

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 105**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4375 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2013 PCT/EP2013/065029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14012942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13737259 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2874625**

54 Título: **Uso de inhibidores de VEGFR-3 para tratar carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

17.07.2012 EP 12305866

17.07.2012 US 201261672489 P

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

02.10.2017

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)

54, rue La Boétie

75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

ALAM, ANTOINE y

BLANC, ISABELLE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 635 105 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

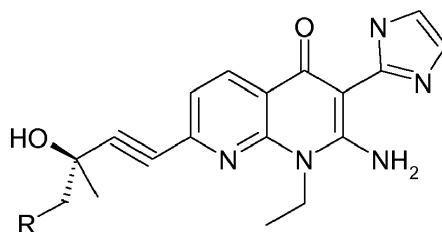
Uso de inhibidores de VEGFR-3 para tratar carcinoma hepatocelular

Esta invención se refiere al uso de inhibidores del receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular (CHC). El carcinoma hepatocelular (CHC) es el quinto tumor sólido más común en todo el mundo, y su incidencia ha aumentado de forma constante durante los últimos 25 años (Thomas et al. Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *J Clin Oncol.* 2010;28(25):3994-4005). El CHC es una enfermedad mortal ocasionando más de 600.000 muertes anuales en todo el mundo.

La necesidad insatisfecha es extremadamente alta, especialmente en la región de Asia y el Pacífico (Kudo et al. Asian consensus workshop report: expert consensus guideline for the management of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma in Asia. *Oncology* 2011. 81:158-64). En China, son diagnosticados aproximadamente 400.000 nuevos casos cada año. La mayoría de ellos son diagnosticados en etapas avanzadas, con opciones de tratamiento limitadas. Solo el 20% son aptos para la cirugía, con una tasa de recurrencia muy alta. Hasta ahora, solo el sorafenib, un inhibidor de múltiples cinasas, está aprobado para la terapia de CHC. Da lugar a 2-3 meses de SG (supervivencia global) > placebo, y menos del 5% de los pacientes son aptos debido a su toxicidad altamente asociada (Song et al. A single center experience of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma patients: evaluation of prognostic factors. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 2011 (12):1233-8).

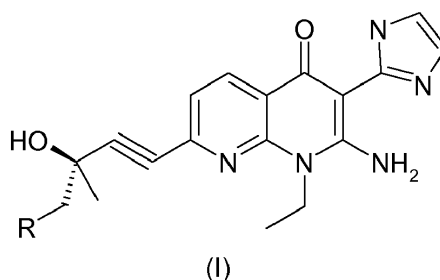
El receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3) es un receptor de tirosina cinasa que reconoce dos ligandos VEGFC y VEGFD. La linfangiogénesis asociada al tumor en el CHC se correlaciona con el mal pronóstico y la supervivencia de los pacientes (Thelen et al. Tumor-Associated Lymphangiogenesis Correlates with Prognosis after Resection of Human Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* (2009) 16:1222-1230; Thelen et al. Tumor-associated angiogenesis and lymphangiogenesis correlate with progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 105(5): 1123-32, 2010). A diferencia de las muestras hepáticas normales, la mayoría de las muestras de tejido con CHC revelaron una fuerte inmunorreactividad a VEGF-D (Thelen et al. VEGF-D promotes tumor growth and lymphatic spread in a mouse model of hepatocellular carcinoma *Int. J. Cancer.* 122, 2471-2481 2008). Además, los datos de los ensayos clínicos sugieren que el alto nivel de VEGF-C al inicio del estudio estaba significativamente asociado con una SG prolongada después del tratamiento con sunitinib (un inhibidor de pan-VEGFR) (Harmon et al. Mechanism-related circulating proteins as biomarkers for clinical outcome in patients with unresectable hepatocellular carcinoma receiving sunitinib *J. Transl. Med.* 2011 Jul 25; 9:120). Además, se ha descrito que la expresión de VEGFR-3 está aumentada en >75% de nódulos CHC positivos en antígeno X de la hepatitis B (HBxAg), y esta inversamente relacionada con la supervivencia de pacientes con CHC (Lian et al. Hepatitis B x Antigen Up-regulates Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Hepatocarcinogenesis. *HEPATOLOGY*, Vol. 45, No. 6, 2007). Además, la infiltración de macrófagos, que puede expresar VEGFR-3, se asocia con la metástasis intrahepática, la recurrencia tumoral y la escasa supervivencia de los pacientes. (Lin et al. Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherens junction *FEBS Letters* 580 (2006) 3042-3050; Zhu et al. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2008 Jun 1; 26(16):2707-16; Ju et al. Peritumoral activated hepatic stellate cells predict poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Am. J. Clin Pathol.* 2009 Apr; 131(4):498-510). Sin embargo, hasta ahora, no hay ningún inhibidor específico de VEGFR-3 del que se ha informado en las fases clínicas para el tratamiento de CHC.

La solicitud internacional nº PCT/EP2012/059145 (la solicitud '145), presentada el 16 de mayo de 2012, describe un compuesto de fórmula (I), en la que R es un grupo metoxi o hidroxilo, como inhibidores de VEGFR-3. Se ha encontrado ahora que el compuesto de fórmula (I) también es útil para el tratamiento de CHC.



(I)

La presente invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para uso en un método para tratar carcinoma hepatocelular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I),



en la que R es un grupo metoxi o hidroxilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

5 Los aspectos anteriores y otros aspectos, características, y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada considerada junto con los dibujos que se acompañan.

- La Figura 1 muestra los resultados de la evaluación in vivo del compuesto del Ejemplo 1 en el modelo de xenoinjerto de hepatocarcinoma murino.

10 - La Figura 2 muestra los resultados de la evaluación in vivo del compuesto del Ejemplo 1 en hepatocarcinoma inducido por sustancias químicas.

Como se ha usado anteriormente y se usará a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

“Compuesto de la invención” significa el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 “Carcinoma hepatocelular” es un tipo de cáncer de hígado derivado de las células del hígado. El daño hepático, que se manifiesta por la cirrosis (cicatrización), es un factor de riesgo principal para el cáncer de hígado. El CHC, sin embargo, también incluye carcinoma de hígado sólido en ausencia de cirrosis hepática.

“Paciente” incluye tanto seres humanos como otros mamíferos.

20 “Sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas, y a las sales de adición de bases del compuesto de fórmula I. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento final y la purificación del compuesto de fórmula I. Véase, por ejemplo S.M. Berge, et al., “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

“Cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto o una composición según la presente invención eficaz para producir el efecto terapéutico deseado.

25 “Tratar” o “tratamiento” significa aliviar los síntomas, eliminar la causa de los síntomas de forma temporal o permanente, o retardar la aparición de síntomas del trastorno o estado nombrado.

Una realización particular de la invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para uso en un método para tratar carcinoma hepatocelular, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de 2-amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1,8]-naftiridin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

30 Otra realización de la invención se refiere al compuesto 2-amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1,8]-naftiridin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

Una realización particular de la invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para uso en un método para tratar carcinoma hepatocelular, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de 2-amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1,8]-naftiridin-4-ona.

35 Otra realización de la invención se refiere al compuesto 2-amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1,8]-naftiridin-4-ona para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

Otra realización particular de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), en la que R es un grupo metoxi o hidroxilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la preparación de un medicamento para tratar carcinoma hepatocelular.

40

Un aspecto particular de la invención proporciona un compuesto de la presente invención para ser administrado en forma de una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica, de acuerdo con la presente invención, comprende un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En la práctica, el compuesto de la invención se puede administrar a seres humanos y otros animales por administración oral o intravenosa, en forma unitaria de administración, como una mezcla con excipientes farmacéuticos convencionales.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como una forma de dosificación sólida, tal como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, o como un polvo o gránulos; como una forma de dosificación líquida tal como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración intravenosa pueden formularse en disoluciones líquidas, en particular en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank o disolución de Ringer. Además, las composiciones pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del uso. También se incluyen las formas liofilizadas. Las formulaciones son estériles e incluyen emulsiones, suspensiones, disoluciones acuosas o no acuosas inyectables, que pueden contener agentes de suspensión y agentes espesantes y antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen que las formulaciones sean isotónicas y tengan un pH ajustado apropiado, con la sangre del receptor pretendido.

20 Los niveles de dosificación reales del (de los) ingrediente(s) activo(s) en las composiciones de la invención pueden variarse para obtener una cantidad del (de los) ingrediente(s) activo(s) que sea(n) eficaz (eficaces) para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición concreta y un método de administración al paciente. Un nivel de dosificación seleccionado para cualquier paciente determinado, por lo tanto, depende de una diversidad de factores, incluyendo el efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento, la etiología y gravedad de la enfermedad, el estado del paciente, peso, sexo, dieta y edad, el tipo y potencia de cada ingrediente activo, las velocidades de absorción, metabolismo y/o excreción, y otros factores.

25 La dosis diaria total del compuesto de la invención que se administra a un paciente en una sola dosis o en dosis divididas puede estar en cantidades, por ejemplo, desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, y particularmente 0,01 a 10 mg/kg/día. El porcentaje de ingrediente activo en una composición puede variarse, aunque debería constituir una proporción de modo que se obtenga una dosificación adecuada. Las composiciones de dosificación unitaria pueden contener tales cantidades de tales submúltiplos de las mismas como puedan usarse para constituir la dosis diaria. Obviamente, se pueden administrar formas farmacéuticas unitarias aproximadamente al mismo tiempo. Una dosis puede administrarse con tanta frecuencia como sea necesario para obtener el efecto terapéutico deseado. Algunos pacientes pueden responder con rapidez a una dosis mayor o menor, y pueden encontrar adecuada una dosis de mantenimiento mucho menor. Para otros pacientes, puede ser necesario tener tratamientos a largo plazo al ritmo de 1 a 4 dosis por día, de acuerdo con los requisitos fisiológicos de cada paciente particular. Se entiende que, para otros pacientes, será necesario prescribir no más de una o dos dosis diarias.

Ejemplo 1:

40 2-Amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1.8]-naftiridin-4-ona

Etapa 1: Ácido 6-cloro-2-etilamino-nicotínico

45 Una disolución de 18,0 g (84,4 mmoles) de ácido 2,6-dicloronicotínico en 180 ml de una disolución de etilamina (70% en agua) se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. Después, la amina en exceso se eliminó por evaporación a presión reducida, y se añadió una disolución acuosa de ácido acético al 10% hasta que el producto precipitó. El sólido beige se secó en un filtro giratorio, se enjuagó con agua fría y se secó en una estufa. Se obtuvieron 10,5 g del producto esperado.

Punto de fusión = 158-160°C

Rendimiento = 62%.

Etapa 2: Fluoruro de 6-cloro-2-etilamino-nicotinoílo

50 Se añadieron 2 ml (24,8 mmoles) de piridina y 4,2 ml (49,8 mmoles) de 2,4,6-trifluorotriazina a una suspensión de 5,0 g (24,8 mmoles) de ácido 6-cloro-2-etilamino-nicotínico en 125 ml de diclorometano. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y después se filtró. El sólido se enjuagó con 50 ml de diclorometano, y el filtrado se lavó dos veces con 60 ml de agua enfriada con hielo. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, y el disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida. Se obtuvieron 5,01 g de producto en la forma de un aceite naranja que se usó sin purificación adicional.

55

Rendimiento = 99%.

Etapa 3: 1-(2-Trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-carbaldehído

Una suspensión oleosa de 20,8 g de hidruro de sodio en aceite mineral (50%, 0,52 moles) se liberó del aceite mineral por agitación con hexano 3 veces, y se suspendió en 400 ml de DMF. Bajo agitación a temperatura ambiente, se añadieron 50,0 g (0,520 moles) de imidazol-2-carbaldehído a la suspensión. Después de 1,5 h, se añadieron 101 ml (0,572 moles) de cloruro de 2-(trimetilsilanil)etoximetilo, y la reacción se agitó una hora más. Después se añadió un exceso de agua a la suspensión, y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, y el disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida. Después, el material bruto se purificó por cromatografía en columna (DCM) para dar 85,0 g (0,376 moles) del imidazol-2-carbaldehído protegido con SEM.

Rendimiento = 72%

MH+ = 227,1 (C₁₀H₁₈N₂O₂Si, Mr = 226,35).

RMN 1H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 9,83 (s, 1 H); 7,86 (s, 1 H); 7,39 (s, 1 H); 5,75 (s, 2H); 3,58 (t, 2H); 0,95 (t, 2H); 0,02 (s, 9H)

15 Etapa 4: [1-(2-Trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-acetonitrilo

Se disolvieron 1,73 g (8,84 mmoles) de isocianuro de tosilmetileno en 10 ml de DME, y se enfriaron hasta -60°C. A esta temperatura, se añadieron primero 1,98 g de terc-butóxido de potasio y después, lentamente, una disolución de 2,00 g (8,84 mmoles) de 1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-carbaldehído en 5 ml de DME. Después de 2 horas de agitación a -60°C, se dejó que la reacción alcanzara 0°C, y se añadieron 5 ml de metanol (123,60 mmoles) a la disolución. La reacción se agitó 24 horas más a temperatura ambiente, y durante 2 horas a 40°C. Se añadió agua en exceso, y la disolución se extrajo 3 veces con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, y después de la evaporación del disolvente a presión reducida el material bruto se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (agua con 0,1 % de TFA/acetonitrilo = 80/20) para dar 0,87 g (0,367 moles) del imidazol-acetonitrilo protegido con SEM.

25 Rendimiento = 41%

MH+ = 238,1 (C₁₁H₁₉N₃O₂Si, Mr = 237,38)

RMN 1H ((DMSO-d₆, 500MHz): δ 7,66 (s, 1 H); 7,39 (s, 1 H); 5,53 (s, 2H); 4,52 (s, 2H); 3,55 (t, 2H); 0,92 (t, 2H); 0,02 (s, 9H)

Etapa 5: 3-(6-Cloro-2-etilamino-piridin-3-il)-3-hidroxi-2-[1-(2-(trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il)-acrilonitrilo

30 Se añadieron 0,283 g (2,53 mmoles) de terc-butolato de potasio, en pequeñas cantidades, a una disolución a 0°C de 0,600 g (2,53 mmoles) de [1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-acetonitrilo en 10 ml de THF anhidro. La mezcla se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente, y después se enfrió de nuevo hasta 0°C. Después se añadió una disolución de 0,512 g (2,53 mmoles) de fluoruro de 6-cloro-2-etilamino-nicotinoilo en 10 ml de THF, y el medio se agitó a temperatura ambiente durante una noche, se enfrió de nuevo hasta 0°C, y se añadió un segundo equivalente de terc-butolato de potasio (0,283 g, 2,53 mmoles). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de disolución acuosa saturada de cloruro de amonio, el pH se ajustó a 7 con HCl 2N, y después se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, y los disolventes se evaporaron a presión reducida. El material bruto se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (DCM/metanol = 90:10) produciendo 418 mg (rendimiento = 38%) del compuesto del título.

40 MH+ = 421 (C₁₉H₂₆ClN₅O₂Si, Mr = 419,99)

RMN 1H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 13,35 (s, 1H); 7,70 (d, 1H); 7,46 (s, 1H); 7,23 (s, 1H); 7,08 (t, 1H); 6,58 (d, 1H); 5,59 (s, 2H); 3,58 (t, 2H); 3,34 (dq, 2H); 1,13 (t, 3H); -0,03 (3s, 9H).

Etapa 6: 2-Amino-7-cloro-1-etil-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-1H-[1,8]naftiridin-4-ona

45 Se añadieron 0,112 g (1 mmol) de terc-butolato de potasio, en pequeñas cantidades, a una disolución fría a 0°C de 418 mg (1 mmol) del compuesto intermedio preparado 1,53-(6-cloro-2-etilamino-piridin-3-il)-3-hidroxi-2-[1-(2-(trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il)-acrilonitrilo], en 5 ml de THF anhidro. La mezcla se agitó durante 48 h a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 50 ml de disolución acuosa saturada de cloruro de amonio, el pH se ajustó a 7 con HCl 2N, y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, y los disolventes se evaporaron a presión reducida dando 400 mg del compuesto del título.

50

Rendimiento = 38%

MH+ = 421 (C₁₉H₂₆ClN₅O₂Si, Mr = 419,99)

RMN 1H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 8,50 (d, 1 H); 8,03 (s, 1 H); 7,98 (s, 1 H); 7,78 (s, 2H); 7,60 (s, 1 H); 5,49 (s, 2H); 4,58 (q, 2H); 3,57 (t, 2H); 1,42 (t, 3H); 0,85 (t, 2H); -0,03 (3s, 9H).

Etapa 7: (±)-2-Metil-but-3-ino-1,2-diol

- 5 Una disolución 0,5 M comercialmente disponible de cloruro de etilmagnesio en tetrahidrofurano se diluyó con 200 ml de tetrahidrofurano y se enfrió hasta 0°C. Después, se añadió una disolución de hidroxiacetona en 200 ml de tetrahidrofurano, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió, y se añadió una disolución acuosa de NH₄Cl. La mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo, y las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron a vacío (aproximadamente 200
- 10 mbares). Finalmente, se obtuvieron 20 g del producto esperado en la forma de un aceite marrón, que se usó sin purificación posterior (rendimiento bruto cuantitativo) en la forma racémica, o que podía ser separado en los enantiómeros puros por HPLC preparativa en columnas de HPLC quirales. A fin de obtener los enantiómeros ópticamente puros, la correspondiente mezcla racémica se sometió a cromatografía preparativa en una fase estacionaria quiral (columna Chiralpak AD-H, 250 x 21 mm, 5 mm) usando, como fase móvil: CO₂/2-propanol (70%/30%) con un caudal de 60 ml/min. a una presión de 100 bares, o una mezcla de isohexano/etanol (70/30) con 0,3% de TFA y un caudal de 120 ml/min.

Después de la elución y evaporación, se aisló cada enantiómero, y la pureza química y pureza enantiomérica de cada uno se determinaron por métodos analíticos conocidos por los expertos en la técnica.

- 20 Etapa 8: 2-Amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-1H-[1,8]naftiridin-4-ona

- En un matraz de reacción para microondas lleno de argón se pusieron 500 mg (1,2 mmoles) de 2-amino-7-cloro-1-etil-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-1H-[1,8]naftiridin-4-ona, 204 mg (1,8 mmoles) de (3R)-1-metoxi-2-metil-but-3-in-2-ol, 84 mg (0,120 mmoles) de dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II), 30 mg (0,16 mmoles) de yoduro de cobre (I), 2 ml de DMF (desgasificada), 2 ml de trietilamina (desgasificada), y se irradiaron en el
- 25 microondas de tal modo que la mezcla de reacción se mantuvo a 120°C durante 24 h. Los disolventes se evaporaron, y el sólido se resuspendió en 3 ml de DMF y se filtró. Después el filtrado se purificó por HPLC dando 430 mg (0,702 mmoles) de la sal de TFA del compuesto del título.

Rendimiento = 59%.

MH+ = 498,2 (C₂₅H₃₅N₅O₄Si, Mr =497,67).

- 30 RMN 1H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 8,39 (d, 1 H); 7,95 (s, 1 H); 7,88 (s, 1 H); 7,60 (s, 2H); 7,48 (d, 1H); 5,25 (s, 2H); 4,50 (señal ancha, 2H); 3,52 - 3,40 (señal ancha, pico de agua + 4H); 1,48 (s, 3H); 1,25 (t, 3H); -0,12 (3s, 9H)

Etapa 9: 2-Amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1,8]naftiridin-4-ona

- Se disolvieron 240 mg (0,4 mmoles) de la naftiridinona protegida con SEM de la etapa 1.8 a 0°C en 1,2 ml de TFA y 1,2 ml de DCM. La disolución se mantuvo a 3-5°C durante una noche hasta que la HPLC analítica mostró la desprotección total de la naftiridinona. La disolución se neutralizó añadiendo un exceso de disolución acuosa de NaHCO₃. La mezcla se extrajo entonces tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, y los disolventes se eliminaron por evaporación a presión reducida. El material bruto así
- 35 obtenido se purificó en gel de sílice (DCM:MeOH = 4:1) dando 143 mg (rendimiento cuantitativo) del compuesto del título desprotegido.

- 40 MH+ = 368,2 (C₁₉H₂₁N₅O₃, Mr =367,41)

RMN 1H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 13,15 (s, 1 H); 11,55 (b s, 1H); 8,59 (d, 1 H); 8,10 (b s, 1 H); 7,47 (d, 1 H); 7,25 (s, 1 H); 7,02 (s, 1 H); 5,85 (s, 1 H); 4,58 (señal ancha, 2H); 3,51 - 3,370 (señal ancha, pico de agua + 4H); 1,48 (s, 3H); 1,25 (t, 3H)

Rt (HPLC analítica): 4,806 min.

45 Ejemplo 2:

2-Amino-7-((3R)3,4-dihidroxi-3-metil-but-1-inil)-1-etil-3-(1H-imidazol-2-il)-1,8-naftiridin-4(1H)-ona

Etapa 1: 2-Amino-1-etil-7-(3,4-dihidroxi-3-metil-but-1-inil)-1-etil-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-1,8-naftiridin-4(1H)-ona

- 50 Siguiendo el procedimiento de acuerdo con la etapa 8 del Ejemplo 1, usando el compuesto intermedio descrito en la etapa 6 del Ejemplo 1 (2-amino-7-cloro-1-etil-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-1,8-naftiridin-4(1H)-ona) y en la etapa 7 del Ejemplo 1 ((±)-2-metil-but-3-in-1,2-diol), se obtuvo el compuesto del título.

MH+ = 354,16 (C₁₈H₁₉N₅O₃, Mr = 353,38)

Rt (HPLC analítica): 4,48 min.

Etapa 2: 2-Amino-1-etil-7-((3R)3,4-dihidroxi-3-metil-but-1-inil)-1-etil-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-imidazol-2-il]-1,8-naftiridin-4(1H)-ona

5 El compuesto racémico obtenido en la etapa 1 se sometió a purificación SFC quiral preparativa, usando un método, Berger prep SFC, detección UV a 230 nm, fase estacionaria Chiralpak IC 20 x 250 nm 5 μm, fase móvil 65%/35% CO₂/(MeOH + 0,5% de *isopropilamina*), 50 ml/min., 100 bares), que conduce a la separación de los enantiómeros R y S.

10 La pureza quiral se controló usando métodos de SFC quiral, Berger SFC, detección UV a 210 nm, fase estacionaria Chiralpak AD-H (250 mm x 4,6) 5 μm, fase móvil 65%/35% CO₂/(*isopropanol* + 0,5% de *isopropilamina*), 2,4 ml/min., 100 bares.

Enantiómero R (Rt = 6,9 min., pureza enantiomérica = 97,9%)

Etapa 3: 2-Amino-7-((3R)3,4-dihidroxi-3-metil-but-1-inil)-1-etil-3-(1H-imidazol-2-il)-1,8-naftiridin-4(1H)-ona

15 Siguiendo el procedimiento según la etapa 9 del Ejemplo 1, el compuesto del Ejemplo 2 se aisló en forma de un polvo amarillo.

MH+ = 354,16 (C₁₈H₁₉N₅O₃, Mr = 353,38)

Rt = 0,77 min.

20 RMN 1H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 13,15 (s, 1H); 11,55 (bs, 1H); 8,55 (d, 1H, J= 6,4Hz); 8,10 (bs, 1H); 7,47 (d, 1H, J= 6,4Hz); 7,15 (s, 1H); 7,02 (s, 1H); 5,6 (s, 1H); 5,1 (t, 1H, J= 6,4Hz) 4,53 (bd, 2H); 3,49 (dd, 1H, J= 6,4; 10,4 Hz); 3,41 (dd, 1H, J= 6,4; 10,4 Hz) 1,48 (s, 3H); 1,27 (t, 3H, J= 7,2Hz).

La pureza quiral se controló usando métodos de SFC quiral, Berger SFC, detección UV a 230 nm, fase estacionaria Chiralpak AD-H (250 mm x 4,6) 5 μm, fase móvil 60/40% CO₂/(*isopropanol* + 0,5% de *isopropilamina*), 2,4 ml/min., 100 bares.

Enantiómero R (Rt = 8,37 min., pureza enantiomérica = 99,2%)

25 Método analítico LC/UV/MS Detección del tiempo de retención (Rt)

Columna: Merk Chromolith performance RP18e, 100 x 4,6 mm, 3,5 μm

Disolvente A: H₂O/TFA (99,9/0,1)

Disolvente B: ACN/TFA (99,9/0,1)

Caudal: 2 ml/min.

30 Gradiente (A/B): 98/2 (0 min.) hasta 0/100 (8 min.) hasta 98/2 (10 min.)

Detección: 254,16 nM

RMN

35 Los espectros de RMN 1H se obtuvieron usando espectrómetros de RMN Bruker 250, 300, 400, o 600 MHz en DMSO-d₆, usando el pico de DMSO-d₅ como patrón interno. Los desplazamientos químicos δ se expresaron en partes por millón (ppm).

Las señales observadas se expresan como sigue: s = singlete; d = doblete; t = triplete; q = cuadruplete; m = multiplete o singlete grande; br = ancho; H = protón.

Puntos de fusión

El punto de fusión se midió con un banco de Kofler.

40 Ensayos farmacológicos

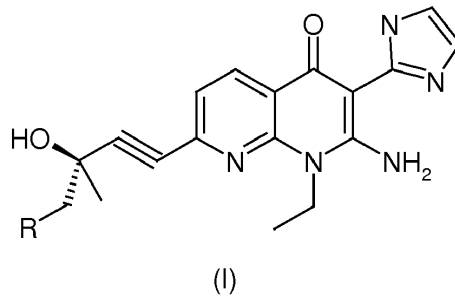
I. Evaluación in vitro del compuesto del Ejemplo 1

La solicitud '145 describe que los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 inhiben la actividad de TK de VEGFR-3 recombinante y la autofosforilación en células HEK con una CI50 de aproximadamente 25 nM y 47 nM,

- respectivamente. En los mismos ensayos, el compuesto del Ejemplo 1 mostró menos actividad sobre VEGFR-2 (90 nM-140 nM) y sobre VEGFR-1 ($>1 \mu\text{M}$). Usando células linfáticas primarias, se confirmó la elevada actividad frente a VEGFR-3, ya que inhibe la proliferación inducida por VEGFC y por VEGFD con una CI_{50} de aproximadamente 10-15 nM. Además, se demostró que el compuesto del Ejemplo 1 es altamente selectivo para VEGFR-3 en comparación con todas las otras cinasas evaluadas (85 cinasas diferentes) y con 107 receptores, enzimas y canales iónicos.
- 5
- II. Evaluación in vivo del compuesto del Ejemplo 1 en el modelo de xenoinjerto de hepatocarcinoma murino.
- Se evaluó la eficacia anti-tumoral in vivo del compuesto del Ejemplo 1 en el modelo de xenoinjerto ortotópico en la línea celular HepG2. Las células HepG2 fueron inyectadas en hígado de ratones SCID (obtenidos de ATCC), y los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos 14 días después de la inyección de células: un grupo de control tratado con vehículo y un grupo tratado con el compuesto del Ejemplo 1. El tratamiento se realizó una vez al día a 100 mg/kg en metilcelulosa tween como vehículo.
- 10
- El tamaño del tumor se midió pesando el lóbulo izquierdo con el tumor en el día 28. El tratamiento mediante el compuesto del Ejemplo 1 disminuyó significativamente el peso medio del lóbulo hepático que produce el tumor en el día 28 después de la inyección de células en un 34% ($p = 0,001$, prueba de la t de Student). El lóbulo hepático normal también se midió y se restó del lóbulo de los ratones con tumor. En ese caso, el compuesto del Ejemplo 1 redujo el peso del tumor en un 62%. (Véase la Figura 1).
- 15
- III. Evaluación in vivo del compuesto del Ejemplo 1 sobre hepatocarcinoma inducido por sustancias químicas en ratones
- El modelo de ratón inducido con DEN (N-dietinitrosamina) ha sido validado como un modelo representativo para CHC humano (Wu et al. J. Cancer Res. Clin. Oncol. (2009) 135. 969-981; Chuang et al. Carcinogenesis (2000) 21; 331-335).
- 20
- La iniciación del tumor se consigue mediante una sola inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de N-dietilnitrosamina (DEN) en ratones C3H macho (Charles River Laboratories, Francia) de 5 semanas de vida.
- 25
- Los ratones desarrollaron tumores en el hígado a partir del séptimo mes después de la administración de DEN, pero la incidencia alcanzó el 100% en el mes duodécimo. El compuesto del Ejemplo 1 fue administrado a diario P.O. (por vía oral) después de una suspensión de metilcelulosa tween, entre el décimo y el duodécimo mes después de la administración de DEN.
- 30
- El peso corporal se evaluó cada semana durante el tratamiento, y en el duodécimo mes. Los ratones se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico, y los hígados fueron retirados y pesados. Se contó el número de tumores por hígado, y el volumen del tumor se midió con calibradores. El volumen del tumor V se calculó utilizando la fórmula $V = 0,52 \times a^2 \times b$, en la que "a" representa el diámetro del tumor más pequeño y "b" el diámetro del tumor más grande.
- 35
- El tratamiento tardío con el compuesto del Ejemplo 1 impidió la formación de nuevos loci y bloqueó completamente el desarrollo del tumor en comparación con los mismos parámetros en el décimo mes. En comparación con el grupo de vehículo, el compuesto del Ejemplo 1 redujo en un 50% el número de tumores/hígado y en un 85% el volumen total del tumor. También redujo y casi normalizó el peso total del hígado, (véase la Figura 2).

REIVINDICACIONES

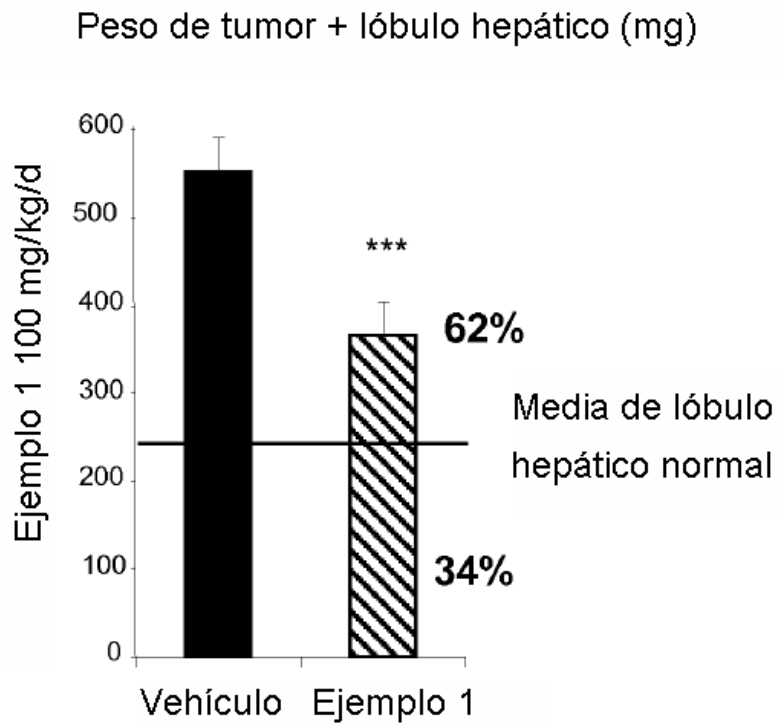
1. Un compuesto de fórmula (I),



en la que R es un grupo metoxi o hidroxilo,

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.
2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que R es un grupo metoxi.
3. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que R es un grupo hidroxilo.
4. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que es 2-amino-1-etil-7-((3R)-3-hidroxi-4-metoxi-3-metil-but-1-inil)-3-(1H-imidazol-2-il)-1H-[1,8]-naftiridin-4-ona.
- 10 5. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, que es 2-amino-7-((3R)-3,4-dihidroxi-3-metil-but-1-inil)-1-etil-3-(1H-imidazol-2-il)-1,8-naftiridin-4(1H)-ona.

Figura 1



Media +/- SEM; *;p<0,05; **;p<0,01 y *** p<0,001, ensayo de ANOVA frente a grupo de control. Análisis estadístico sobre los datos brutos totales (peso del tumor + lóbulo hepático)

Figura 2

