("Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions", Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, Xu Y, Chai L, Wichterle H, Kon C, Gatchalian C, Porter JA, Rubin LL, Wang FY., *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 de abril de 2003; 100(8):4616-21; "Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma", Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ., *Nature*. 1 de enero de 1998; 391(6662):90-2), cánceres pancreático, de esófago, de estómago y biliar ("Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis", Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon

M, Warshaw AL, Hebrok M., *Nature*. 23 de octubre de 2003; 425(6960):851-6; "Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours", Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA., *Nature*. 23 de octubre de 2003; 425(6960):846-51, ("Nuclear factor-kappa B contributes to hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer," Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, *et al* (2006), *Cancer Research*; 66 (14):7041-9), ("Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: A new paradigm for combination therapy in solid cancers," Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, *et al* (2007) *Cancer Research*; 67 (5):2187-96), ("Oncogenic KRAS suppresses Gli1 degradation and activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells," Ji Z, Mei FC, Xie J, *et al* (2007), *J Biol Chem*; 282 (19):14048-55), y cáncer de pulmón de células pequeñas ("Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer", Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Bailin SB., *Nature*. 20 de marzo de 2003; 422(6929):313-7), ("Hedgehog signaling in small-cell lung cancer: Frequent *in vivo* but a rare event *in vitro*," Vestergaard J, Pedersen MW, Pedersen N, *et al* (2006), *Lung Cancer*; 52 (3):281-90).

Los cánceres adicionales en los que niveles aumentados de señalización de Hedgehog son suficientes para iniciar la formación de cáncer y se requieren para la supervivencia tumoral incluyen, pero no se limitan a cáncer de colon ("Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer," Douard R, Moutereau S, Pernet P, *et al* (2006) *Surgery*; 139 (5):665-70), ("Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: Induction of apoptosis with cyclopamine treatment," Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, *et al* (2004), *International Journal of Cancer*; 110 (6):831-7), glioma, ("Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma," Bar EE, Chaudhry A, Lin A, *et al*, *Neuro-Oncology*; 2007, 9 (4):594), ("HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity," Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, *et al*, (2007) *Current Biology* 17 (2):165-72), ("Ligand-dependent activation of the hedgehog pathway in glioma progenitor cells," Ehteshan M, Sarangi A, Valadez JG, *et al* (2007) *Oncogene*; 2 de marzo de 2007, publicación electrónica antes de la impresión), melanoma ("Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways," Stecca B, Mas C, Clement V, *et al* (2007), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104 (14):5895-900), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) ("Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma," Yuan Z, Goetz JA, Singh S, *et al* (2007), *Oncogene*; 26 (7):1046-55), de ovarios, ("Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: Its inhibition leads to growth suppression and apoptosis," Chen XJ, Horiuchi A, Kikuchi N, *et al*, *Cancer Science*; (2007) 98 (1):68-76), de hígado ("Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas," Huang SH, He J, Zhang XL, *et al* (2006), *Carcinogenesis*; 27 (7):1334-40), ("Dysregulation of the hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis," Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, *et al* (2006), *Carcinogenesis*; 27 (4):748-57), renal ("Clear cell sarcoma of the kidney: Up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways," Cutcliffe C, Kersey D, Huang CC, *et al* (2005), *Clinical Cancer Research*; 11 (22):7986-94), rhabdomyosarcoma, ("Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome," Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, *et al* (1998), *Nature Medicine*; 4 (5):619-22), ("Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development," Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, *et al* (2006), *Journal of Pathology*; 208 (1):17-25), y condrosarcoma ("Constitutive hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation," Tiet TD, Hopyan S, Nadesan P, *et al* (2006), *American Journal of Pathology*; 168 (1):321-30).

Se ha mostrado que los inhibidores de la ruta de Hedgehog (por ejemplo ciclopamina) son útiles en el tratamiento de psoriasis ("Cyclopamine: inhibiting hedgehog in the treatment of psoriasis" *Cutis*, 2006, 78(3):185-8; Br. J. Dermatology, abril de 2006; 154(4):619-23, "Psoriatic skin expresses the transcription factor Gli1: possible contribution of decreased neurofibromin expression", Endo H, Momota Y, Oikawa A, Shinkai H.).

Linfoma maligno (ML) implica las células del sistema linfático, y es el quinto cáncer más común en los EE.UU. ML incluye enfermedad de Hodgkin y enfermedades no Hodgkin que son un grupo heterogéneo de enfermedades proliferativas linfoides. La enfermedad de Hodgkin representa aproximadamente el 14% de todos los linfomas malignos. Los linfomas no Hodgkin son un grupo diverso de tumores malignos que son predominantemente de origen de células B. En el esquema de clasificación Working Formulation, estos linfomas se han dividido en categorías de grado bajo, intermedio y alto en virtud de sus historias naturales (véase "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project," *Cancer* 49:2112-2135, 1982). Los linfomas de grado bajo son indolentes, con una mediana de supervivencia de 5 a 10 años (Horning y Rosenberg, *N. Engl. J. Med.* 311:1471-1475, 1984). Aunque la quimioterapia puede inducir remisiones en la mayoría de los linfomas indolentes, las curas son raras y la mayoría de los pacientes experimentan recidiva finalmente, requiriendo terapia adicional. Los linfomas de grado intermedio y alto son tumores más agresivos, pero tienen una mayor probabilidad de cura con quimioterapia. Sin embargo, una proporción significativa de estos pacientes experimentarán recidiva y requerirán tratamiento adicional.

El mieloma múltiple (MM) es un tumor maligno compuesto por células plasmáticas del tipo encontrado normalmente en la médula ósea. Estas células plasmáticas malignas se acumulan en la médula ósea y normalmente producen moléculas de IgG o IgA monoclonales. Las células plasmáticas malignas se dirigen a y se expanden en la médula

ósea provocando anemia e inmunosupresión debido a la pérdida de la hematopoyesis normal. Los individuos que padecen mieloma múltiple a menudo experimentan anemia, lesiones osteolíticas, insuficiencia renal, hipercalcemia, e infecciones bacterianas recurrentes. MM representa el segundo tumor maligno hematopoyético más común.

5 La presente invención se refiere en parte a los descubrimientos por los presentes inventores de que las enfermedades linfoma y mieloma múltiple dependen de la ruta de señalización de hedgehog (Hh) usando células de linfoma y plasmocitoma aisladas de ratones Eμ-Myc transgénicos y ratones deficientes en Cdkn2a, y el descubrimiento de que los ligandos de hedgehog median en la interacción entre el estroma y las células de linfoma. Se encontró lo mismo para muestras de linfoma y mieloma múltiple aisladas de muestras de pacientes de hueso (mieloma múltiple) o de ganglios linfáticos, médula ósea o bazo de pacientes con linfoma no Hodgkin (NHL) y también para muestras de leucemia linfocítica crónica (CLL). Además, se encontró que la inhibición de la ruta de señalización de Hh induce apoptosis de células de linfoma dependientes del estroma, y que la sobreexpresión de miembros de la ruta de hedgehog inhibe la apoptosis inducida por ciclopamina de células de linfoma *in vitro*. Además, los inventores encontraron que el tratamiento de ratones con inhibidores de la ruta de hedgehog suprime la expansión del linfoma *in vivo*. Finalmente, los inventores descubrieron que no hay expresión de Gli3 en células B de bazo y en la mayoría de los linfomas sensibles a ciclopamina, sino una expresión predominante en todos los linfomas resistentes a ciclopamina.

Estos datos indican que la señalización de Hh proporciona una señal antiapoptótica importante para las etapas iniciales de transformación por c-Myc y desempeña un papel importante para el mantenimiento del linfoma. Por tanto, la alteración de la ruta de señalización de Hh proporciona un medio novedoso para tratar linfomas (por ejemplo, NHL), mielomas múltiples, CLL y otros tumores malignos hematopoyéticos. Además, la expresión de Gli3 en linfomas proporciona un factor de predicción negativo para la receptividad a la inhibición de Hh y un medio importante para la estratificación de pacientes.

Según estos descubrimientos, la divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales, por ejemplo, células de linfoma y mieloma. La invención proporciona un compuesto tal como se describe en las reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en métodos para tratar linfoma o mieloma en un sujeto inhibiendo el crecimiento de células tumorales. Los métodos también son útiles para prevenir la tumorigénesis en un sujeto. Algunos de los métodos se refieren a tratar linfomas que no tienen una expresión significativa de Gli3 en relación con células B de bazo. Los métodos implican la administración al sujeto que necesita el tratamiento de una composición farmacéutica que contiene un agente de antagonización de la señalización de Hh (es decir N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida). Los compuestos de la divulgación regulan por disminución el nivel celular o inhiben la actividad biológica de un miembro de la ruta de señalización de Hh.

Esta invención proporciona un compuesto tal como se describe en las reivindicaciones para su uso en métodos de tratamiento profiláctico o terapéutico de cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático, incluyendo linfomas, leucemia y mielomas. Los métodos emplean un antagonista de la ruta de señalización de hedgehog para inhibir el crecimiento y la proliferación de células de linfoma, células de leucemia o células de mieloma. El linfoma es un tumor maligno de linfoblastos derivados de linfocitos B. El mieloma es un tumor maligno compuesto por células plasmáticas del tipo normalmente encontrado en la médula ósea. La leucemia es una enfermedad aguda o crónica que implica los órganos que forman la sangre. Los NHL se caracterizan por un aumento anómalo en el número de leucocitos en los tejidos del cuerpo con o sin un aumento correspondiente en la sangre circulante y se clasifican según el tipo de leucocito implicado de la manera más relevante.

A modo de ejemplo, pueden tratarse sujetos que padecen o corren el riesgo de desarrollo de linfoma (por ejemplo, linfoma de células B, plasmoblastoma, plasmocitoma o CLL) con el compuesto descrito en las reivindicaciones. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Los métodos conllevan la administración al sujeto de una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz del compuesto descrito en las reivindicaciones para inhibir la ruta de señalización de hedgehog. El sujeto puede ser uno al que se le diagnostica con linfoma, con o sin metástasis, en cualquier estadio de la enfermedad (por ejemplo, estadio I a IV, sistema de estadificación de Ann Arbor). Los linfomas adecuados para su tratamiento según la invención incluyen pero no se limitan a enfermedad de Hodgkin y a enfermedad no Hodgkin. La enfermedad de Hodgkin es un trastorno maligno humano del tejido linfático (linfoma) que parece que se origina en un ganglio linfático particular y después se propaga al bazo, al hígado y a la médula ósea. Se produce principalmente en individuos entre las edades de 15 y 35. Se caracteriza por hipertrofia progresiva, indolora de los ganglios linfáticos, del bazo y del tejido linfático general. La enfermedad de Hodgkin clásica se divide en cuatro subtipos: (1) enfermedad de Hodgkin de esclerosis nodular (NSHD); (2) enfermedad de Hodgkin de celularidad mixta (MCHD); (3) enfermedad de Hodgkin de agotamiento de linfocitos (LDHD); y (4) enfermedad de Hodgkin clásica rica en linfocitos (cLRHD).

En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un compuesto descrito en las reivindicaciones para su uso en métodos de tratamiento de linfoma no Hodgkin (NHL). La enfermedad no Hodgkin se denomina también linfosarcoma y se refiere a un grupo de linfomas que difieren en modos importantes de la enfermedad de Hodgkin y se clasifican según el aspecto microscópico de las células cancerosas. El linfoma no

Hodgkin incluye pero no se limita a (1) linfomas de crecimiento lento y leucemia linfoide (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica pequeña, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma de centro folicular, de células escindidas pequeñas folicular, de células mixtas folicular, linfoma de células B de zona marginal, leucemia de células pilosas, plasmocitoma, mieloma, leucemia de linfocitos granulares grandes, micosis fungoide, síndrome de Szary); (2) leucemia linfoide y linfomas moderadamente agresivos (por ejemplo, leucemia prolinfocítica, linfoma de células del manto, linfoma de centro folicular, de células escindidas pequeñas folicular, leucemia linfocítica crónica/leucemia prolinfocítica, linfoma angiocéntrico, linfoma angioinmunoblástico); (3) linfomas agresivos (por ejemplo, linfoma de células B grandes, linfomas de célula T periféricos, linfoma de células T intestinal, linfoma de células grandes anaplásico); y (4) leucemia linfoide y linfomas altamente agresivos (por ejemplo, leucemia/linfoma linfoblástico B de precursores de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de grado alto, leucemia/linfoma linfoblástico T de precursores de células T de Burkitt). Estos métodos pueden usarse para formas de adultos o infantiles de linfoma, así como linfomas en cualquier estadio, por ejemplo, estadio I, II, III o IV. Los métodos descritos en el presente documento también pueden emplearse para tratar otras formas de leucemia, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda (ALL).

Algunos de estos métodos terapéuticos se refieren particularmente al tratamiento de linfomas o mielomas que no expresan Gli3. Tal como se da a conocer en los ejemplos a continuación, se observó que, mientras que Gli1 y Gli2 se expresaban en todos los linfomas, estaba presente expresión de Gli3 detectable principalmente en linfomas que eran resistentes a la inhibición de la ruta de Hh por ciclopamina. No hay expresión de Gli3 en células B de bazo normales y en la mayoría de los linfomas sensibles a ciclopamina. Por tanto, antes del tratamiento con antagonistas de Hh, pueden examinarse en primer lugar sujetos con linfomas para detectar la expresión de Gli3 en una muestra de células de linfoma obtenida del sujeto. El nivel de expresión de Gli3 en la muestra puede compararse con el nivel de expresión de Gli3 en células B de bazo normales obtenidas del sujeto. Los niveles de expresión de Gli3 en las muestras de linfoma o mieloma y las células de control pueden determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos a continuación. Se indica una receptividad probable al tratamiento con antagonistas de Hh descritos en el presente documento por la falta de expresión de Gli3 detectable en las muestras de linfoma o mieloma o un nivel de expresión que no es significativamente más alto (por ejemplo, no más alto del 25%, el 50% o el 100%) que el nivel de expresión de Gli3 en la célula B normal. Además de ser una etapa adicional de estos métodos terapéuticos, el examen previo para determinar la falta de expresión de Gli3 puede usarse independientemente como método para la estratificación de pacientes.

Además de linfomas, se proporciona también un compuesto tal como se describe en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de mielomas. El mieloma múltiple es una neoplasia mortal caracterizada por una acumulación de un clon de células plasmáticas, acompañada frecuentemente por la secreción de cadenas de Ig. La invasión de la médula ósea por el tumor está asociada con anemia, hipogammaglobinemia y granulocitopenia con infecciones bacteriana concomitantes. Un entorno de citocinas anómalo, principalmente niveles de IL-6 e IL-1 β elevados, a menudo da como resultado osteoclasia aumentada conduciendo a dolor de huesos, fracturas e hipercalcemia. A pesar de la quimioterapia agresiva y el trasplante, el mieloma múltiple es un trastorno proliferativo plasmático mortal de manera universal.

Los compuestos de la divulgación son útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con hedgehog tales como síndrome de nevus de células basales (también denominado síndrome de Gorlin y/o carcinoma de células basales nevoide), un síndrome genético de cáncer dominante autosómico poco común.

Los compuestos de la divulgación son útiles en el tratamiento de carcinoma de células basales (BCC o úlcera de roedor), tumores de las glándulas suprarrenales que surgen de la corteza o de la parte de médula de la médula de las glándulas suprarrenales, y tumores de ovarios.

Los compuestos de la divulgación son útiles en el tratamiento de trastornos de sobrecrecimiento de huesos incluyendo, pero sin limitarse a, acromegalia, macrocefalia, síndrome de Soto, displasia diafisaria progresiva (PDD o enfermedad de Camurati-Engelmann), displasia craneodiafisaria y trastornos de hiperostosis endosteal incluyendo enfermedad de Van Buchem (tipos I y II) y esclerosteosis.

Los compuestos de la divulgación son útiles en el tratamiento de crecimiento de cabello no deseado, por ejemplo, lunares peludos y prevención cosmética del recrecimiento del cabello tras la depilación. Los compuestos de la divulgación son útiles en el tratamiento de fibrosis hepática.

Por tanto, los métodos de la presente divulgación incluyen el uso de compuestos de la divulgación que someten a agonismo la inhibición por Ptc de la señalización de Hedgehog, tal como inhibiendo la activación de smoothed o de componentes posteriores de la ruta de señalización, en la regulación de la reparación y/o rendimiento funcional de una amplia gama de células, tejidos y órganos, incluyendo células, tejidos y órganos normales, así como los que tienen el fenotipo de pérdida de función de Ptc, ganancia de función de hedgehog, ganancia de función de smoothed o ganancia de función de Gli. Por ejemplo, el método sujeto tiene aplicaciones terapéuticas y cosméticas que van desde la regulación de tejidos neuronales, formación y reparación de hueso y cartílago, regulación de la espermatogénesis, regulación de hiperplasia prostática benigna, regulación de la formación de

vasos sanguíneos en degeneración macular húmeda, psoriasis, regulación del músculo liso, regulación del pulmón, del hígado y de otros órganos que surgen del intestino primitivo, regulación de la función hematopoyética, regulación del crecimiento de la piel y del cabello, etc. Además, los métodos sujeto pueden realizarse en células que se proporcionan en cultivo (*in vitro*), o en células en un animal completo (*in vivo*).

5 Según lo anterior, la presente invención proporciona además N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en un método para prevenir o tratar cualquiera de los cánceres descritos en las reivindicaciones. El método comprende administrar a dicho sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz (véase, "Administración y composiciones farmacéuticas", a continuación) de una N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Para cualquiera de los usos anteriores, la dosificación requerida variará dependiendo del modo de administración, del estado particular que va a tratarse y del efecto deseado.

15 La presente invención también proporciona el uso de N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de los cánceres descritos en las reivindicaciones.

Administración y composiciones farmacéuticas:

En general, se administrará N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en cantidades terapéuticamente eficaces por medio de cualquiera de los modos habituales y aceptables conocidos en la técnica, o bien individualmente o bien en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado y otros factores. En general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios de manera sistémica a dosificaciones diarias de desde aproximadamente 0,03 hasta 2,5 mg/kg por peso corporal. Una dosificación diaria indicada en mamíferos grandes, por ejemplo seres humanos, está en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 100 mg, administrada convenientemente, por ejemplo en dosis divididas hasta cuatro veces al día o en forma retardada. Las formas de dosificación unitaria adecuadas para administración oral comprenden desde aproximadamente 1 hasta 50 mg de principio activo.

Puede administrarse N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como composiciones farmacéuticas por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo, por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, o por vía parenteral, por ejemplo, en forma de disoluciones o suspensiones inyectables, por vía tópica, por ejemplo, en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en una forma nasal o de supositorio. Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas que comprenden N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable de una manera convencional mediante métodos de mezclado, granulación o recubrimiento. Por ejemplo, las composiciones orales pueden ser comprimidos o cápsulas de gelatina que comprenden el principio activo junto con a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina; b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol; para comprimidos también c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona; si se desea d) disgregantes, por ejemplo, almidones, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; y/o e) absorbentes, colorantes, aromas y edulcorantes. Las composiciones inyectables pueden ser disoluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y pueden prepararse supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias valiosas terapéuticamente. Las formulaciones adecuadas para aplicaciones transdérmicas incluyen una cantidad eficaz de N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un portador. Un portador puede incluir disolventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, dispositivos transdérmicos están en forma de un vendaje que comprende un elemento de soporte, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con portadores, opcionalmente una barrera de control de la velocidad para administrar el compuesto a la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, y medios para sujetar el dispositivo a la piel. También pueden usarse formulaciones transdérmicas de matriz. Formulaciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y los ojos, son preferiblemente disoluciones acuosas, pomadas, cremas o geles bien conocidos en la técnica. Tales preparaciones pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

Puede administrarse N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en cantidades terapéuticamente eficaces en combinación con

otras terapias, tales como terapia de radiación, trasplante de médula ósea o terapia hormonal.

Puede administrarse N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en cantidades terapéuticamente eficaces en combinación con uno o más agentes terapéuticos (combinaciones farmacéuticas). Por ejemplo, pueden producirse efectos sinérgicos con sustancias inmunomoduladoras, antiinflamatorias, otros agentes terapéuticos antitumorales, agentes quimioterápicos, ablación u otras hormonas terapéuticas, agentes antineoplásicos y/o anticuerpos monoclonales útiles contra linfomas o mielomas. Algunos de los fármacos anticancerígenos bien conocidos se describen en la técnica, por ejemplo, *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents*, Teicher (Ed.), Humana Press (1ª ed., 1997); y *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman *et al.* (Eds.), McGraw-Hill Professional (10ª ed., 2001). Los ejemplos de fármacos anticancerígenos adecuados incluyen 5-fluorouracilo, sulfato de vinblastina, fosfato de estramustina, suramina y estroncio-89. Los ejemplos de agentes quimioterápicos adecuados incluyen asparaginasa, sulfato de bleomicina, cisplatino, citarabina, fosfato de fludarabina, mitomicina y estreptozocina.

Cuando se administra la N-(6-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, conjuntamente con otras terapias, las dosificaciones de los compuestos administrados conjuntamente variarán, por supuesto, dependiendo del tipo de cofármaco empleado, del fármaco específico empleado, del estado que está tratándose y así sucesivamente.

También se describe una combinación farmacéutica, por ejemplo un kit, que comprende a) un primer agente que es un compuesto de la divulgación tal como se da a conocer en el presente documento, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y b) al menos un coagente. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

Los términos "coadministración" o "administración combinada" o similares tal como se utilizan en el presente documento pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un único paciente, y se pretende que incluyan regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

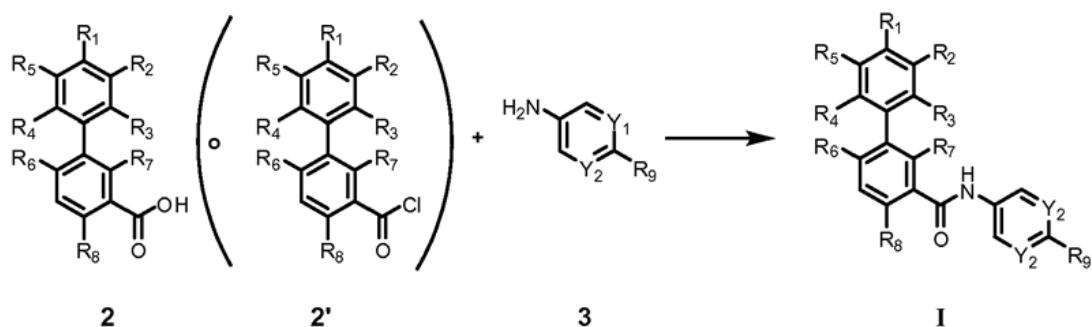
El término "combinación farmacéutica" tal como se usa en el presente documento significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un principio activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los principios activos. El término "combinación fija" significa que los principios activos, por ejemplo un compuesto de fórmula I y un coagente, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosificación. El término "combinación no fijada" significa que los principios activos, por ejemplo un compuesto de fórmula I y un coagente, se administran ambos a un paciente como entidades separadas o bien simultánea, concurrente o bien secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en el que tal administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los 2 compuestos en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a terapia de cóctel, por ejemplo la administración de 3 o más principios activos.

Procedimientos para preparar compuestos descritos en el presente documento

Se describen procedimientos para la preparación de compuestos de la divulgación. En las reacciones descritas, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxilo, cuando estos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales según la práctica convencional, por ejemplo, véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 1991.

Pueden prepararse compuestos de fórmula I procediendo como en el siguiente esquema de reacción I:

Esquema de reacción I:



en el que Y_1 , Y_2 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 y R_9 son tal como se definieron para la fórmula I en el Sumario de la invención. Puede prepararse un compuesto de fórmula I haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 2 (o 2') con un compuesto de fórmula 3 en presencia de un disolvente adecuado (por ejemplo, diclorometano, *N,N*-dimetilformida o similar), en un intervalo de temperatura de aproximadamente -20 a aproximadamente 100°C . La reacción puede tardar hasta aproximadamente 20 horas en completarse.

Pueden encontrarse ejemplos detallados de la síntesis de compuestos de fórmula I en los ejemplos, más adelante.

Procedimientos adicionales para preparar compuestos descritos en el presente documento.

Puede prepararse un compuesto de la divulgación como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, puede prepararse una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la divulgación haciendo reaccionar la forma de ácido libre del compuesto con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable.

Alternativamente, pueden prepararse las formas de sal de los compuestos descritos en el presente documento usando sales de los materiales de partida o productos intermedios.

Las formas de ácido libre o base libre de los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de la forma de sal de adición de base o sal de adición de ácido correspondiente, respectivamente. Por ejemplo un compuesto descrito en el presente documento en una forma de sal de adición de ácido puede convertirse en la base libre correspondiente mediante tratamiento con una base adecuada (por ejemplo, disolución de hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, y similares). Un compuesto descrito en el presente documento en una forma de sal de adición de base puede convertirse en el ácido libre correspondiente mediante tratamiento con un ácido adecuado (por ejemplo, ácido clorhídrico, etc.).

Pueden prepararse compuestos descritos en el presente documento en forma no oxidada a partir de *N*-óxidos de compuestos descritos en el presente documento mediante tratamiento con un agente reductor (por ejemplo, azufre, dióxido de azufre, trifetilfosfina, borohidruro de litio, borohidruro de sodio, tricloruro, tribromuro de fósforo, o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (por ejemplo acetonitrilo, etanol, dioxano acuoso, o similares) a de 0 a 80°C .

Pueden prepararse derivados de profármacos de los compuestos descritos en el presente documento mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica (por ejemplo, para detalles adicionales véase Saulnier *et al.*, (1994), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 4, p. 1985). Por ejemplo, pueden prepararse profármacos apropiados haciendo reaccionar un compuesto no derivatizado de la divulgación con un agente de carbamitación adecuado (por ejemplo, carbanocloridato de 1,1-aciloxialquilo, carbonato de para-nitrofenilo, o similares).

Pueden prepararse derivados protegidos de los compuestos descritos en el presente documento por medios conocidos para los expertos habituales en la técnica. Puede encontrarse una descripción detallada de técnicas aplicables a la creación de grupos protectores y su eliminación en T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry", 3ª edición, John Wiley and Sons, Inc., 1999.

Pueden prepararse convenientemente compuestos descritos en el presente documento, o formarse durante el procedimiento de la divulgación, como solvatos (por ejemplo, hidratos). Pueden prepararse convenientemente hidratos de los compuestos descritos en el presente documento mediante recristalización en una mezcla de

disolventes acuosos/orgánicos, usando disolventes orgánicos tales como dioxina, tetrahidrofurano o metanol.

5 Pueden prepararse compuestos descritos en el presente documento como sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar una pareja de compuestos diastereoisoméricos, separando los diastereómeros y recuperando los enantiómeros ópticamente puros. Aunque la resolución de los enantiómeros puede llevarse a cabo usando derivados diastereoméricos covalentes de los compuestos descritos en el presente documento, se prefieren complejos disociables (por ejemplo, sales diastereoméricas cristalinas). Los diastereómeros tienen distintas propiedades físicas (por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.) y pueden separarse fácilmente aprovechando esas diferencias. Los diastereómeros pueden separarse mediante 10 cromatografía, o preferiblemente, mediante técnicas de separación/resolución basadas en diferencias en la solubilidad. El enantiómero ópticamente puro se recupera entonces, junto con el agente de resolución, mediante cualquier medio práctico que no dé como resultado racemización. Puede encontrarse una descripción más detallada de las técnicas aplicables a la resolución de estereoisómeros de compuestos a partir de su mezcla racémica en Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 15 1981.

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

- (a) los del esquema de reacción I; y
- (b) opcionalmente convertir un compuesto descrito en el presente documento en una sal farmacéuticamente aceptable;
- 20 (c) opcionalmente convertir una forma de sal de un compuesto descrito en el presente documento en una forma distinta de sal;
- (d) opcionalmente convertir una forma no oxidada de un compuesto descrito en el presente documento en un N-óxido farmacéuticamente aceptable;
- 25 (e) opcionalmente convertir una forma de N-óxido de un compuesto descrito en el presente documento en su forma no oxidada;
- (f) opcionalmente resolver un isómero individual de un compuesto descrito en el presente documento de una mezcla de isómeros;
- (g) opcionalmente convertir un compuesto no derivatizado descrito en el presente documento en un derivado de profármaco farmacéuticamente aceptable; y
- 30 (h) opcionalmente convertir un derivado de profármaco de un compuesto descrito en el presente documento en su forma no derivatizada.

Hasta donde la producción de los materiales de partida no se describa particularmente, los compuestos se conocen o pueden prepararse de manera análoga a los métodos conocidos en la técnica o tal como se da a conocer en los ejemplos a continuación en el presente documento.

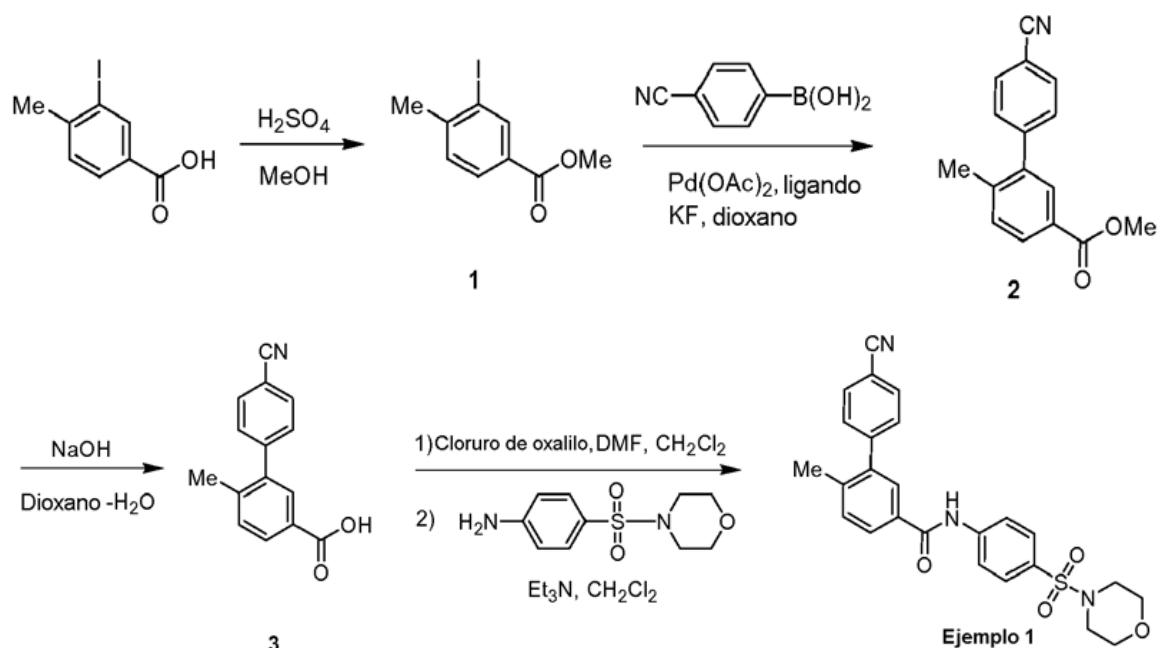
35 Un experto en la técnica apreciará que las transformaciones anteriores son sólo representativas de métodos para la preparación de los compuestos de la presente divulgación, y que pueden usarse de manera similar otros métodos bien conocidos.

Ejemplos

40 La presente divulgación se ejemplifica adicionalmente, pero sin limitarse, mediante el siguiente ejemplo que ilustra la preparación de compuestos de fórmula I según la divulgación.

Ejemplo de referencia 1

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



Etapa 1: A una disolución de ácido 3-yodo-4-metil-benzoico (10,0 g, 38,2 mmol) en metanol (70 ml) se le añade ácido sulfúrico concentrado (0,5 ml). Se calienta la mezcla de reacción a 70°C durante 48 horas, se enfría hasta temperatura ambiente y luego se concentra. Después de eso, se añaden acetato de etilo (100 ml) y disolución acuosa de NaHCO₃ (saturada, 100 ml) al residuo. Se separa la fase orgánica y se lava de nuevo con disolución acuosa de NaHCO₃ (saturada, 100 ml). Se separa la fase orgánica, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentra para producir el éster metílico del ácido 3-yodo-4-metil-benzoico 1. Se usa sin purificación adicional en la siguiente etapa. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,31 (s, 1 H), 7,87 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 7,48 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 3,85 (s, 3 H), 3,35 (s, 3H); CL-EM m/z: 277,0 (M+1).

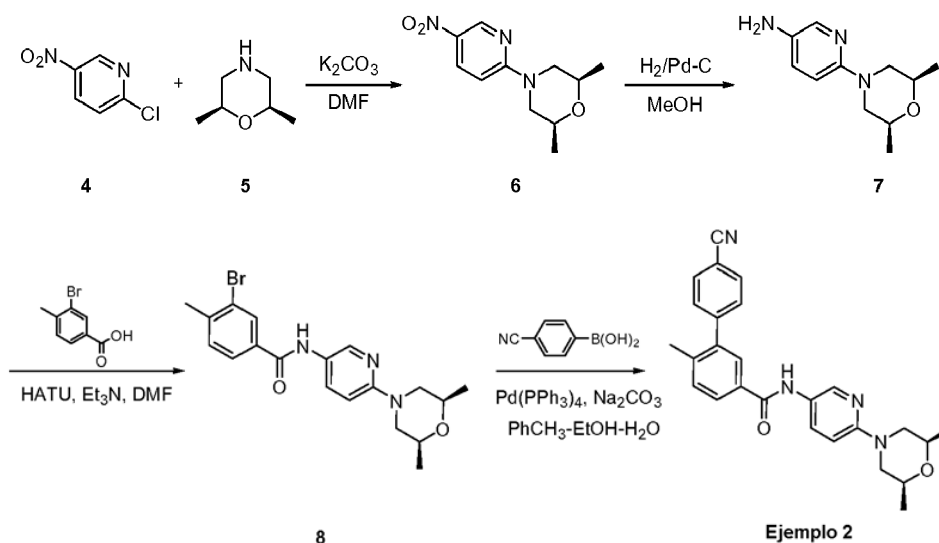
Etapa 2: A un matraz de fondo redondo que contiene éster metílico del ácido 3-yodo-4-metilbenzoico (1,38 g, 5,00 mmol), ácido 4-cianofenilborónico (1,10 g, 7,48 mmol), acetato de paladio (168 mg, 0,748 mmol), 2-(diciclohexilfosfino)bifenilo (0,526 g, 1,50 mmol) y fluoruro de potasio (0,870 g, 15,0 mmol) se le añade 1,4-dioxano anhidro (15 ml). Se purga el matraz con argón y se sella. Se agita la mezcla a 130°C durante 18 horas, se enfría hasta temperatura ambiente y luego se añaden agua (20 ml) y acetato de etilo (20 ml). Se retira el sólido con filtración a vacío. Se extrae el filtrado con EtOAc (20 ml x 2). Se combinan las fases orgánicas, se lavan con HCl acuoso (5%, 20 ml) y NaHCO₃ saturado (20 ml). Se seca sobre MgSO₄, y se concentra. Se purifica el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de EtOAc/hexano) para dar el éster metílico del ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 2; CL-EM m/z: 252,1 (M+1).

Etapa 3: A una disolución de éster metílico del ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 2 (2,56 g, 10,3 mmol) en 1,4-dioxano-H₂O (mezcla 1:1, 20 ml) se le añade NaOH (1,22 g, 30,2 mmol). Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. A esta mezcla se le añade HCl acuoso (1 N, 36 ml) y entonces se extrae con acetato de etilo (40 ml x 3). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Se elimina el disolvente. Se lava el sólido obtenido con una pequeña cantidad de acetonitrilo y se seca al aire para dar el ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 3: ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 7,94 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,84 (dd, 1 H, J1 = 8,4 Hz, J2 = 1,2 Hz), 7,75 (d, 1 H, J = 1,2 Hz), 7,61 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,48 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 2,29 (s, 3 H); CL-EM m/z 238,1 (M+1).

Etapa 4: A una suspensión del ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico 3 (40 mg, 0,17 mmol) en cloruro de metileno anhidro (5 ml) se le añaden 2 gotas de DMF. Entonces se añade cloruro de oxalilo (32 mg, 22 μl, 0,25 mmol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente hasta que se vuelve transparente. Después de eso, se concentra, vuelve a disolverse en cloruro de metileno anhidro (3 ml), y se añade a una disolución de 4-(morfolin-4-sulfonyl)-fenilamina (61 mg, 0,25 mmol) y trietilamina (34 mg, 47 μl, 0,33 mmol) en cloruro de metileno (2 ml). Se agita la mezcla durante 2 horas, se concentra y se purifica el residuo mediante HPLC desencadenada en masa preparativa (columna C₁₈, elución con CH₃CN-H₂O que contiene el 0,05% de TFA) para dar [4-(morfolin-4-sulfonyl)-fenil]-amida del ácido 4'-ciano-6-metilbifenil-3-carboxílico: ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 10,64 (s, 1 H), 8,07(d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,97 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,95 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 7,89 (s, 1 H), 7,43 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,67 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,53 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 3,63 (m, 4 H), 2,84 (m, 4 H) 2,32 (s, 3 H); CL-EM m/z: 462,1 (M+1).

Ejemplo de referencia 2

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



5 Etapa 1: A una disolución de 2-cloro-5-nitro-piridina 4 (2,38 g, 15 mmol) y *cis*-2,6-dimetilmorfolina (1,73 g, 15 mmol) se le añade K_2CO_3 (4,14 g, 30 mmol). Se calienta la mezcla a $50^\circ C$ durante la noche. Tras la concentración, se reparte el residuo entre EtOAc y agua. Se seca la fase de EtOAc sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentra para dar el producto 6 en bruto como un sólido amarillo. Se usa el producto en bruto directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM *m/z*: 238,1 (M+1).

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

15 Etapa 3: A una disolución de ácido 3-bromo-4-metilbenzoico (108 mg, 0,5 mmol), 6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-ilamina 7 (104 mg, 0,5 mmol) y HATU (190 mg, 0,5 mmol) en DMF seca (5 ml) se le añade trietilamina (139 μ l, 1,0 mmol) gota a gota. Se agita la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 h. Tras la concentración, se reparte el residuo entre EtOAc y agua. Se seca la fase orgánica y se concentra para dar el producto en bruto. Se purifica el compuesto final mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando el 50% de EtOAc en hexano como eluyente para dar 8 como un sólido blanco. CL-EM *m/z*: 404,1 (M+1).

20 Etapa 4: Se calienta a $140^\circ C$ una mezcla de ácido 4-cianofenilborónico (18 mg, 0,12 mmol), 3-bromo-N-[6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-il]-4-metil-benzamida 8 (40 mg, 0,1 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (11 mg, 0,01 mmol) y Na_2CO_3 (42 mg, 0,4 mmol) en un sistema de disolventes combinados de tolueno (0,2 ml) y agua (0,2 ml) y etanol (0,05 ml) bajo irradiación de microondas durante 30 min. Se diluye la mezcla de reacción con EtOAc y agua. Se extrae la fase acuosa con EtOAc. Se lava la fase orgánica combinada con salmuera y se concentra para dar el producto en bruto que se purifica mediante HPLC desencadenada en masa preparativa (columna C_{18} , elución con CH_3CN-H_2O que contiene el 0,05% de TFA) para dar [6-(2,6-dimetil-morfolin-4-il)-piridin-3-il]-amida del ácido 4'-ciano-6-metil-bifenil-3-carboxílico. CL-EM *m/z*: 427,2 (M+1).

Repitiendo los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores, usando materiales de partida apropiados, se obtienen los siguientes compuestos de fórmula I, tal como se identifican en la tabla 1.

Tabla 1

| Número de compuesto | Estructura | Datos físicos, EM (m/z) |
|---------------------|------------|------------------------------|
| 153 | | CL-EM <i>m/z</i> 486,2 (M+1) |

Se describen métodos y materiales generales para el análisis de los compuestos de la divulgación en la solicitud PCT número PCT/US2007/038171 "Compounds and Compositions for Treating Lymphoma and Mieloma"; Dierks y Warmuth. Los compuestos de la presente divulgación se someten a ensayo para evaluar su capacidad para inhibir la ruta de señalización de hedgehog.

5 Ensayo indicador de Gli-Luc para determinar la inhibición de la ruta de Hh

Se cultivan células TM3 de ratón (obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC, Manassas, VA) en medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero de caballo inactivado por calor al 5% y FBS al 2,5% (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), penicilina 50 unidades/ml y 50 µg/ml de estreptomina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C con CO₂ al 5% en atmósfera de aire. Se transfectaron las células TM3 con el plásmido indicador pTA-8xGli-Luc. Se seleccionó un clon transfectado de manera estable denominado TMHh-12. El clon TMHh-12 mostró una buena respuesta a la estimulación con Shh-N. Para evaluar las CI₅₀ de los antagonistas, se sembraron en placa 8000 células TMHh-12 en cada pocillo de placas de 384 pocillos con el 50% de medio DMEM/F12 complementado con FBS al 2%. Tras 12 horas, se activa la ruta de Hh añadiendo proteína Shh de ratón recombinante (expresada en *E. coli*, 8 µg/ml) o añadiendo agonistas de Smo. Se añaden los compuestos de prueba a las placas con diferentes concentraciones. Tras 48 horas, se someten a ensayo las actividades luciferasa de luciferasa de luciérnaga con el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega, Madison, WI). Se mide la CI₅₀ cuando el efecto del compuesto reduce la señal de luminiscencia en un 50%. Se evalúa la toxicidad de estos compuestos en células TM3 usando ensayos CellTiter Glo o mediante la línea celular TM3-Luc (una célula TM3 transfectada de manera estable con un vector de expresión de luciferasa constitutivo).

20 Los compuestos de fórmula I tienen preferiblemente una CE₅₀ de menos de 500 nM, más preferible menos de 200 nM.

La inhibición de la ruta de Hh suprime la expansión del linfoma *in vivo*

Los ligandos de hedgehog producidos por el estroma son factores de supervivencia y crecimiento importantes para células de linfoma primario en condiciones de cultivo *in vitro*. El crecimiento y la expansión de células de linfoma *in vivo* también depende de la señalización de Hh. Se inyectaron células de linfoma 1e6 que expresan luciferasa en ratones C57BL/6 singénicos. En el día 2 tras la inyección, se trataron los ratones o bien con control de vehículo o bien con un compuesto de la divulgación (50, 25, 10 y 5 mg/kg/bid) durante 10 días mediante administración oral. Se midieron los niveles de luciferasa obteniendo imágenes de bioluminiscencia 3 veces a la semana. Diez días tras la inyección, el grupo de control muestra una alta luminiscencia en los ganglios linfáticos y bazos de todos los ratones inyectados. Los ratones tratados con un compuesto de la divulgación a 50, 25 y 10 mg/kg/bid mostraron una reducción de la señal de luminiscencia hasta menos del 10% en comparación con el grupo de control (T/C por debajo del 10%). El grupo de dosificación de 5 mg/kg bid mostró una respuesta parcial con una T/C del 40%. Por tanto se concluye que la inhibición de la ruta de hedgehog reduce el crecimiento de linfoma en ratones.

35 Por ejemplo, el compuesto 153 de la tabla 1 logra una eficacia completa, es decir la presencia del compuesto 153 bloquea completamente la expansión de células de linfoma, a 50 mg/kg/día.

Ensayo de biopsia de piel embrionaria

Se someten a prueba compuestos de la divulgación para determinar su capacidad para tratar cáncer de piel distinto de melanoma, es decir lesiones de carcinoma de células basales usando el ensayo de biopsia de piel. Se recogen embriones de ratón de ratones *Ptch*^{+/-}-*LacZ* y se sacrifican en gestación tardía (día embrionario 17,5) y se cortan sus pieles. Se colocan biopsias circulares (4 mm de diámetro) en un dispositivo Transwell recubierto con colágeno (inserto de cultivo celular BIOCOAT, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) y se cultivan en la superficie de contacto aire-líquido, con el lado de la epidermis hacia arriba. El medio de cultivo contiene FBS al 5% en DMEM/F12 (3:1) con factor de crecimiento epidérmico, insulina e hidrocortisona añadidos. Para inducir la formación de nidos basaloides, se hacen crecer las biopsias en presencia de Shh 1-2 µg/ml durante 4 o más días. Se someten a prueba los efectos de los compuestos de la divulgación mediante adición en el momento de la adición de Shh o tras 6 días de pretratamiento con Shh. Los compuestos de la divulgación muestran inhibición completa (previniendo la formación de lesiones) a concentraciones de 1 µM o menos.

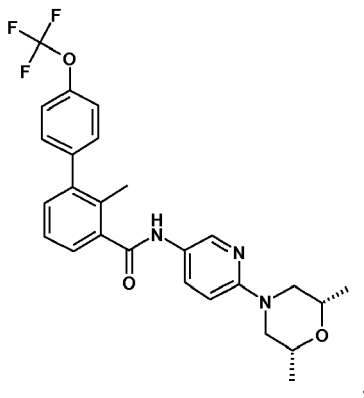
50 Los compuestos de fórmula I tienen preferiblemente una CE₅₀ de menos de 500 nM, más preferible menos de 200 nM para bloquear la formación de basaloides. Por ejemplo, el compuesto 153 de la tabla 1 bloquea completamente la formación de basaloides con una CE₅₀ de menos de 200 nM.

Ensayo de psoriasis

Se someten a prueba los compuestos de la divulgación para determinar su capacidad para tratar lesiones cutáneas psoriásicas según el ensayo descrito en Tas & Avci, *Pharmacology and Treatment, Dermatology* 2004; 209:126-131.

REIVINDICACIONES

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



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer hematológico o un tumor maligno hematopoyético que es mieloma múltiple.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer es neoplasia de células plasmáticas.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer es leucemia.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que el cáncer es leucemia infantil.
- 10 5. Uso según la reivindicación 3, en el que el cáncer es leucemia linfocítica crónica, leucemia aguda o leucemia crónica.
6. Uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer es linfoma.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el cáncer es linfoma maligno.
8. Uso según la reivindicación 6, en el que el cáncer es linfoma de Hodgkin.
- 15 9. Uso según la reivindicación 6, en el que el cáncer es linfoma no Hodgkin, linfoma dependiente del estroma, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, linfoma de células B, plasmoblastoma o plasmocitoma.
10. Uso según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de mieloma múltiple.
11. Compuesto N-((2R,6S)-2,6-dimetilmorfolino)piridin-3-il)-2-metil-4'-(trifluorometoxi)bifenil-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de un cáncer hematológico o de un tumor maligno hematopoyético que es mieloma múltiple.
- 20 12. Compuesto según la reivindicación 11 para su uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer hematológico se selecciona del cáncer descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 2-9.
13. Compuesto según la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de un tumor maligno hematopoyético que es mieloma múltiple.