

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 33363 B1**
- (51) Cl. internationale : **C07D 401/14; A61K 31/502; A61P 35/00**
- (43) Date de publication : **01.06.2012**
-
- (21) N° Dépôt : **34455**
- (22) Date de Dépôt : **15.12.2011**
- (30) Données de Priorité : **19.06.2009 US 61/218,628**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/US2010/038568 15.06.2010**
- (71) Demandeur(s) : **ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center Indianapolis Indiana 46285 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **HIPSKIND, Philip, Arthur ; PATEL, Bharvin, Kumar ; WILSON (NEE TAKAKUWA), Takako**
- (74) Mandataire : **H&H CONSULTING LAW FIRM**
-
- (54) Titre : **ANTAGONISTES DE LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG A BASE DE PHTALAZINE DISUBSTITUEE**
- (57) Abrégé : La présente invention porte sur de nouveaux antagonistes de la voie hedgehog, phtalazine 1,4 disubstituée de formule (I), utiles dans le traitement du cancer.

ABREGÉ

La présente invention porte sur de nouveaux antagonistes de la voie hedgehog, phtalazine 1,4 disubstituée de formule (I), utiles dans le traitement du cancer.

01 JUIN 2012

PCT/US2010/038568

**ANTAGONISTES DE LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG A BASE
DE PHTALAZINE DISUBSTITUEE**

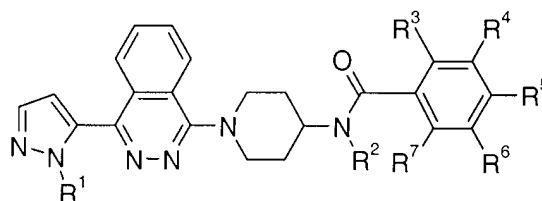
La présente invention concerne des antagonistes de la voie de signalisation Hedgehog et de manière plus spécifique, de nouvelles phtalazines 1,4-disubstituées, ainsi que leur utilisation thérapeutique. La voie de signalisation Hedgehog (Hh) joue un rôle important dans l'évolution caractéristique de l'embryon et dans la maintenance des tissus adultes en dirigeant la différenciation et la prolifération cellulaire. La famille des protéines Hedgehog (Hh) qui englobe la protéine « Sonic Hedgehog » (Shh), la protéine « Indian Hedgehog » (Ihh), et la protéine « Desert Hedgehog » (Dhh) représente des glycoprotéines sécrétées qui subissent des modifications post-traductionnelles, y compris un clivage autocatalytique et le couplage du cholestérol au peptide amino-terminal pour former le fragment qui possède une activité de signalisation. La Hh se lie à la protéine transmembranaire à 12 passages Ptch (Ptch1 et Ptch2), en soulageant ainsi la suppression de Smoothened (Smo) médiée par la Ptch. L'activation de Smo déclenche une série d'événements intracellulaires culminant dans la stabilisation des facteurs de transcription Gli (Gli1, Gli2, et Gli3) et dans l'expression des gènes dépendants de Gli qui sont responsables de la prolifération cellulaire, de la survie cellulaire, de l'angiogenèse et de l'invasion cellulaire.

La voie de signalisation Hh a récemment fait l'objet d'un intérêt considérable sur base de la découverte qu'une activation aberrante de la voie de signalisation Shh donne lieu à la formation de diverses tumeurs, comme par exemple le cancer pancréatique, le médulloblastome, l'épithélioma basocellulaire, le cancer du poumon à petites cellules et le cancer de la prostate. Dans le document WO 2005/033288, on révèle certains composés de phtalazine 1,4-disubstituée, qui ont été confirmés comme étant des antagonistes de la protéine Hedgehog. De manière similaire, dans le document WO 2008/110611, on révèle certains composés de phtalazine 1,4-disubstituée

dans le cadre du diagnostic et du traitement de pathologies liées à la voie de signalisation Hedgehog. Dans le document WO 2009/002469, on révèle certains composés de phtalazine 1,4-disubstituée qui se sont avérés être une option de traitement pour toutes les tumeurs entraînées par une signalisation Hedgehog inappropriée.

Un besoin existe toujours de disposer d'inhibiteurs puissants de la voie de signalisation Hedgehog, en particulier ceux qui possèdent des profils désirables du point de vue toxicologique. La présente invention procure de nouvelles phtalazines 1,4-disubstituées qui représentent des antagonistes puissants de cette voie de signalisation. Des composés particuliers de la présente invention procurent des interactions médicamenteuses désirables et des profils de sécurité apparentés par rapport au potentiel d'inhibition de CYP3A4 réversible et/ou irréversible en fonction du mécanisme.

La présente invention procure un composé répondant à la formule I :



15

Formule I

dans laquelle R¹ représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle ; R² représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle ; et R³, R⁴, R⁵, R⁶ ou R⁷ représentent, de manière indépendante, un atome d'hydrogène, un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe cyano, un groupe trifluorométhyle, un groupe trifluorométhoxy, un groupe difluorométhoxy, un groupe méthylsulfonyle ou un groupe trifluorométhylsulfonyle à condition qu'au moins trois des radicaux R³, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ représentent un atome d'hydrogène ; ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

La présente invention procure également une composition pharmaceutique comprenant un composé répondant à la formule, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, en combinaison avec un support, un diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention procure également un procédé pour traiter un cancer choisi parmi le groupe constitué par le cancer du cerveau, l'épithélioma basocellulaire, le cancer de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer gastrique, le cancer pancréatique, le cancer du tractus biliaire, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer du poumon non à petites cellules, le lymphome B, le myélome multiple, le cancer des ovaires, le cancer colorectal, le cancer du foie, le cancer rénal, le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le mésothéliome, les sarcomes des tissus mous, les sarcomes des os, la leucémie et le cancer des testicules dans un mammifère, comprenant l'administration au mammifère d'une quantité efficace du composé répondant à un la formule I, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

En outre, la présente invention procure un composé répondant à la formule I, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser en thérapie. De même, la présente invention procure un composé répondant à la formule I, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser dans le traitement du cancer. En particulier, le cancer est choisi parmi le groupe constitué par le cancer du cerveau, l'épithélioma basocellulaire, le cancer de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer gastrique, le cancer pancréatique, le cancer du tractus biliaire, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer du poumon non à petites cellules, le lymphome B, le myélome multiple, le cancer des ovaires, le cancer colorectal, le cancer du foie, le cancer rénal, le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le mésothéliome, les sarcomes des tissus mous, les sarcomes des os, la leucémie et le cancer des testicules.

La présente invention procure également l'utilisation d'un composé répondant à la formule I, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, en thérapie. De plus, la présente invention procure l'utilisation d'un composé répondant à la formule I, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer. En particulier, le cancer est choisi parmi le groupe constitué par le cancer du

cerveau, l'épithélioma basocellulaire, le cancer de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer gastrique, le cancer pancréatique, le cancer du tractus biliaire, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer du poumon non à petites cellules, le lymphome B, le myélome multiple, le cancer des ovaires, le cancer colorectal, le cancer du foie, le cancer rénal, le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le mésothéliome, les sarcomes des tissus mous, les sarcomes des os, la leucémie et le cancer des testicules.

En outre, la présente invention procure une composition pharmaceutique comprenant un composé répondant à la formule I, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à titre d'ingrédient actif pour traiter un cancer choisi parmi le groupe constitué par le cancer du cerveau, l'épithélioma basocellulaire, le cancer de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer gastrique, le cancer pancréatique, le cancer du tractus biliaire, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer du poumon non à petites cellules, le lymphome B, le myélome multiple, le cancer des ovaires, le cancer colorectal, le cancer du foie, le cancer rénal, le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le mésothéliome, les sarcomes des tissus mous, les sarcomes des os, la leucémie et le cancer des testicules.

Des composés particuliers répondant à la formule, ou un de leurs sels pharmaceutiquement acceptables, sont ceux dans lesquels :

- (a) R^1 représente un groupe méthyle ;
- (b) R^2 représente un groupe méthyle ;
- (c) R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent, de manière indépendante, un atome d'hydrogène, un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe trifluorométhyle ou un groupe méthylsulfonyle ;
- (d) R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent, de manière indépendante, un atome d'hydrogène, un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle ;
- (e) au moins deux des radicaux R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent, de manière indépendante, un atome de fluor, un atome de chlore, un

groupe trifluorométhyle ou un groupe méthylsulfonyle, avec cette condition que R^3 et R^7 ne représentent pas simultanément un atome d'hydrogène ;

- 5 (f) au moins deux des radicaux R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent de manière indépendante un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle, avec cette condition que R^3 et R^7 ne représentent pas simultanément un atome d'hydrogène ;
- (g) R^4 , R^6 et R^7 représentent un atome d'hydrogène ;
- 10 (h) R^3 et R^5 représentent, de manière indépendante, un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe trifluorométhyle ou un groupe méthylsulfonyle ; et R^4 , R^6 et R^7 représentent un atome d'hydrogène ;
- (i) R^3 et R^5 représentent, de manière indépendante, un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle ; et R^4 , R^6 et R^7 représentent un atome d'hydrogène ;
- 15 (j) R^1 représente un groupe méthyle ; et R^2 représente un groupe méthyle ;
- (k) R^1 représente un groupe méthyle ; R^2 représente un groupe méthyle ; et R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent, de manière
- 20 indépendante, un atome d'hydrogène un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe trifluorométhyle ou un groupe méthylsulfonyle ;
- (l) R^1 représente un groupe méthyle ; R^2 représente un groupe méthyle ; et R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent, de manière
- 25 indépendante, un atome d'hydrogène, un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle ;
- (m) R^1 représente un groupe méthyle ; R^2 représente un groupe méthyle ; et au moins deux des radicaux R^3 , R^4 , R^5 , R^6 et R^7 représentent de manière indépendante un atome de fluor, un
- 30 atome de chlore, un groupe trifluorométhyle ou un groupe

méthylsulfonyle, avec cette condition que R³ et R⁷ ne représentent pas simultanément un atome d'hydrogène ;

(n) R¹ représente un groupe méthyle ; R² représente un groupe méthyle ; et au moins deux des radicaux R³, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ représentent de manière indépendante un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle, avec cette condition que R³ et R⁷ ne représentent pas simultanément un atome d'hydrogène ;

(o) R¹ représente un groupe méthyle ; R² représente un groupe méthyle ; et R⁴, R⁶ et R⁷ représentent un atome d'hydrogène ;

(p) R¹ représente un groupe méthyle ; R² représente un groupe méthyle ; R³ et R⁵ représentent de manière indépendante un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe trifluorométhyle ou un groupe méthylsulfonyle ; et R⁴, R⁶ et R⁷ représentent un atome d'hydrogène ; et

(q) R¹ représente un groupe méthyle ; R² représente un groupe méthyle ; R³ et R⁵ représentent de manière indépendante un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle ; et R⁴, R⁶ et R⁷ représentent un atome d'hydrogène ;

Tels qu'on les utilise ci-dessus et à travers toute la description de l'invention, les termes suivants, sauf indication spécifique contraire, posséderont les significations reprises ci-après :

Un « support, diluant ou excipient pharmaceutiquement acceptable » représente un support généralement bien admis dans la technique pour la distribution d'agents biologiquement actifs à des mammifères, par exemple à des êtres humains.

Des « sels pharmaceutiquement acceptables » désignent les sels organiques et inorganiques, relativement non toxiques des composés de la présente invention.

Une « quantité thérapeutiquement efficace » ou une « quantité efficace » désigne la quantité du composé répondant à la formule I, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, de la présente invention ou d'une

composition pharmaceutique contenant un composé répondant à la formule I, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, de la présente invention qui va déclencher la réponse biologique ou médicale ou l'effet thérapeutique désiré sur un tissu, un système, un animal, un mammifère ou un être humain, qui est visé par le chercheur, le vétérinaire, le médecin traitant ou un autre membre du domaine médical.

Les termes « traitement », « traiter », « traitant », et analogues englobent le ralentissement ou la réversion de la progression d'un trouble. Ces termes englobent également le soulagement, l'amélioration, l'atténuation, l'élimination ou la réduction d'un ou de plusieurs symptômes d'un trouble d'une affection, même si le trouble ou l'affection n'est pas à proprement parler éliminé et même si la progression du trouble ou de l'affection n'est pas quant à elle ralentie ou renversée.

Dans le contexte de la nomenclature standard utilisée tout au long la présente divulgation, la portion terminale de la chaîne latérale désignée est décrite en premier lieu, avant de décrire la fonctionnalité adjacente en direction de l'endroit de fixation. Par exemple, un substituant méthylsulfonyl est équivalent à un groupe $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-}$.

Les composés de la présente invention sont capables de réagir avec un certain nombre d'acides inorganiques et organiques pour former des sels d'addition d'acide pharmaceutiquement acceptables. De tels sels d'addition d'acide pharmaceutiquement acceptables ainsi que la méthodologie courante pour les préparer sont bien connus dans la technique. Voir par exemple, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCH/Wiley VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, Pharmaceutical Salts, « *Journal of Pharmaceutical Sciences* », Vol 66, No. 1, janvier 1977.

Les composés de la présente invention sont de préférence formulés sous la forme de compositions pharmaceutiques que l'on administre par diverses voies. De préférence, lesdites compositions sont destinées à une administration par voie orale ou par voie intraveineuse. Lesdites compositions pharmaceutiques

ainsi que les procédés pour les préparer sont bien connus dans la technique. Voir par exemple, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, *et al.*, eds., 19^e éd., Mack Publishing Co., 1995).

5 Le composé réellement administré sera déterminé par un médecin en prenant en compte les circonstances pertinentes, y compris l'affection à traiter, la voie d'administration qui a été sélectionnée, le composé ou les composés réellement administrés, l'âge, le poids et la réponse du patient individuel, ainsi que la gravité des symptômes du patient. Des posologies quotidiennes rentreront normalement dans la plage d'environ 0,1 à environ 10 mg/kg du poids du corps. Dans certains cas, des posologies inférieures à la limite inférieure de la plage susmentionnée peuvent s'avérer plus qu'adéquates, tandis que dans d'autres cas, des doses encore plus importantes peuvent être utilisées.

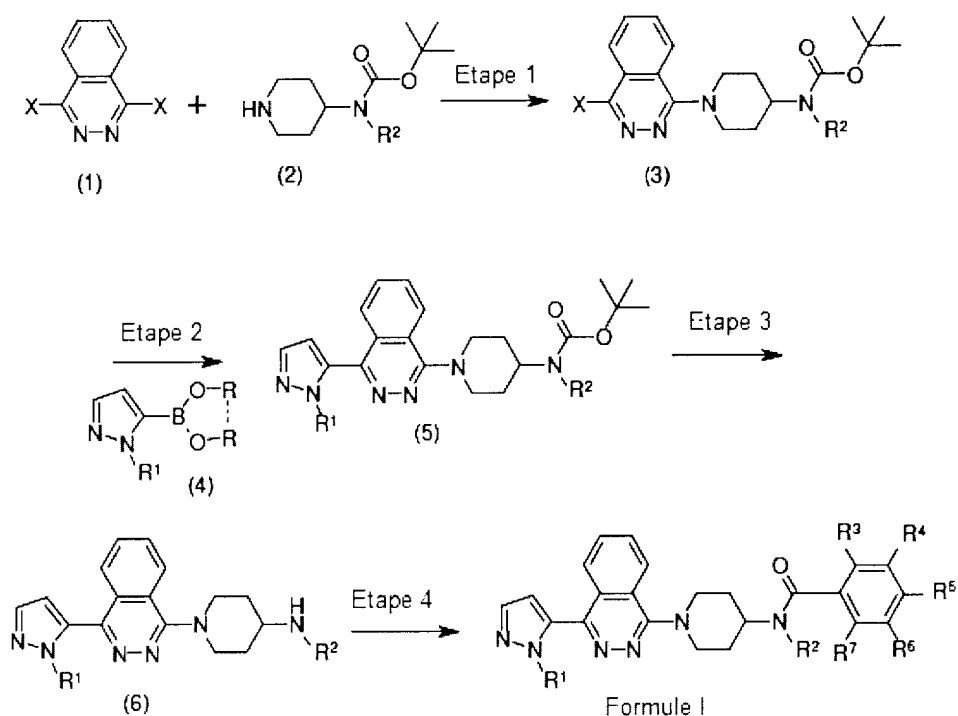
15 Les composés répondant à la formule I, ou leurs sels, peuvent être préparés via divers procédés bien connus dans la technique, et via ceux qui ont été décrits dans le Schéma, les Préparations et les Exemples ci-dessous. Les étapes synthétiques et spécifiques pour chacune des voies décrites peuvent être combinées de différentes manières pour préparer des composés répondant à la formule I, ou leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

20 Les substituants, sauf indication spécifique contraire, sont tels que définis ci-dessus. Les réactifs et les matières de départ sont généralement aisément disponibles pour l'homme de métier spécialisé dans la technique. D'autres peuvent être obtenus via des techniques standard de la chimie organique et hétérocyclique, via des techniques qui sont analogues aux synthèses de composés connus possédant une structure similaire et via les procédés décrits dans les Préparations et les Exemples qui suivent, y compris n'importe quels procédés nouveaux. Les dénominations des composés de la présente invention sont fournies en général par le programme ChemDraw Ultra® 10.0.

30 Tels qu'on les utilise en l'occurrence, les termes suivants ont les significations indiquées : "Et₂O" désigne l'éther diéthylique ; "DMF" désigne le

diméthylformamide ; “DMSO” désigne le diméthylsulfoxyde ; “DMAC” désigne le *N,N*-diméthylacétamide ; “NMP” désigne la *N*-méthylpyrrolidine ; “MeOH” désigne le méthanol ; “*boc*” ou “*t-boc*” désigne un groupe *tert*-butoxycarbonyle ; et “Cl₅₀” désigne la concentration d'un agent qui produit 50 % de la réponse inhibitrice maximale possible pour cet agent.

Schéma



On peut préparer un composé répondant à la formule I conformément aux réactions décrites dans le schéma.

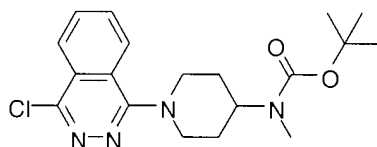
À l'étape 1, on fait réagir une phthalazine (1) disubstituée par un atome d'halogène (X = Cl ou Br) avec une 4-aminopipéridine (2) protégée par un groupe *boc* dans une substitution aromatique nucléophile (S_NAr) pour obtenir une pipéridinylphthalazine halogénée répondant à la formule (3). La réaction a lieu dans un solvant aprotique dipolaire tel que le DMF, DMAC ou NMP, en présence d'une base organique ou inorganique. De préférence, la réaction a

lieu dans de la NMP, en présence de carbonate de potassium, à une température de 50 - 140 °C.

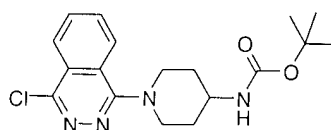
À l'étape 2, on soumet une pipéridinylphtalazine halogénée répondant à la formule (3) à une réaction de réticulation de Suzuki avec un ester ou un acide pyrazoleborique (4). Par exemple, on combine une pipéridinylphtalazine
5 halogénée répondant à la formule (3) avec l'ester pinacolique de l'acide 1-méthyl-1*H*-pyrazole-5-borique en présence d'un catalyseur de palladium tel que le tétrakis(triphénylphosphine)palladium et une base inorganique telle que le bicarbonate de sodium. La réaction se déroule dans un mélange de solvants
10 toluène/éthanol/eau pour obtenir la pyrazolylphtalazine répondant à la formule (5).

L'étape 3 représente une simple réaction de déprotection du groupe boc que l'on met en oeuvre dans des conditions d'acide par exemple en présence d'acide chlorhydrique dans de l'éther diéthylique ou du dioxane pour obtenir
15 l'aminopipéridinylphtalazine répondant à la formule (6). Des procédés pour introduire et pour éliminer des groupes de protection de l'atome d'azote et de l'atome d'oxygène sont bien connus dans la technique (voir par exemple, Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3^e Ed., John Wiley and Sons, New York, (1999)).

À l'étape 4, on soumet l'aminopipéridinylphtalazine répondant à la
20 formule (6) pour obtenir le pipéridinylamide répondant à la formule I. Dans un procédé, on fait réagir l'amine avec un chlorure de benzoyle substitué de manière appropriée dans un solvant inerte tel que le dichlorométhane en présence d'une base organique telle que la triéthylamine ou la
25 diisopropyléthylamine. En variante, on forme l'amide en utilisant un acide azoïque substitué de manière appropriée. On obtient la formation d'un ester actif en utilisant du pentafluorophényldiphénylphosphinate avant de faire réagir avec l'amine. La réaction a lieu dans un solvant mixte DMF/DMSO à une température d'environ -10 à 100 °C en présence d'une base organique telle que
30 la triéthylamine ou la diisopropyléthylamine.

Préparation 11-(4-chlorophthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl(méthyl)carbamate de *tert*-butyle

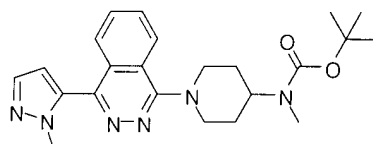
On chauffe un mélange de carbonate de potassium (21,23 g, 153,6
5 mmol), de la 1,4-dichlorophthalazine (26 g, 128 mmol) et de l'ester *tert*-butylique
de l'acide méthyl-pipéridin-4-ylcarbamique (30,01 g, 134,4 mmol) dans de la *N*-
méthylpyrrolidine (200 mL) à 80 °C pendant une nuit. On verse le mélange
réactionnel dans de l'eau, on extrait dans du dichlorométhane, on sèche sur du
Na₂SO₄ et on concentre sous pression réduite. On ajoute de l'éther diéthylique
10 et on élimine par filtration le produit solide résultant (4-chlorophthalazin-1-ol
provenant des impuretés de la matière de départ). On concentre le filtrat. On
purifie le résidu résultant par chromatographie éclair sur du gel de silice
(hexane : acétate d'éthyle = 2 : 1) pour obtenir le composé sous rubrique sous
la forme d'un produit solide de couleur blanche (17,66 g, correspondant à un
15 rendement de 37 % de la théorie). ES/MS m/z (³⁷Cl) 377,0 (M+1).

Préparation 21-(4-chlorophthalazin-1-yl)pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle

20 On prépare le composé sous rubrique en suivant essentiellement le
procédé décrit à la Préparation 1, en utilisant l'ester *tert*-butylique de l'acide
pipéridin-4-yl-carbamique. On refroidit le mélange réactionnel et on le verse
dans de l'eau (500 mL). On extrait dans de l'acétate d'éthyle, on lave avec de
l'eau, on sèche sur du Na₂SO₄ et on élimine le solvant sous pression réduite
25 pour obtenir le composé sous rubrique sous la forme d'un produit solide de
couleur jaune (36 g, correspondant à un rendement de 97 % de la théorie).
ES/MS m/z 363,0 (M+1).

Préparation 3

Méthyl(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)carbamate de *tert*-butyle



5

On place du carbonate de sodium (3,82 g, 36,09 mmol), du 1-(4-chlorophtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl(méthyl)carbamate de *tert*-butyle (6,8 g, 18,04 mmol) et de l'ester pinacolique de l'acide 1-méthyl-1*H*-pyrazole-5-borique (5,63 g, 27,1 mmol) dans un ballon avec un mélange de toluène (50 mL), d'éthanol (17 mL) et d'eau (17 mL). On purge le mélange pendant 10 minutes avec de l'azote gazeux. On ajoute du tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0,4 g, 0,35 mmol) et on chauffe le mélange à 74 °C pendant une nuit. On refroidit le mélange jusqu'à la température ambiante et on le dilue avec du dichlorométhane. On lave la portion organique avec de la saumure, on sèche sur du Na₂SO₄ et on concentre sous pression réduite. On purifie le résidu résultant par chromatographie éclair sur du gel de silice (hexane : acétate d'éthyle : 2 M NH₃ dans MeOH = 20 : 5 : 1) pour obtenir le composé sous rubrique sous la forme d'une mousse de couleur jaune (5,33 g, correspondant à un rendement de 70 % de la théorie). ES/MS m/z 423,2 (M+1).

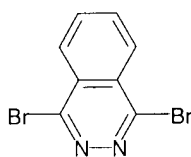
20

**Procédé donné en variante pour préparer du méthyl(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)carbamate de *tert*-butyle :
Préparations 4 - 6**

25

Préparation 4

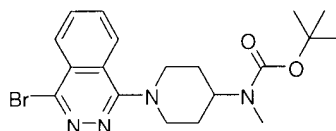
1,4-dibromophtalazine



On charge un tube sous pression avec du pentabromure de phosphore (24,5 g, 54,1 mmol) et de la 2,3-dihydro-phthalazine-1,4-dione (5,00 g, 30,8 mmol). On scelle le tube et on chauffe à 140 °C pendant un laps de temps de 6 à 7 heures. On laisse refroidir pendant une nuit. On ouvre prudemment le tube à cause de la pression. On fractionne le produit solide et on le verse dans de l'eau glacée. On laisse s'agiter dans de l'eau glacée et on récolte le produit solide résultant par filtration sous vide. On sèche dans un four à vide pour obtenir le produit final (8,31 g, correspondant à un rendement de 93 % de la théorie). ES/MS (⁷⁹Singulet large, ⁸¹Br) m/z 288,8 (M+). Réf.: *Can. J. Chem.* 1965, 43, 2708.

Préparation 5

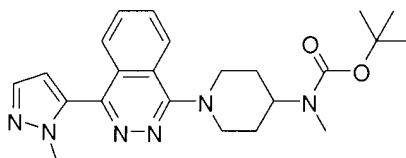
1-(4-bromophthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl(méthyl)carbamate de *tert*-butyle



On combine de la 1,4-dibromophthalazine (0,70 g, 2,38 mmol), de la *N*-méthylpyrrolidone (7,0 mL), du carbonate de potassium (395 mg, 2,86 mmol), et de l'ester *tert*-butylique de l'acide méthyl-pipéridin-4-yl-carbamique (532 mg, 2,38 mmol). On chauffe à 80 °C pendant une nuit. On refroidit et on verse dans de l'eau. On récolte le produit solide et on le sèche dans un four à vide à la température ambiante pendant une nuit pour obtenir le produit final (0,96 g, correspondant à un rendement de 95 % de la théorie). ES/MS m/z (⁸¹Br) 421,0 (M+1).

Préparation 6

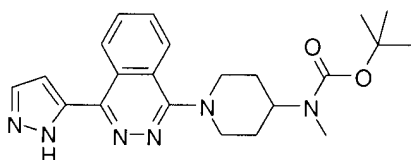
Méthyl (1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)carbamate de *tert*-butyle



On charge un tube réactionnel avec du 1-(4-bromophthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl(méthyl)carbamate de *tert*-butyle (500 mg, 1,2 mmol), de l'ester pinacolique de l'acide 1-méthyl-1*H*-pyrazole-5-borique (370 mg, 1,8 mmol), du carbonate de sodium (252 mg, 2,4 mmol), du toluène (3,75 mL), de l'éthanol (1,25 mL), et de l'eau (1,25 mL). On purge le mélange réactionnel avec de l'azote pendant 10 minutes. On ajoute du tétrakis(triphénylphosphine)palladium (137,1 mg, 118,7 μ mol). On fait barboter de l'azote à travers le mélange réactionnel pendant 10 minutes supplémentaires. On ferme le récipient réactionnel avec un bouchon et on chauffe à 90 °C pendant une nuit. On refroidit le mélange réactionnel et on le filtre à travers un tampon de gel de silice en éluant avec du MeOH à 5 % : CH₂Cl₂, on concentre les fractions sous pression réduite. On purifie le résidu résultant en utilisant une chromatographie sur du gel de silice (2 N NH₃ à 2 % dans MeOH:CH₂Cl₂) afin d'obtenir le produit final (345,6 mg, correspondant à 69 % de la théorie). ES/MS m/z 423,2 (M+1).

Préparation 7

1-(4-(1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl(méthyl)carbamate de *tert*-butyle

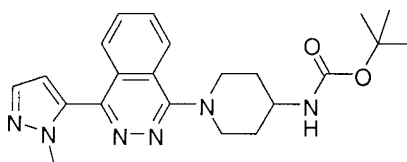


On prépare le composé sous rubrique en suivant essentiellement le procédé décrit à la Préparation 3, en utilisant du 1-(4-chlorophthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl(méthyl)carbamate de *tert*-butyle et de l'ester pinacolique de

l'acide 1*H*-pyrazole-3-borique pour obtenir 580 mg (correspondant à un rendement de 67 % de la théorie). ES/MS m/z 409,2 (M+1).

Préparation 8

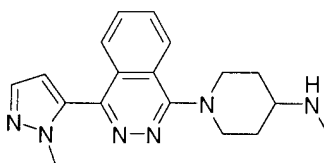
5 1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle



On prépare le composé sous rubrique en suivant essentiellement le procédé décrit à la Préparation 3, en utilisant du 1-(4-chlorophtalazin-1-yl)pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle pour obtenir 5,92 g (correspondant à un rendement de 94 % de la théorie). ES/MS m/z 308,8 (M⁺).

Préparation 9

N-méthyl-1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-amine



15 On dissout du méthyl(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)carbamate de *tert*-butyle (7,77 g, 18,39 mmol) dans du dichlorométhane (100 mL). On ajoute un excès de chlorure d'hydrogène 1 M dans de l'éther diéthylique (20 mL, 80 mmol) à la solution et on agite à la température ambiante pendant 2 heures. On concentre sous pression réduite. On purifie le résidu résultant par chromatographie éclair sur du gel de silice (dichlorométhane : 2 M NH₃ dans MeOH = 10 : 1) pour obtenir le composé sous rubrique sous la forme d'une mousse de couleur jaune (5,83 g, correspondant à un rendement de 98 % de la théorie). ES/MS m/z 323,2 (M+1).

25

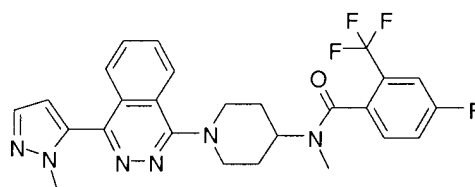
On prépare les produits intermédiaires repris dans le tableau ci-dessous en suivant essentiellement le procédé décrit à la Préparation 9, avec cette exception qu'on soumet à une déprotection l'amine appropriée protégée avec un groupe t-Boc en utilisant du HCl 4 M dans du dioxane.

Prép n°	Nom chimique	Structure	ES/MS m/z
10	1-(4-(1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)- <i>N</i> -méthylpipéridin-4-amine		309,2 (M ⁺)
11	1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-amine		408,8 (M ⁺)

5

Exemple 1

4-fluoro-*N*-méthyl-*N*-(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide



10 On traite une solution de la *N*-méthyl-1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-amine (2,8 g, 8,68 mmol) et de triéthylamine (3,36 mL, 26,1 mmol) dans du CH₂Cl₂ (30 mL) avec du chlorure de 4-fluoro-2-(trifluorométhyl)benzoyle (2,14 mL, 10,42 mmol). On agite pendant 2 heures à la température ambiante. On concentre le mélange réactionnel sous pression

15 réduite. On purifie le résidu résultant par chromatographie éclair sur du gel de silice (hexane : acétate d'éthyle : 2 M NH₃ dans MeOH = 20 : 5 : 1) pour obtenir la base libre sous la forme d'une mousse de couleur jaune (3,83 g, correspondant à un rendement de 86 % de la théorie). ES/MS m/z 513,0 (M⁺).

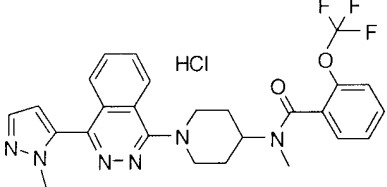
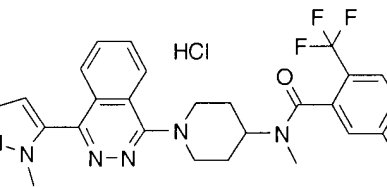
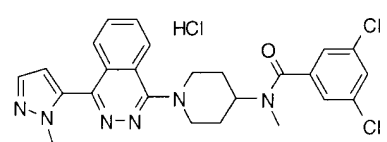
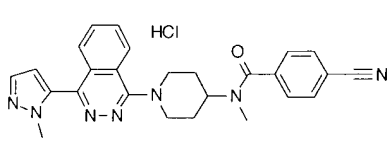
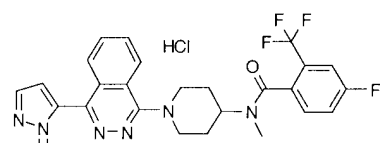
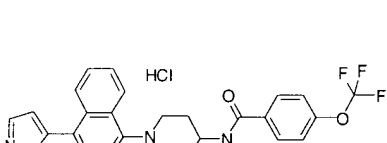
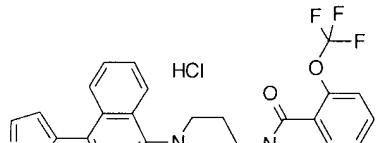
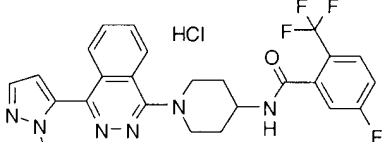
Exemple 1a

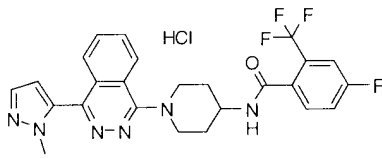
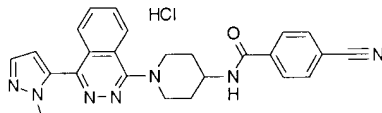
Chlorhydrate du 4-fluoro-*N*-méthyl-*N*-(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide

On dissout du 4-fluoro-*N*-méthyl-*N*-(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide (7,13 g, 13,91 mmol) dans du dichlorométhane (100 mL) et on ajoute un excès de HCl 1 N dans de l'éther diéthylique (30 mL, 30 mmol). On élimine le solvant sous vide pour obtenir le composé sous rubrique (7,05 g, correspondant à un rendement de 92 % de la théorie). ES/MS *m/z* 513,0 (*M*+1). La RMN indique un mélange 2:1 de rotamères amides. Rotamère majeur : ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,34 (m, 1 H), 8,26 (m, 2 H), 7,95 (m, 1 H), 7,75 (m, 1 H), 7,64 (m, 2 H), 7,55 (m, 1 H), 6,72 (d, 1 H, *J* = 2 Hz), 5,15 (singulet large, 1 H), 4,71 (m, 1 H), 4,22 (m, 2 H), 3,84 (s, 3 H), 3,48 (m, 2 H), 2,65 (s, 3 H), 2,19 (m, 2 H), 1,89 (m, 2 H). Rotamère mineur : ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,27 (m, 1 H), 8,24 (m, 2 H), 7,94 (m, 1 H), 7,73 (m, 1 H), 7,63 (m, 3 H), 6,70 (d, 1 H, *J* = 2 Hz), 5,15 (singulet large, 1 H), 4,71 (m, 1 H), 4,07 (m, 2 H), 3,81 (s, 3 H), 3,16 (m, 2 H), 2,92 (s, 3 H), 1,90 (m, 2 H), 1,62 (m, 2 H).

On prépare les amides repris dans le tableau ci-dessous en suivant essentiellement les procédés décrits aux Exemples 1 et 1a, en utilisant la pipéridinylphtalazine appropriée et du chlorure de benzoyle substitué.

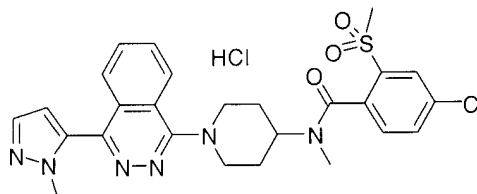
Ex. n°	Nom chimique	Structure	ES/MS <i>m/z</i>
2	Chlorhydrate du 2-fluoro- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-3-(trifluorométhyl)benzamide		513,0 (<i>M</i> +1)
3	Chlorhydrate du <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-4-(trifluorométhoxy)benzamide		511,0 (<i>M</i> +1)

4	Chlorhydrate du <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhoxy)-benzamide		511,0 (M+1)
5	Chlorhydrate du 5-fluoro- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)-benzamide		513,0 (M+1)
6	Chlorhydrate du 3,5-dichloro- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)benzamide		^(35Cl) 495,0 (M+1)
7	Chlorhydrate du 4-cyano- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)benzamide		526,2 (M +1)
8	Chlorhydrate du <i>N</i> -(1-(4-(1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-4-fluoro- <i>N</i> -méthyl-2-(trifluorométhyl)benzamide		499,0 (M+1)
9	Chlorhydrate du <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-4-(trifluorométhoxy)-benzamide		497,0 (M+1)
10	Chlorhydrate du <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhoxy)-benzamide		497,0 (M+1)
11	Chlorhydrate du 5-fluoro- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide		499,0 (M+1)

12	Chlorhydrate du 4-fluoro- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide		499,0 (M+1)
13	Chlorhydrate du 4-cyano- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)benzamide		438,0 (M+1)

Exemple 14

Chlorhydrate du 4-chloro-*N*-méthyl-*N*-(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(méthylsulfonyl)benzamide

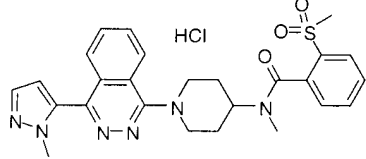
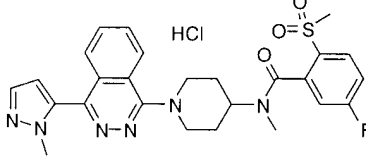
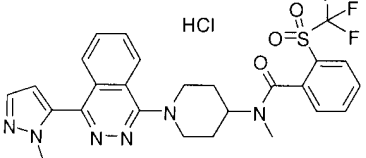
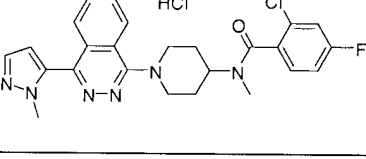
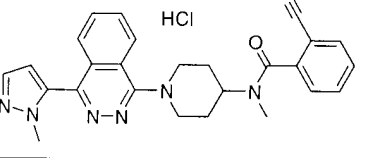
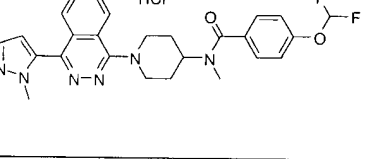


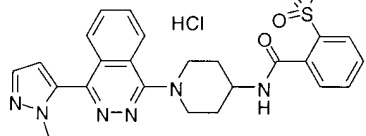
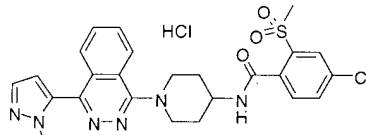
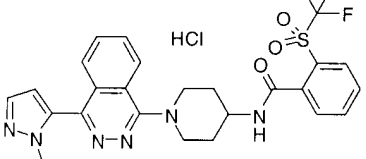
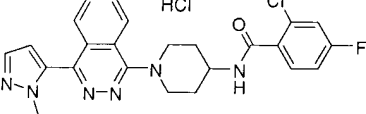
5

On dissout de la *N*-méthyl-1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-amine (100 mg, 0,31 mmol), de l'acide 4-chloro-2-(méthylsulfonyl)benzoïque (87 mg, 0,37 mmol) et de la diisopropyléthylamine (0,26 mL, 1,5 mmol) dans un mélange DMF : DMSO = 4:1 (2 mL) à 60 °C. On refroidit à 0 °C et on ajoute du diphenylphosphinate de pentafluorophényle (250 mg, 0,65 mmol) dans du DMF : DMSO = 1:1 (1 mL) à la solution. On agite le mélange à 60 °C pendant une heure. On refroidit le mélange réactionnel jusqu'à la température ambiante et on dilue avec un produit de lavage à base de CH₂Cl₂, on lave avec de la saumure, on sèche sur du Na₂SO₄, et on concentre sous pression réduite. On purifie le résidu résultant par chromatographie éclair sur du gel de silice (hexane : acétate d'éthyle : 2 M NH₃ dans MeOH = 20 : 5 : 1) pour obtenir le produit. On ajoute un excès de HCl 1 N dans de l'éther diéthylique (1 mL, 10 mmol) au produit isolé et on élimine le solvant pour obtenir le composé sous rubrique (150 mg, correspondant à un rendement de 84 % de la théorie). ES/MS m/z 539,0 (M+1).

20

On prépare les amides repris dans le tableau ci-dessous en suivant essentiellement le procédé décrit à l'Exemple 14, en utilisant la pipéridinylphthalazine appropriée et de l'acide benzoïque substitué.

Ex. n°	Nom chimique	Structure	ES/MS m/z
15	Chlorhydrate du <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(méthylsulfonyl)-benzamide		505,0 (M+1)
16	Chlorhydrate du 5-fluoro- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(méthylsulfonyl)-benzamide		476,0 (M+1)
17	Chlorhydrate du <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhylsulfonyl)-benzamide		559,0 (M+1)
18	Chlorhydrate du 2-chloro-4-fluoro- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)benzamide		³⁵ Cl 479,0 (M+1)
19	Chlorhydrate du 2-cyano- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)benzamide		452,0 (M+1)
20	Chlorhydrate du 4-(difluorométhoxy)- <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-benzamide		493,0 (M+1)

21	Chlorhydrate du <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(méthylsulfonyl)-benzamide		491,0 (M+1)
22	Chlorhydrate du 4-chloro- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(méthylsulfonyl)-benzamide		³⁵ Cl) 525,0 (M+1)
23	Chlorhydrate du <i>N</i> -(1-(4-(1-Méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhylsulfonyl)-benzamide		545,0 (M+1)
24	Chlorhydrate du 2-chloro-4-fluoro- <i>N</i> -(1-(4-(1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)phtalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-benzamide		³⁵ Cl) 465,0 (M+1)

La voie de de signalisation Hedgehog est impliquée comme facteur de survie pour les cancers suivants : l'épithélioma basocellulaire, les cancers du système gastro-intestinal supérieur (l'œsophage, l'estomac, le pancréas et le tractus biliaire), le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer du poumon non à petites cellules, le lymphome B, le myélome multiple, le cancer des ovaires, le cancer colorectal, le cancer du foie, le cancer rénal, le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le mésothéliome, les sarcomes des tissus mous, les sarcomes des os, la leucémie et le cancer des testicules et le cancer du cerveau.

Des éléments de la voie de signalisation Hedgehog se sont avérés être des cibles médicamenteuses potentielles pour le traitement du cancer. Une lignée cellulaire de Daoy établie à partir d'une tumeur de médulloblastome (ATCC, HTB-186) est sensible à des ligands du Hh. Lorsque ces cellules sont traitées avec des milieux conditionnés par Shh ajouté par voie exogène, la voie de signalisation Hh est activée et donne lieu à une augmentation de

l'expression de *Gli1*. La cyclopamine, un alcaloïde isolé de la clintonie boréale *Veratrum californicum* est un faible antagoniste de Hedgehog et s'est avéré supprimer l'expression de *Gli1* en réponse à une stimulation par Shh. Des observations récentes suggèrent que le cyclopamine inhibe la croissance de
5 cellules cultivées de médulloblastome et d'allogreffes. En utilisant ce système modèle cellulaire de Daoy, on peut identifier des inhibiteurs puissants des voies de signalisation de Hedgehog. Étant donné que les composés de la présente invention sont des antagonistes de Hedgehog, ils sont appropriés pour traiter les types de tumeurs susmentionnés.

10

Détermination de l'activité biologique CI_{50} : dosage fonctionnel pour mesurer l'inhibition de *Gli1* dans des cellules Daoy

Le protocole d'essai suivant ainsi que ses résultats démontrent
15 davantage l'utilité et l'efficacité des composés et des procédés de la présente invention. Des dosages fonctionnels apportent leur soutien pour démontrer que les composés de la présente invention manifestent une aptitude à inhiber la voie de signalisation Shh. Tous les ligands, les solvants et les réactifs utilisés dans le dosage suivant sont aisément disponibles auprès de sources
20 commerciales ou bien peuvent être aisément préparés par l'homme de métier spécialisé dans la technique.

On détermine l'activité biologique en utilisant un dosage fonctionnel dans des cellules cancéreuses neuronales Daoy et on mesure les taux de l'acide ribonucléique de *Gli1* via un dosage de l'ADNr (acide désoxyribonucléique ramifié) (Panomics, Inc., Fremont, CA). *Gli* a été découvert à l'origine dans une
25 lignée cellulaire de glioblastome et il encode une protéine à doigts de zinc qui est activée par la signalisation Shh. On obtient la réponse maximale par induction de la transcription de *Gli1* dans les cellules Daoy avec un milieu conditionné (rein embryonnaire humain, cellules HEK-293 qui expriment de
30 manière stable le Shh recombinant) pendant 24 heures et en mesurant ensuite la quantité de transcrit *Gli1* stimulé. La réponse minimale représente la quantité

de transcrit *Gli1* inhibé avec un composé témoin dans des cellules Daoy qui ont été stimulées avec un milieu conditionné (rein embryonnaire humain, cellules HEK-293 qui expriment de manière stable le Shh recombinant) pendant 24 heures.

5 Le système de dosage de l'ADNr fait appel à la technologie de l'ADN à chaîne ramifiée pour permettre l'amplification d'un acide ribonucléique cible (transcrit). La technologie fait usage de trois types de courtes sondes hybrides synthétiques d'ADNc spécifiques à *Gli1* qui déterminent la spécificité du
10 « capture extenders » (CEs), « label extenders » (LEs), et « blockers » (BLs)] qui s'hybrident sous la forme d'un complexe avec les transcrits cibles pour amplifier le signal d'hybridation. L'addition d'un substrat chimioluminescent au cours de l'étape d'amplification permet d'obtenir une détection en utilisant la luminescence.

15 On fait croître des cellules Daoy jusqu'à confluence dans des ballons de culture tissulaire T225 dans des milieux de croissance de Daoy contenant un milieu essentiel minimal (MEM) plus 10 % de sérum bovin foetal (FBS) avec 0,1 nM d'acides aminés non essentiels et 1 mM de pyruvate de sodium. On élimine les cellules des ballons T225 en utilisant de la trypsine et de l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), on centrifuge, on remet en suspension
20 dans le milieu et on procède ensuite au comptage.

On ensemence ensuite les cellules Daoy à raison de 50.000 cellules par puits dans des milieux de croissance dans des plaques de culture tissulaire claires de 96 puits Costar et on laisse incuber pendant une nuit à 37 °C sous une atmosphère de dioxyde de carbone à 5 % (CO₂). On lave les cellules une
25 fois dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) avant d'ajouter 100 µL de milieu conditionné avec Shh (Shh-CM) afin de stimuler les taux d'expression de *Gli1*. On dilue le milieu Shh-CM pour obtenir une stimulation maximale en utilisant un milieu de croissance témoin – 0,1 % FBS/DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium). On traite ensuite les cellules Daoy qui ont
30 été traitées avec le milieu Shh-CM avec diverses concentrations d'inhibiteurs de la voie de signalisation Hedgehog dans la plage allant d'approximativement 1

μM à 0,1 nM. On laisse incuber les composés d'essai pendant 24 heures à 37 °C sous une atmosphère de CO_2 à 5 %.

On met en œuvre la mesure du transcrit *Gli1* en utilisant le dosage Quantigene 2,0 de *Gli1* comme décrit par le fabricant (Panomics, Inc.). On prépare un tampon de mélange de lyse dilué (DLM), qui englobe la Proteinase K. Après une incubation pendant 24 heures avec le composé, on lave les cellules une fois avec du PBS et on ajoute 180 μL de DLM aux cellules. La plaque cellulaire contenant le tampon de lyse est scellée et placée à une température de 55 °C pendant un laps de temps de 30 à 45 minutes. On triture ensuite à cinq reprises les lysats cellulaires résultants. On prépare un jeu de sondes de travail contenant des ondes *Gli1* en diluant les sondes dans le milieu DLM en respectant les indications du fabricant, et on ajoute ensuite 20 μL du jeu de sondes de travail aux plaques de dosage d'ADNr conjointement avec 80 μL des lysats Daoy. On scelle les plaques et on les incube pendant une nuit à 55 °C. On traite ensuite les plaques d'ADNr en respectant les indications du fabricant. On quantifie le signal en lisant les plaques sur un lecteur Perkin Elmer Envision qui détecte la luminescence. Le signal luminescent est directement proportionnel à la quantité de transcrit cible présent dans l'échantillon.

On utilise les données des signaux luminescents que l'on obtient dans le dosage fonctionnel pour calculer la valeur CI_{50} pour le dosage *in vitro*. On calcule les données en se basant sur la valeur témoin maximale (cellules Daoy traitées avec Shh-CM) et la valeur témoin minimale (cellules Daoy traitées avec Shh-CM et une concentration inhibitrice d'un composé témoin, 1 μM de N-(3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-4-chlorophényl)-3,5-diméthoxybenzamide). On utilise un ajustement de courbe logistique à quatre paramètres pour générer les valeurs CI_{50} en utilisant le programme logiciel ActivityBase version 5.3, équation 205 (*Assay Guidance Manual Version 5,0, 2008*, Eli Lilly and Company and NIH Chemical Genomics Center).

Conformément au protocole décrit, les composés de l'invention illustrés en l'occurrence affichent une valeur CI_{50} de < 40 nM. Par exemple, le composé de l'Exemple 1a possède une valeur CI_{50} d'approximativement 2,4 nM avec une

erreur-type de 0,5 (n=7, calculé comme moyenne géométrique et erreur-type géométrique) dans le dosage qui a été décrit ci-dessus. Ces résultats apportent la preuve que les composés de la présente invention sont des antagonistes de la voie de signalisation Hedgehog et, comme tels, représentent des agents anticancéreux utiles.

Dosage d'inhibition de CYP3A4

On prépare des échantillons d'incubation par addition d'une préparation microsomiale de foie humain à l'inhibiteur d'essai (concentrations finales = 0,05 mg/mL de protéine, 10 µM d'inhibiteur dans 100 mM de NaPO₄, tampon de pH 7,4) et on mélange. On soumet les échantillons à une incubation préalable pendant approximativement 5 minutes à 37 °C. Après le laps de temps d'incubation préalable, on déclenche la réaction avec l'addition d'une solution contenant du NADPH et du midazolam, à titre de substrat enzymatique, (concentration finale = 1 mM de NADPH, 5 µM de midazolam). Après l'addition de la solution de NADPH, on incube les échantillons pendant 3 min à approximativement 37 °C. Après la période d'incubation, on arrête la réaction par addition de 50 µL de méthanol (et d'une norme interne pour la chromatographie) et on mélange convenablement les échantillons. Après arrêt de la réaction, on centrifuge le mélange à approximativement 4000 tours/minute pendant 15 minutes à approximativement 5 °C et on procède à une analyse via analyse LC/MS.

On analyse les échantillons en utilisant HPLC/MS avec une élution à gradient sur de courtes colonnes conventionnelles en C18, (phase mobile de charge - 95/5 Milli-Q H₂O/méthanol (v/v) avec l'acide acétique à 1 %. Phase mobile B - 80/20 Milli-Q H₂O/méthanol (v/v) avec de l'acide acétique à 1 %. Phase mobile C - 5/95 Milli-Q H₂O/méthanol (v/v) avec de l'acide acétique à 1 %. Phase mobile de rinçage - 75/25 Milli-Q H₂O/acétonitrile (v/v).

On injecte les échantillons dans un Mass Spectral Analyzer pour la Selected Ion Monitoring (SIM) à une masse de 342,1 (1-OH-midazolam) et de 346,1 (α-hydroxymidazolam-d₄, norme interne) en utilisant un Turbolon Spray

dans des conditions positives. On rapporte les données sous la forme d'un pourcentage d'inhibition de la formation du 1-OH-midazolam en présence d'une concentration d'inhibiteur de 10 μM .

En suivant le protocole décrit, l'Exemple 1a affiche une inhibition de 13,5
5 % de CYP3A4. Des composés tels que l'Exemple 1a, qui manifestent un faible potentiel d'inhibition réversible de CYP3A4 possèdent une vraisemblance réduite quant à des interactions négatives avec d'autres médicaments qui pourraient donner lieu à des changements de posologies médicamenteuses ou à une nécessité d'arrêter la médication dans un patient. Ainsi, lesdits composés
10 sont souhaitables et possèdent des profils de sécurité perfectionnés.

Inhibition in vitro de CYP3A basée sur le mécanisme

On évalue le composé de l'Exemple 1a à titre d'inhibiteur, basé sur le mécanisme, de CYP3A dans le but d'obtenir des constantes cinétiques k_{inact} et
15 K_i pour cette interaction. (K_{inact} représente la constante de vitesse maximale de la formation du complexe enzymatique inactif. K_i représente la concentration que l'on obtient pour une inactivation à demi-maximale). On incube le composé avec des microsomes de foie humain (pool de microsomes de foie humain possédant une expression élevée de l'activité de CYP3A4) dans une incubation
20 *in vitro* en deux étapes : une réaction d'inactivation qui permet à l'inhibiteur d'inactiver l'enzyme et un dosage d'activité qui évalue l'activité restante de la protéine microsomiale en utilisant une 1'-hydroxylation du midazolam comme sonde.

On incube au préalable pendant 3 minutes à 37 °C en triple des
25 mélanges réactionnels d'inactivation (100 μL de volume final) contenant un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH 7,4), du EDTA 1 mM (acide éthylènediaminetétracétique), en l'absence ou en présence de NADPH 1 mM (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, réduit), les concentrations se situant dans la plage de 0,75 μM à 24 μM du composé d'essai. On déclenche
30 les réactions d'inactivation avec l'addition du pool microsomial présentant une activité CYP3A élevée (CellzDirect, Austin TX, 0,5 mg/mL). À plusieurs reprises

(après 0, 2,5, 5, 10 et 30 minutes), on prélève des quantités aliquotes de 5 µL des mélanges de réaction d'inactivation et on les soumet à une dilution 1/20 dans un système d'incubation préchauffé (37 °C) pour le dosage de l'activité CYP3A4 (95 µL) contenant 1 mM de NADPH et du midazolam (100 µM). On incube ce mélange de dosage d'activité, à une concentration protéique finale de 0,025 mg/mL et à une dilution 1/20 de la concentration de l'inhibiteur, à 37 °C pendant une minute supplémentaire avant d'arrêter la réaction par l'addition de 50 µL de MeOH. On mélange les échantillons et on élimine la protéine dénaturée par centrifugation à 4000 tours/minute pendant 10 minutes.

On analyse la formation du 1'-OH midazolame par LC/MS/MS avec une élution à gradient sur une colonne Phénomenex Synergi 4µ Hydro-RP (phase mobile A - 95/5 Milli-Q® H₂O/méthanol (v/v) avec 5 mM d'acétate d'ammonium, phase mobile B - 5/95 Milli-Q® H₂O/méthanol (v/v) avec 5 mM d'acétate d'ammonium, solvant Needle Wash A – acide trifluoroacétique à 0,4 % dans 90/10 acétonitrile/Milli-Q® H₂O (v/v), Solvant Needle Wash B – 50/50 Milli-Q® H₂O/méthanol (v/v)). On introduit les échantillons par injection dans un Sciex API 4000 pour une surveillance réactionnelle sélectionnée à une masse de 342,0 (1-OH-midazolam) et de 347,0 (α-hydroxymidazolam-d3, norme interne) en utilisant Turbolon Spray dans des conditions positives.

On rapporte sur un graphique la perte de la formation du 1'-OH midazolame (activité CYP3A4) dans les incubations microsomiales sous la forme de l'activité restante CYP3A4 en log % en fonction du temps de préincubation pour chaque concentration du composé d'essai. On détermine les paramètres cinétiques pour l'inactivation en utilisant le programme WinNonlin Professional pour adapter les équations suivantes aux données :

$$\text{Equation 1 : \% d'inhibition}(t) = 100(t=0) * e(-\lambda t)$$

où λ est défini comme

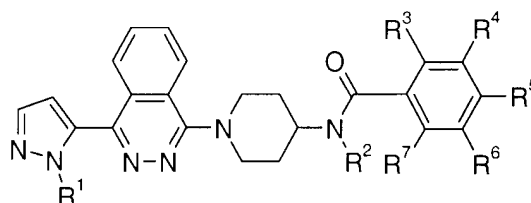
$$\text{Equation 2 : } \lambda = (k_{\text{inact}} * I)/(K_I + I)$$

La perte d'activité pour le composé de l'Exemple 1a, se situe dans la plage de 11 % - 22 % et ne dépend pas de la concentration. Par conséquent, on ne peut pas déterminer les valeurs pour k_{inact} et K_I à partir de l'équation 2. En se basant

sur ces données, le composé de l'Exemple 1a ne représente pas un inhibiteur de CYP3A4 basé sur le mécanisme. Des composés, tels que l'Exemple 1a, qui démontre un potentiel d'inhibition de CYP3A4 faible ou irréversible non basée sur le mécanisme possède une vraisemblance réduite pour des interactions négatives avec d'autres médications qui pourraient donner lieu à des changements de posologies médicamenteuses ou à la nécessité d'arrêter la médication dans un patient. Ainsi, lesdits composés sont souhaitables et possèdent des profils de sécurité perfectionnés.

REVENDICATIONS

1. Composé répondant à la formule



5 dans laquelle :

R¹ représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle ;

R² représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle ; et

R³, R⁴, R⁵, R⁶ ou R⁷ représentent, de manière indépendante, un atome d'hydrogène, un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe cyano, un groupe trifluorométhyle, un groupe trifluorométhoxy, un groupe difluorométhoxy, un groupe méthylsulfonyl ou un groupe trifluorométhylsulfonyl à condition qu'au moins trois des radicaux R³, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ représentent un atome d'hydrogène ; ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

15 2. Composé selon la revendication 1, dans lequel R¹ représente un groupe méthyle, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel R² représente un groupe méthyle, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

20

4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel R³, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ représentent, de manière indépendante, un atome d'hydrogène, un atome de fluor, un atome de chlore, un groupe trifluorométhyle ou un groupe méthylsulfonyl, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

25

5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel R³, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ représentent, de manière indépendante, un atome

d'hydrogène, un atome de fluor ou un groupe trifluorométhyle, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

5 6. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel R⁴, R⁶ et R⁷ représentent un atome d'hydrogène, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

10 7. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à savoir le 4-fluoro-*N*-méthyl-*N*-(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

15 8. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, à savoir le chlorhydrate de 4-fluoro-*N*-méthyl-*N*-(1-(4-(1-méthyl-1*H*-pyrazol-5-yl)phthalazin-1-yl)pipéridin-4-yl)-2-(trifluorométhyl)benzamide.

20 9. Composition pharmaceutique comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, en combinaison avec un support, un diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser en thérapie.

25 11. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser dans le traitement du cancer.

30