MÉTODO PARA PREPARAR DERIVADOS DE ÁCIDO 3-(2-ANILINO-1-CICLOHEXIL-1H-BENCIMIDAZOL-5-IL)PROPANOICO SUSTITUIDO

La presente invención se relaciona con métodos para preparar derivados de ácido 3-(2-anilino-1-ciclohexil-1H-bencimidazol-5-il)propanoico sustituido y también intermediarios que pueden usarse para preparar derivados de ácido 3-(2-anilino-1-ciclohexil-1H-bencimidazol-5-il)propanoico sustituido. La presente invención también se relaciona con una forma cristalina del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico, composiciones farmacéuticas que comprenden esta forma cristalina, y también el uso de esta forma cristalina para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

Introducción

El ácido 3-(2-anilino-1-ciclohexil-1H-bencimidazol-5-il)propanoico se divulga en la memoria descriptiva publicada WO2015/121210(A1) como un inhibidor de la isocitrato deshidrogenasa mutada IDH1 R132H.

La IDH1 R132H está involucrada en diversos procesos celulares tales como el ciclo del citrato, metabolismo lipídico, procesos de reparación tales como la metilación de histonas y la metilación del ADN

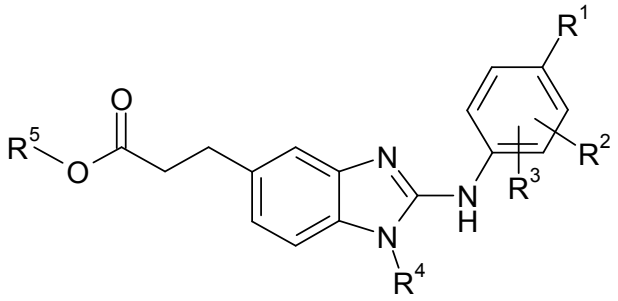
(Prensner, J.R., and Chinnaiyan, A.M.: Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer, Nature Medicine 2011, 17, 291-293). La inhibición de la mutación IDH1 representa una terapia promisoria en el tratamiento de tumores.

En WO2010/151441(A1) se describe a 4-(1-ciclopentil-1H-benzo[d]imidazol-2-ilamino)-N-hidroxibenzamida y un método para preparar este compuesto.

A partir de este estado del arte previo, el objetivo consistió en proveer un método para preparar ácido 3-(2-anilino-1-ciclohexil-1H-bencimidazol-5-il)propanoico, mediante el cual puede obtenerse el ácido 3-(2-anilino-1-ciclohexil-1H-bencimidazol-5-il)propanoico en alto rendimiento y alta pureza y el cual puede usarse como un proceso de producción industrial.

Descripción de la invención

La presente invención se relaciona con un método para preparar un compuesto de la fórmula general (I):



(I)

en la cual

R^1 representa un átomo de hidrógeno o R^1 representa un grupo que se selecciona de las series de alquil C_1-C_3, alcoxi C_1-C_3, haloalquil C_1-C_3 y haloalcoxi C_1-C_3,

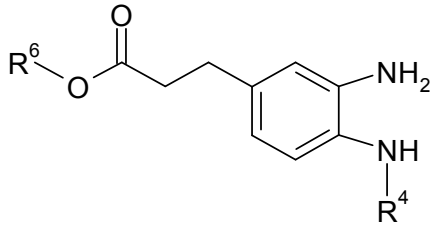
R^2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_3,

R^3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_3,

R^4 representa un grupo ciclohexilo, el cual está sustituido opcionalmente de manera simple o múltiple por un grupo alquilo C_1-C_3, y

R^5 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6;

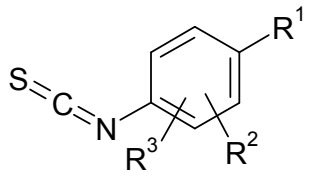
en donde el método comprende un paso en el cual un compuesto de la fórmula general (II):



(II)

en la cual R^4 tiene la misma definición que para el compuesto de fórmula (I) y R^6 representa un grupo alquilo C_1-C_6, o una sal o un solvato o un solvato de una sal del compuesto de la fórmula general (II);

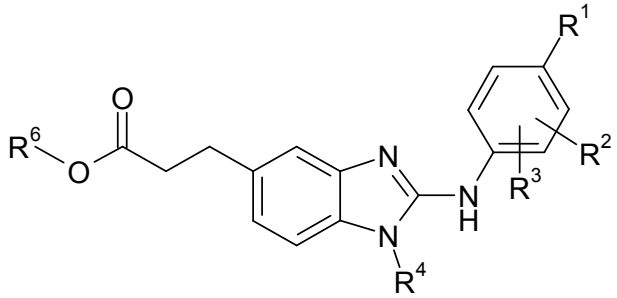
se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula general (III):



(III)

en la cual R^1, R^2 y R^3 tienen el mismo significado que para el compuesto de la fórmula (I);

y en esta reacción se forma un compuesto de la fórmula general (IV):



(IV)

en la cual R^1, R^2, R^3 y R^4 tienen el mismo significado que para el compuesto de la fórmula (I) y R^6 tiene la misma definición que para el compuesto de la fórmula (II).

El término "sustituido" se refiere a que uno o más hidrógenos en el átomo designado o el grupo designado ha/han sido reemplazado/s por una selección del grupo especificado, con la condición de que la valencia normal del átomo designado no se excede bajo las

circunstancias en cuestión. Se permiten combinaciones de sustituyentes y/o variables.

El término "átomo de halógeno" se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente un átomo de flúor, cloro o bromo.

El término "alquilo C_1-C_6" se refiere a un grupo hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada saturado que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono, por ejemplo un grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, 2-metilbutilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, neopentilo, 1,1-dimetilpropilo, hexilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo o 1,3-dimetilbutilo o un isómero del mismo. El grupo preferentemente tiene 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono ("alquilo C_1-C_4"), por ejemplo un grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo o terc-butilo, en especial preferentemente 1, 2 o 3 átomos de carbono ("alquilo C_1-C_3"), por ejemplo un grupo metilo, etilo, *n*-propilo o isopropilo.

El término "haloalquilo C_1-C_3" se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado monovalente de cadena

lineal o ramificada, en el cual el término "alquilo C_1-C_3" es como se definió precedentemente, y en el cual uno o más de los átomos de hidrógeno han sido reemplazados por los mismos o diferentes átomos de halógeno. El átomo de halógeno preferentemente es flúor. El grupo haloalquilo C_1-C_3 es, por ejemplo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 2-fluoroetilo, 2,2-difluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, pentafluoroetilo, 3,3,3-trifluoropropilo o 1,3-difluoropropan-2-ilo.

El término "alcoxi C_1-C_3" se refiere a un grupo saturado monovalente de cadena lineal o ramificada de la fórmula (alquil C_1-C_3)-O-, en el cual el término "alquilo C_1-C_3" es como se definió precedentemente, por ejemplo un grupo metoxilo, etoxi, n-propoxi o isopropoxi.

El término "haloalcoxi C_1-C_3" se refiere a un grupo alcoxi C_1-C_3 saturado monovalente de cadena lineal o ramificada, como se definió precedentemente, en el cual uno o más de los átomos de hidrógeno han sido reemplazados por el mismo o diferentes átomos de halógeno. El átomo de halógeno en particular es flúor. El grupo haloalcoxi C_1-C_3 es, por ejemplo, fluorometoxi, difluorometoxi, trifluorometoxi, 2,2,2-trifluoroetoxi o pentafluoroetoxi.

El término "C_1-C_3", como se usa en este texto, por ejemplo en el contexto de la definición de "alquilo C_1-C_3", "haloalquilo C_1-C_3", "alcoxi C_1-C_3" o "haloalcoxi C_1-C_3", se refiere a un grupo alquilo que tiene un número de átomos de carbono limitado a 1 a 3, es decir 1, 2 o 3 átomos de carbono.

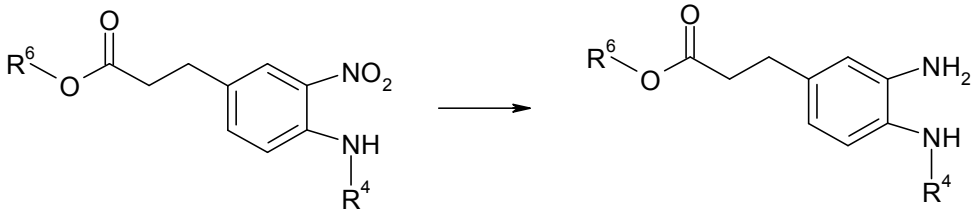
Si se menciona un rango de valores, este incluye cada valor individual y subrangos en el rango. Por ejemplo, "C_1-C_6" abarca C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_1-C_6, C_1-C_5, C_1-C_4, C_1-C_3, C_1-C_2, C_2-C_6, C_2-C_5, C_2-C_4, C_2-C_3, C_3-C_6, C_3-C_5, C_3-C_4, C_4-C_6, C_4-C_5 y C_5-C_6.

Por ejemplo, el término " grupo saliente", como se usa en la presente, se refiere a un átomo o a un grupo de átomos que es/son desplazados, junto con los electrones de unión, como especies estables en una reacción química. Un grupo saliente preferentemente se selecciona del grupo que comprende: haluro, particularmente fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro, (metilsulfonil)oxi, [(trifluorometil)sulfonil]oxi, [(nonafluorobutil)sulfonil]oxi, (fenilsulfonil)oxi, [(4-metilfenil)sulfonil]oxi, [(4-bromofenil)sulfonil]oxi, [(4-nitrofenil)sulfonil]oxi, [(2-nitrofenil)sulfonil]oxi, [(4-isopropilfenil)sulfonil]oxi, [(2,4,6-triisopropilfenil)sulfonil]oxi, [(2,4,6-

trimetilfenil)sulfonil]oxi, [(4-*terc*-butilfenil)sulfonil]oxi y [(4-metoxifenil)sulfonil]oxi.

La reacción de un compuesto de la fórmula (II) con un compuesto de la fórmula (III) para dar un compuesto de la fórmula (IV) preferentemente se lleva a cabo en un solvente tal como tetrahidrofurano (THF) a una temperatura entre 40°C y 60°C usando un reactivo de acoplamiento tal como clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCl).

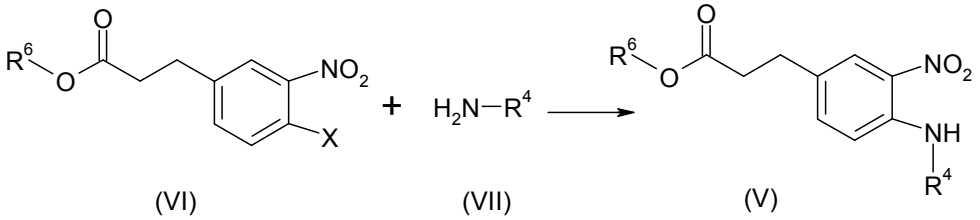
Los compuestos de la fórmula (II) también pueden obtenerse por reducción de los compuestos nitro de la fórmula (V):



(V) (IV)

La reducción puede llevarse a cabo a modo de ejemplo con hidrógeno gaseoso usando un catalizador tal como paladio sobre un soporte de carbono (Pd/C) en un solvente adecuado tal como tetrahidrofurano (THF) a una temperatura en el rango entre 10°C y 60°C.

Los compuestos nitro de la fórmula (V) pueden obtenerse, por ejemplo, en una reacción de sustitución aromática nucleofílica de acuerdo con el esquema de reacción a continuación:

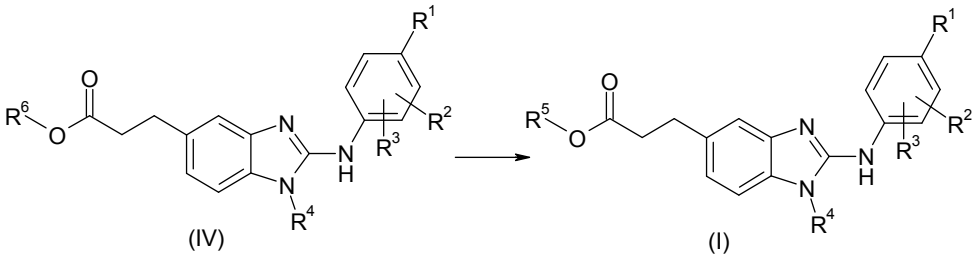


Aquí, X es un grupo saliente adecuado, preferentemente un átomo de flúor.

La sustitución aromática nucleofílica puede llevarse a cabo bajo condiciones de reflujo (aproximadamente a 80°C) usando una base adecuada tal como carbonato de potasio (K_2CO_3) en un solvente adecuado tal como acetonitrilo.

Los compuestos de las fórmulas (III), (VI) y (VII) se encuentran fácilmente disponibles comercialmente o pueden generarse a partir de compuestos conocidos mediante métodos conocidos.

Los compuestos ácidos de la fórmula (I) pueden prepararse a partir de compuestos de la fórmula (IV) por saponificación del éster carboxílico de acuerdo con el esquema a continuación:



en donde R^5 representa un átomo de hidrógeno.

La saponificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de una base tal como hidróxido de sodio (NaOH) en un solvente adecuado tal como

tetrahidrofurano (THF) a una temperatura entre 20°C y 60°C.

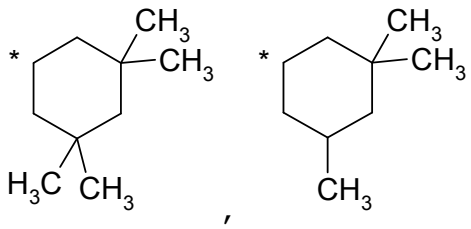
En una forma de realización preferida, R^2 es un átomo de hidrógeno, R^3 es un átomo de hidrógeno, mientras que R^1 representa un grupo que se selecciona de la serie de alquil C_1-C_3-, alcoxi C_1-C_3-, haloalquil C_1-C_3- y haloalcoxi C_1-C_3-.

En una forma de realización particularmente preferida, R^2 es un átomo de hidrógeno, R^3 es un átomo de hidrógeno, mientras que R^1 representa un grupo que se selecciona de la serie de metilo, metoxi, trifluorometilo y trifluorometoxi.

En una forma de realización preferida en especial, R^2 es un átomo de hidrógeno, R^3 es un átomo de hidrógeno y R^1 es un grupo trifluorometoxi.

En una forma de realización preferida adicional, R^4 representa un grupo ciclohexilo que está opcionalmente mono, di, tri o tetrasustituido con un grupo metilo.

En una forma de realización particularmente preferida, R^4 se selecciona de la serie de:



,

en donde * indica la posición en donde el grupo R^4 está unido al resto de la molécula.

En una forma de realización preferida adicional, R^5 representa un átomo de hidrógeno o grupo metilo.

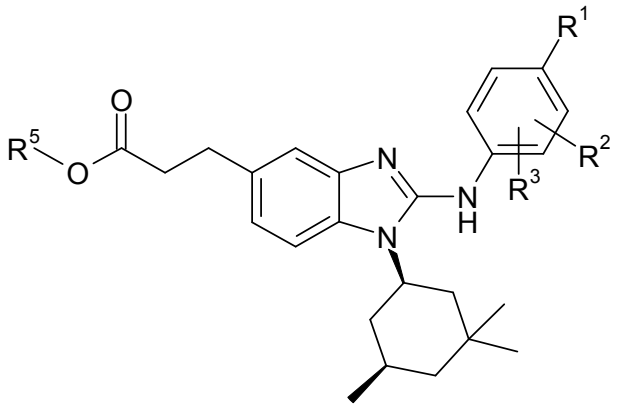
En una forma de realización particularmente preferida, R^5 representa un átomo de hidrógeno.

En una forma de realización preferida adicional, R^6 representa un grupo metilo, etilo, *iso*propilo o *terc*-butilo.

En una forma de realización particularmente preferida, R^6 representa un grupo metilo o etilo.

En una forma de realización particularmente preferida, R^6 representa un grupo metilo.

En una forma de realización particularmente preferida adicional, el método de acuerdo con la invención es útil para preparar un compuesto de la fórmula (Ia):



(Ia)

en la cual

R^1 representa un átomo de hidrógeno o R^1 representa un grupo que se selecciona de la serie

de alquil C_1-C_3-, alcoxi C_1-C_3-, haloalquil C_1-C_3- y haloalcoxi C_1-C_3-,

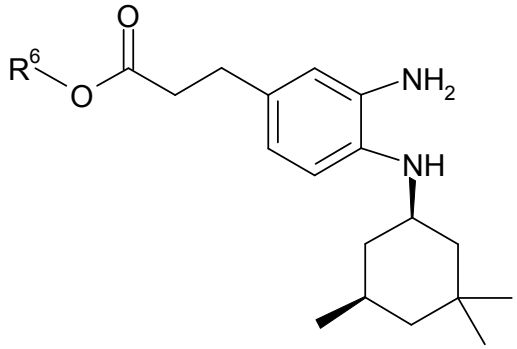
R^2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_3,

R^3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_3,

R^4 representa un grupo ciclohexilo, el cual está sustituido opcionalmente de manera simple o múltiple por un grupo alquilo C_1-C_3, y

R^5 representa un grupo alquilo C_1-C_3,

en donde el método comprende un paso en el cual un compuesto de la fórmula general (IIa):

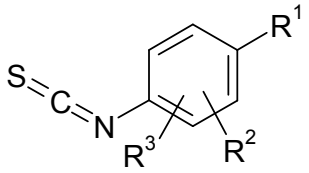


(IIa)

en la cual R^6 representa un grupo alquilo C_1-C_6;

o una sal o un solvato o un solvato de una sal del compuesto de la fórmula general (IIa),

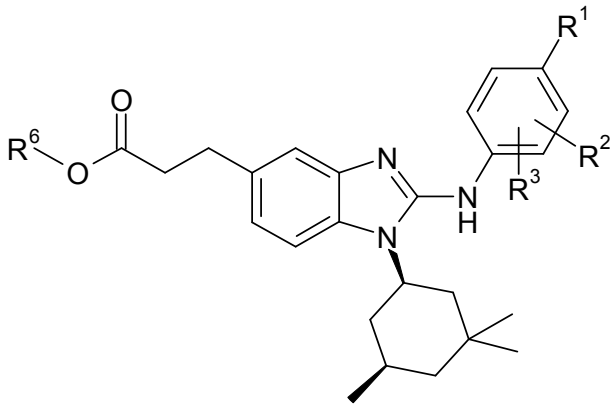
se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula general (III):



(III)

en la cual R^1, R^2 y R^3 tienen el mismo significado que para el compuesto de la fórmula (Ia);

y en esta reacción se forma un compuesto de la fórmula general (IVa):

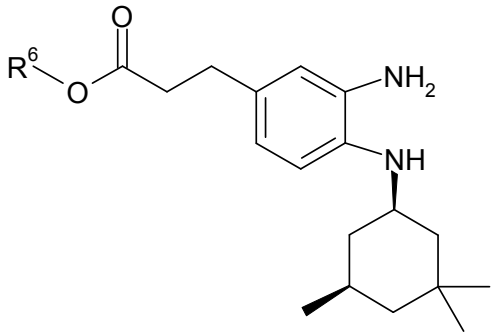


(IVa)

en la cual R^1, R^2 y R^3 tienen el mismo significado que para el compuesto de la fórmula (Ia) y R^6 tiene la misma definición que para el compuesto de la fórmula (IIa).

En una forma de realización preferida en especial, el método de acuerdo con la invención es útil para preparar ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico, en donde el método comprende un paso en

el cual un éster de alquilo de ácido 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoico de la fórmula (IIa)

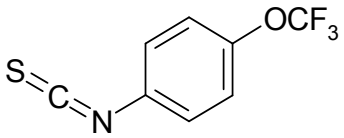


(IIa)

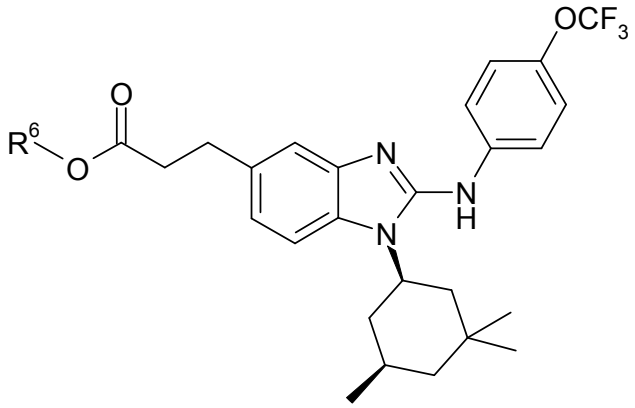
en la cual R^6 representa un grupo alquilo C_1-C_6;

o una sal o un solvato o un solvato de una sal del compuesto de la fórmula (IIa),

se hace reaccionar con éter 4-isotiocianatofeniltrifluorometílico,



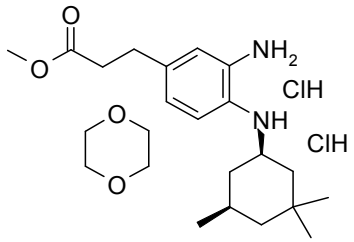
y en esta reacción se forma un éster de alquilo del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico de la fórmula (IVa):



(IVa)

en la cual R^6 tiene la misma definición que para el compuesto de la fórmula (IIa).

En una forma de realización preferida adicional, el compuesto de la fórmula (IIa) usado es el solvato de dioxano del clorhidrato de 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo:



Este aducto, que consiste en cada caso en una molécula de 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo, una molécula de dioxano y dos moléculas de ácido clorhídrico, es producto del tratamiento de 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo

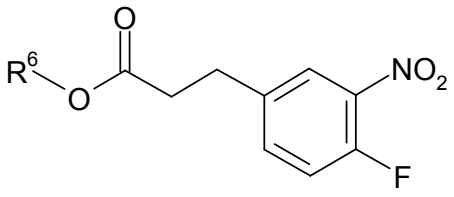
disuelto en THF con dioxano y ácido clorhídrico por ejemplo.

Se puede purificar fácilmente y separar de los subproductos y de los compuestos de partida que se producen en la reducción de 3-(3-nitro-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo a 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo.

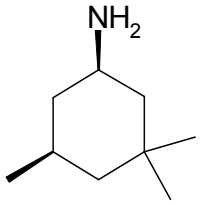
La presente invención por lo tanto además se relaciona con 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo – clorhidrato de 1,4-dioxano (1:1:2).

La presente invención por lo tanto además provee un método para preparar ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico a partir de los materiales de partida

éster de alquilo del ácido 3-(4-fluoro-3-nitrofenil)propanoico:

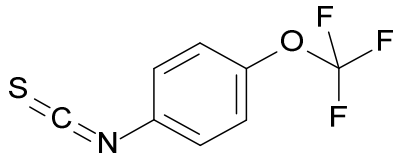


(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexanamina:



y

4-isotiocianatofeniltrifluorometil éter:



en donde R^6 representa un grupo alquilo C_1-C_6.

El método de acuerdo con la invención para preparar ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico preferentemente comprende los siguientes pasos:

(a) hacer reaccionar un éster de alquilo del ácido 3-(4-fluoro-3-nitrofenil)propanoico con (1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexanamina para dar un éster de alquilo del ácido 3-(3-nitro-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoico.

(b) reducir el éster de alquilo del ácido 3-(3-nitro-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoico del paso (a) para dar un éster de alquilo del ácido 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoico.

(c) hacer reaccionar el éster de alquilo del ácido 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoico del paso (b) con 4-isotiocianatofeniltrifluorometil éter para dar un éster de alquilo del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico

(d) saponificar el éster de alquilo del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico del paso (c) para dar ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico.

En una forma de realización preferida, el producto del paso (a) se provee al paso (b) sin purificación.

En una forma de realización preferida adicional, el éster de alquilo del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico del paso (a) se trata con una mezcla de ácido clorhídrico/dioxano con el objetivo de obtener un éster de alquilo del ácido 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoico – clorhidrato

de 1,4-dioxano (1:1:2), que luego se provee al paso (c).

En una forma de realización preferida adicional, el producto del paso (c) se provee al paso (d) sin purificación.

En una forma de realización preferida adicional, la saponificación en el paso (d) se efectúa mediante una solución acuosa de hidróxido de sodio en THF; luego se realiza la neutralización con ácido clorhídrico y se cristaliza el ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico por agregado de *iso*propanol.

La presente invención además provee ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico en forma cristalina que se obtiene por tratamiento del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico disuelto en THF con *iso*propanol (también referido más adelante simplemente como "la forma cristalina").

La forma cristalina, que se forma por tratamiento del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico disuelto en THF con isopropanol, puede

purificarse más simple y eficazmente que la forma amorfa que se produce en el método descrito en WO2015/121210(A1). Tienen un perfil farmacológico y/o farmacocinético mejorado en comparación con la forma amorfa.

En la Figura 1 se muestra el difractograma de rayos X de la forma cristalina.

La presente invención además se relaciona con una forma cristalina del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico, que se caracteriza por máximos en el difractograma de rayos X a los siguientes ángulos 2 theta: 6,5, 8,5, 11,2, 11,3, 11,9, 12,1, 13,4, 14,3, 14,8, 15,0, 15,1, 15,2, 15,3, 15,9, 16,4, 17,1, 17,4, 17,6, 18,0, 18,2, 19,1, 19,1, 19,6, 19,9, 20,1, 20,2, 20,8, 21,1, 21,6, 21,8, 22,4, 22,6, 22,9, 23,2, 23,4, 24,0, 24,3, 24,3, 24,7, 24,9.

La presente invención además provee un medicamento que comprende ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico en la forma cristalina especificada.

La forma cristalina es adecuada para usar como medicamentos para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades en humanos y animales.

La eficacia farmacéutica de la forma cristalina como inhibidor de IDH1 R132H puede explicarse por el efecto del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico presente.

La presente invención además se relaciona con el uso de la forma cristalina para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, en especial para el tratamiento de tumores.

La presente invención además provee la forma cristalina para usar en un método para el tratamiento y/o profilaxis de tumores.

La presente invención además se relaciona con el uso de la forma cristalina para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, en especial para el tratamiento de tumores.

La presente invención además provee un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, en especial para el tratamiento de tumores, usando una cantidad farmacéuticamente eficaz de la forma cristalina.

Los tumores sólidos que se pueden tratar de acuerdo con la invención son, por ejemplo, tumores de mama, de tracto respiratorio, de cerebro, de los órganos reproductivos, de tracto gastrointestinal, de

tracto urogenital, de ojo, de hígado, de piel, de cabeza y cuello, de glándula tiroides, de glándula paratiroides, de hueso, y de tejido conectivo y metástasis de estos tumores.

Los tumores hematológicos que se pueden tratar son, por ejemplo,

- mielomas múltiples,
- linfomas o
- leucemias.

Los tumores de mama que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas de mama con estado positivo para receptor hormonal
- carcinomas de mama con estado negativo para receptor hormonal
- carcinomas de mama positivos para Her-2
- carcinomas de mama negativos para receptor hormonal y Her-2
- carcinomas de mama asociados con BRCA
- carcinomas de mama inflamatorios.

Los tumores del tracto respiratorio que se pueden tratar son, por ejemplo,

- carcinomas bronquiales de células no pequeñas tales como, por ejemplo, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y

- carcinomas bronquiales de células pequeñas.

Los tumores del cerebro que se pueden tratar son, por ejemplo,

- gliomas,
- glioblastomas,
- astrocitomas,
- meningiomas y
- meduloblastomas.

Los tumores de los órganos reproductivos masculinos que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas de próstata,
- tumores epididimales malignos
- tumores testiculares malignos y
- carcinomas de pene.

Los tumores de los órganos reproductivos femeninos que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas endometriales
- carcinomas de cérvix
- carcinomas de ovario
- carcinomas vaginales
- carcinomas vulvares

Los tumores del tracto gastrointestinal que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas colorrectales
- carcinomas anales
- carcinomas de estómago

- carcinomas de páncreas
- carcinomas esofágicos
- carcinomas de vesícula biliar
- carcinomas del intestino delgado
- carcinomas de glándulas salivales
- tumores neuroendocrinos
- tumores de estroma gastrointestinal

Los tumores del tracto urogenital que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas de vejiga urinaria
- carcinomas de células renales
- carcinomas de la pelvis renal y del tracto urinario inferior

Los tumores del ojo que se pueden tratar son, por ejemplo:

- retinoblastomas
- melanomas intraoculares

Los tumores del hígado que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas hepatocelulares
- carcinomas colangiocelulares

Los tumores de la piel que se pueden tratar son, por ejemplo:

- melanomas malignos
- basaliomas
- espinaliomas

- sarcomas de Kaposi
- carcinomas de células de Merkel

Los tumores de la cabeza y cuello que se pueden tratar son, por ejemplo:

- carcinomas de laringe
- carcinomas de la faringe y de la cavidad oral
- carcinomas de las estructuras de la línea media (por ejemplo NMC, C.A. French, Annu. Rev. Pathol. 2012, 7:247-265)

Los sarcomas que se pueden tratar son, por ejemplo:

- sarcomas de tejido blando
- osteosarcomas

Los linfomas que se pueden tratar son, por ejemplo:

- linfomas no Hodgkin
- linfomas de Hodgkin
- linfomas cutáneos
- linfomas del sistema nervioso central
- linfomas asociados a SIDA

Las leucemias que se pueden tratar son, por ejemplo:

- leucemias mieloides agudas
- leucemias mieloides crónicas
- leucemias linfáticas agudas
- leucemias linfáticas crónicas

- tricoleucemias

La forma cristalina puede actuar sistémicamente y localmente. Para este propósito, puede administrarse de una forma adecuada, por ejemplo por ruta oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, dérmica, transdérmica, conjuntival u ótica, o como implante o dispositivo intraluminal.

La forma cristalina puede administrarse en formas de administración adecuadas para estas rutas de administración.

Las formas de administración adecuadas para administración oral son las que funcionan de acuerdo con el estado de la técnica, que pueden liberar la forma cristalina rápidamente y en forma modificada, por ejemplo comprimidos (comprimidos no recubiertos o recubiertos, por ejemplo con recubrimientos resistentes a los jugos gástricos o de disolución retardada o insolubles los cuales controlan la liberación de la forma cristalina), comprimidos o películas/obleas que se desintegran rápidamente en la cavidad oral, películas/liofilizados, cápsulas (por ejemplo cápsulas de gelatina dura o blanda), comprimidos recubiertos de azúcares, gránulos, pellets, polvos, emulsiones, suspensiones o aerosoles.

La administración parenteral se puede llevar a cabo evitando un paso de resorción (por ejemplo por una

ruta intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbar) o con la inclusión de una resorción (por ejemplo por una ruta intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para administración parenteral incluyen preparaciones para inyección e infusión en la forma de suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Las formas de administración adecuadas para las otras rutas de administración son, por ejemplo, formas farmacéuticas para inhalación (incluyendo inhaladores en polvo, nebulizadores), gotas nasales o atomizadores; comprimidos para administración lingual, sublingual o bucal, películas/obleas o cápsulas, supositorios, preparaciones para los oídos o los ojos, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mezclas para agitar), suspensiones lipofílicas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (por ejemplo parches), leche, pastas, espumas, polvos para espolvorear, implantes o dispositivos intraluminales.

La forma cristalina se puede convertir en las formas de administración mencionadas. Esto se puede llevar a cabo de una forma conocida *per se* por mezclado con auxiliares inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados. Estos auxiliares incluyen portadores (por

ejemplo celulosa microcristalina, lactosa, manitol), agentes emulsionantes y dispersantes o humectantes (por ejemplo dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitán), aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona), polímeros naturales y sintéticos (por ejemplo albúmina), estabilizantes (por ejemplo antioxidantes, por ejemplo ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo pigmentos inorgánicos, por ejemplo óxidos de hierro) y correctores de sabor y/u olor.

La presente invención además provee medicamentos que comprenden la forma cristalina, típicamente junto con uno o más auxiliares inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados, y el uso de los mismos para los propósitos que se mencionaron previamente.

Se formulan preparaciones farmacéuticas en una forma conocida *per se*, mediante la conversión del o de los compuestos activos a la forma de administración deseada con los excipientes convencionales en la formulación farmacéutica.

Los excipientes que se usan pueden ser, por ejemplo, sustancias portadoras, rellenos, desintegrantes, aglutinantes, humectantes, fluidizantes, absorbentes y adsorbentes, diluyentes, cosolventes, emulsionantes, correctores de sabor, colorantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, sales para modificar la presión osmótica o

soluciones amortiguadoras. Uno debe referirse a Remington´s Pharmaceutical Science, 15° ed. Mack Publishing Company, East Pennsylvania (1980).

Las formulaciones farmacéuticas pueden estar presentes

en forma sólida, por ejemplo como comprimidos, comprimidos recubiertos con azúcares, píldoras, supositorios, cápsulas, sistemas transdérmicos o

en forma semisólida, por ejemplo como ungüentos, cremas, geles, supositorios, emulsiones o

en forma líquida, por ejemplo como tinturas, suspensiones o emulsiones.

Los auxiliares, en el contexto de la invención, pueden ser, por ejemplo, sales, sacáridos (mono, di, tri, oligo y/o polisacáridos), proteínas, aminoácidos, péptidos, grasas, ceras, aceites, hidrocarburos y derivados de los mismos, y los auxiliares pueden ser de origen natural o bien se pueden obtener por medios sintéticos o parcialmente sintéticos.

Las formas útiles para administración oral o peroral son en especial los comprimidos, comprimidos recubiertos con azúcares, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, pastillas, suspensiones o emulsiones.

Las formas útiles para administración parenteral son en especial las suspensiones y emulsiones.

La forma cristalina se puede usar sola o, si se lo requiere, en combinación con una o más de otras sustancias farmacológicamente activas, con la condición de que esta combinación no lleve a efectos no deseados e inaceptables. La presente invención por lo tanto además provee medicamentos que comprenden la forma cristalina y uno o más compuestos activos adicionales, en especial para la profilaxis y/o tratamiento de los trastornos que se mencionaron previamente.

Por ejemplo, la forma cristalina se puede combinar con sustancias antihiperproliferativas, citostáticas o citotóxicas conocidas que se usan para el tratamiento de trastornos neoplásicos, pero también se puede combinar al mismo tiempo con aquellas sustancias que tienen una propiedad de soporte o constitutiva, o también puede combinarse con aquellos compuestos que muestran efectos positivos sobre la angiogénesis.

Las sustancias farmacológicamente activas adecuadas que son útiles para una combinación, a título enunciativo no taxativo, incluyen por ejemplo a:

131I-chTNT, abarelix, abiraterona, aclarubicina, aflibercept, aldesleuquina, alemtuzumab, alitretinoína, altretamina, aminoglutetimida, amrubicina, amsacrina, anastrozol, arglabin, trióxido arsénico, asparaginasa, axitinib, azacitidina, basiliximab, belotecan, bendamustina, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida,

bisantreno, bleomicina, bortezomib, bosutinib, brentuximab, buserelina, busulfan, cabazitaxel, cabozantinib-s-malato, folinato de calcio, levofolinato de calcio, capecitabina, carboplatino, carfilzomib, carmofur, carmustina, catumaxomab, celecoxib, celmoleuquina, cediranib, cetuximab, clorambucil, clormadinona, clormetina, cisplatino, cladribina, ácido clodrónico, clofarabina, copanlisib, crisantaspasa, crizotinib, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, darbepoyetina alfa, dasatinib, daunorubicina, debrafenib, decitabina, degarelix, denileuquina diftitox, denosumab, deslorelina, dexrazoxano clorhidrato, cloruro de dibrospidio, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, doxorubicina + estrona, eculizumab, edrecolomab, acetato de eliptinio, eltrombopag, endostatina, enocitabina, enzalutamida, epirubicina, epitiostanol, epoetina alfa, epoetina beta, eptaplatino, eribulina, erlotinib, estradiol, estramustina, etopósido, everolimus, exemestano, fadrozol, filgrastim, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, formestano, fotemustina, fulvestrant, nitrato de galio, ganirelix, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, glucarpidasa, glutoxim, goserelina, histamina diclorhidrato, histrelina, hidroxicarbamida, semillas de I-125, ácido ibandrónico, ibritumomab tiuxetan, ibrutinib,

idarubicina, ifosfamida, imatinib, imiquimod, improsulfan, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, ipilimumab, irinotecan, ixabepilona, lanreotida, lapatinib, lenalidomida, lenograstim, lentinan, letrozol, leuprorelina, leucovorina, levamisol, lisurida, lobaplatino, lomustina, lonidamina, masoprocol, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalan, mepitiostano, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metoxsalen, aminolevulinato de metilo, metiltestosterona, mifamurtide, miltefosina, miriplatino, mitobronitol, mitoguazona, mitolactol, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nedaplatino, nelarabina, nilotinib, nilutamida, nimotuzumab, nimustina, nitracrina, obinutuzumab, ofatumumab, omacetaxina mepesuccinato, omeprazol, oprelvekina, oxaliplatino, ozogamicina, terapia génica para p53, paclitaxel, palifermina, semilla de paladio-103, palonosetron clorhidrato, ácido pamidrónico, pamidronato disódico, panitumumab, pazopanib, pegaspargasa, PEG-epoetina beta (metoxi PEG-epoetina beta), pegfilgrastim, peginterferón alfa-2b, pemetrexed, pentazocina, pentostatina, peplomicina, perfosfamida, pertuzumab, picibanil, pirarubicina, plerixafor, plicamicina, poliglusam, fosfato de poliestradiol, polisacárido-K, pomalidomida, pomatinib, porfímero sódico, pralatrexato, prednimustina,

prednisona, procarbazina, quinagolide, cloruro de radio-223, raloxifeno, raltitrexed, ramucirumab, rasburicasa, ranimustina, razoxano, refametinib, regorafenib, ácido risedrónico, rituximab, romidepsina, romiplostim, roniciclib, ruxolitinib, sargramostim, sipuleucel-T, sizofiran, sobuzoxano, glicididazol sódico, sorafenib, estreptozotocina, sunitinib, talaporfina, talco, tamibaroteno, tamoxifeno, tasonermina, teceleuquina, tegafur, tegafur + gimeracil + oteracil, temoporfina, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, testosterona, tetrofosmina, talidomida, tiotepa, timalfasin, tioguanina, tocilizumab, topotecan, toremifeno, tositumomab, I-131 tositumomab, trametinib, trabectedina, trastuzumab, treosulfan, tretinoína, trilostano, triptorelina, trofosfamida, triptófano, ubenimex, valrubicina, vandetanib, vapreotide, vemurafenib, vinblastina, vincristina, vindesina, vinflunina, vinorelbina, vismodegib, vorinostat, vorozol, microesferas de vidrio con itrio-90, zinostatina, estimalámero de zinostatina, ácido zoledrónico, zorubicina.

En general, se pueden perseguir los siguientes objetivos con la combinación de la forma cristalina con otros agentes citostáticamente o citotóxicamente activos:

- mejor eficacia para enlentecer el crecimiento de un tumor, para reducir su tamaño o incluso para eliminarlo completamente, en comparación con el tratamiento con un ingrediente activo individual;
- la posibilidad de usar los quimioterapéuticos que se usan en una dosificación inferior que en el caso de la monoterapia;
- la posibilidad de una terapia más tolerable con menos efectos secundarios en comparación con la administración individual;
- la posibilidad de tratamiento de un espectro más amplio de trastornos neoplásicos;
- la posibilidad de conseguir una mayor tasa de respuesta a la terapia;
- un mayor tiempo de supervivencia del paciente en comparación con las terapias estándares del presente.

Además, la forma cristalina también se puede usar en combinación con radioterapia y/o intervención quirúrgica.

Sección experimental

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de 3-(3-nitro-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo (V)

Inicialmente se cargaron 402 g (1,77 mol) de 3-(4-fluoro-3-nitrofenil)propanoato de metilo (VI) como solución en 3,0 L de acetonitrilo con 367 g (2,66 mol) de carbonato de potasio y se agregaron 300 g (2,12 mol) de (1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexanamina. La mezcla se agitó durante 12 horas bajo reflujo a una temperatura de camisa de 100°C. Después de enfriar a 20°C, se agregaron 3,6 L de agua a la mezcla. Para mejorar la separación de fases, se agregaron 1,0 L de solución saturada de cloruro de sodio. Se eliminó la fase acuosa inferior. La fase orgánica se concentró bajo presión reducida (aproximadamente 5 kPa (50 mbar)) a una temperatura de camisa de 50°C para dar un residuo oleoso.

Rendimiento: 640,5 g (104% del teórico) de un aceite naranja altamente viscoso.

^{1}H-RMN (400MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0,75 – 0,87 (m, 2H), 0,89 (d, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,02 (s, 3H), 1,10 (t, 1H), 1,34 – 1,39 (m, 1H), 1,68 – 1,83 (m, 2H), 1,99 – 2,02 (m, 1H), 2,58 – 2,62 (m, 2H), 2,75 – 2,79 (m, 2H), 3,57 (s, 3H), 3,73 – 3,82 (m, 1H), 7,07 (d, 1H), 7,44 (dd, 1H), 7,79 (d. amp., 1H), 7,89 (d, 1H).

Ejemplo 2

Preparación de solvato de 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo diclorhidrato dioxano (IIa)

Inicialmente se cargaron 640,5 g (1,77 mol) de 3-(3-nitro-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo (producto en bruto del Ejemplo 1) como solución en 3,2 L de tetrahidrofurano con 32 g de catalizador de paladio (5% en peso; 0,05 eq., 32 g, 88,5 mmol) en un reactor de hidrogenación y la mezcla se agitó bajo una atmosfera de hidrógeno (1500 kPa (1,5 bar) de presión positiva) a una temperatura de 25°C durante 10 h. La mezcla de reacción se separó por filtración mediante un filtro de presión (placa filtrante Seitz K300) y el filtrado se concentró bajo presión reducida (aproximadamente 5 kPa (50 mbar)) a una temperatura de camisa de 50°C para dar un residuo oleoso. El residuo se disolvió en 1,3 L de dioxano y se le agregó 560 ml de HCl 4N en dioxano (4,4 mol HCl) a una temperatura interna de 20°C durante un período de 20 min. En el curso de esto, el producto se separó por cristalización. Este se agitó durante 2 h, se separó por filtración y se lavó dos veces, cada vez con 500 ml de MTBE. El producto húmedo se secó en un gabinete de secado a una temperatura de 40°C durante 4 h bajo vacío.

Rendimiento: 785 g (91% del teórico, en base al uso de 3-(4-fluoro-3-nitrofenil)propanoato de metilo) de un sólido amarillo pálido.

^{1}H-RMN (400MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0,72 – 0,84 (m, 1H), 0,85 – 1,05 (m, 10H), 1,19 – 1,28 (m, 1H), 1,31 – 1,35 (m, 1H), 1,59 – 1,71 (m, 2H), 1,90 – 1,97 (m, 1H), 2,56 – 2,62 (m, 2H), 2,72 – 2,78 (m, 2H) 3,51 – 3,54 (m, 1H), 3,55 (s, 3H), 3,57 (s, 8H, dioxano), 6,28 – 6,37 (br, m,, 5H), 6,69 (d. amp., 1H), 6,70 (s, 1H), 7,01 (d. amp., 1H).

Ejemplo 3

Preparación del ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1H-bencimidazol-5-il)propanoico (I)

A una suspensión de 500 g (1,043 mol) de 3-(3-amino-4-{[(1R,5R)-3,3,5-trimetilciclohexil]amino}fenil)propanoato de metilo diclorhidrato dioxano solvatado (IIa) en 3,0 L de THF se agregaron 296,5 g (2,29 mol) de N,N-diisopropiletilamina a una temperatura de 20°C y la mezcla se agitó durante 30 min. Se agregaron 252 g (1,15 mol) de isotiocianato de 4-(trifluorometoxi)fenilo y se mantuvo la temperatura a 50°C durante 1 h. Subsiguientemente, se agregaron 300 g (1,56 mol) de EDCI y la mezcla se agitó durante 4 h bajo reflujo a una temperatura de camisa de 80°C. Se enfrió la mezcla a 20°C, se agregaron 1,5 L de solución acuosa de ácido cítrico al 20%, se agitó la mezcla durante 30 min, se agregaron 1,5 L de MTBE y la mezcla

se agitó durante otros 15 min. Se eliminó la fase acuosa inferior. La fase orgánica se extrajo dos veces, cada vez con 1,5 L de solución acuosa de carbonato ácido de sodio al 4,8%. La fase orgánica se concentró bajo presión reducida (aproximadamente 5 kPa (50 mbar)) a una temperatura de camisa de 50°C para dar un residuo oleoso al que subsiguientemente se agregaron 3 L de THF y 2 L de solución de hidróxido de sodio al 3,7% (1,56 mol), y la mezcla se agitó a una temperatura de 50°C durante 3 h. Después de enfriar a 20°C, se ajustó la mezcla a un pH de 4 con ácido clorhídrico acuoso al 10%, se agregaron 500 ml de solución saturada de cloruro de sodio y se separó la fase acuosa. La fase orgánica se concentró a una temperatura de camisa de 80°C para dar un residuo oleoso, al que luego se agregaron 4L de isopropanol y se separaron por destilación aproximadamente 2,5 L a una temperatura de camisa de 100°C. Se agregaron 900 ml de agua al mismo tiempo durante un período de 20 min a una temperatura interna de 80°C. En el curso de esto, el producto cristalizó a partir de la mezcla caliente. Después de enfriar a 20°C, el producto se separó por filtración y se lavó sucesivamente con 500 ml de isopropanol y 500 ml de agua. El producto húmedo se secó en un gabinete de secado a una temperatura de 60°C durante 16 h bajo vacío.

Rendimiento: 398 g (77% del teórico) de un sólido cristalino blanco (p.f.: 248°C).

^{1}H-RMN (400MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0,93 (s, 3 H), 0,96 (s, 3 H), 1,03 (s, 3 H), 1,04 - 1,12 (m, 1H), 1,35 - 1,44 (m, 2H), 1,70 - 1,92 (m, 3H), 2,03 (t, 1H), 2,43 - 2,60 (m, 2H), 2,85 (t, 2H), 4,63 (t, 1H), 6,90 (d, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,32 (d, 2H), 7,42 (d, 1H), 7,79 (d, 2H), 8,98 (s. amp., 1H), 12,06 (s. amp., 1H).

Difractograma de rayos X en polvo

En la Figura 1 se muestra el difractograma de rayos X de la forma cristalina de acuerdo con la invención.

Para registrar el difractograma de rayos X, se usó un difractómetro en polvo STOE automatizado en modo de transmisión usando radiación CuKα_1 monocromatizada por germanio. El tubo de rayos X con ánodo de cobre se operó a 40 kV y 40 mA. Los barridos 2Θ se registraron entre 2°≤ 2Θ ≤ 40° (tamaño de paso 0,5°). Se usó el programa de computación STOE WinX^{pow} para evaluar estos datos.

Los máximos de los valores 2θ figuran en la Tabla 1.

Tabla 1: XRPD

Máximos de la banda [°2θ]
6,5

8,5
9,8
10,5
11,2
11,3
11,9
12,1
13,4
14,3
14,8
15,0
15,1
15,2
15,3
15,9
16,4
17,1
17,4
17,6
18,0
18,2
19,1
19,1
19,6
19,9
20,1

20,2
20,8
21,1
21,6
21,8
22,4
22,6
22,9
23,2
23,4
24,0
24,3
24,3
24,7
24,9
25,1
25,7
26,1
26,7
27,0
27,6
27,8
28,0
28,5
28,8
29,2

29,7
29,9
30,2
31,6
31,9
32,5
33,3
33,8
34,4
35,3
36,6
37,1

Inhibición de IDH1 R132H en un ensayo bioquímico

La IDH1 R132H cataliza la reducción dependiente de NADPH de alfa-cetoglutarato (α-KG) a (2R)-2-hidroxiglutarato (2-HG). El consumo de NADPH se determina por luminiscencia.

Las reacciones bioquímicas se llevaron a cabo a 32°C en una placa tituladora de 384 pocillos en un volumen de reacción de 41 µl en cada caso y en la siguiente solución amortiguadora: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 20 mM, BSA 0,05%, Brij 0,01%, NADPH 1 µM, y α-KG 250 µM. La enzima IDH1 R132H se usó en una concentración final de 1,5 nM. Los compuestos de ensayo

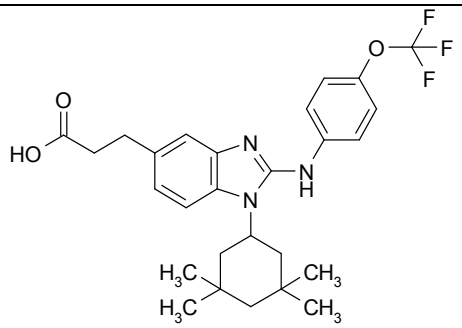
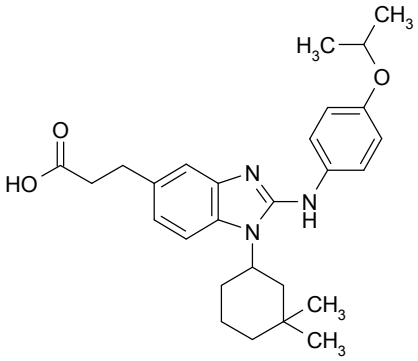
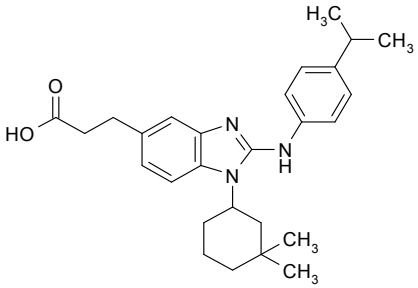
se ensayaron en un rango de concentración entre 0,002 y 10 µM. La concentración final de DMSO fue 2,4%.

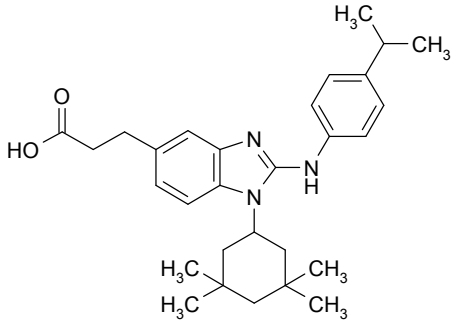
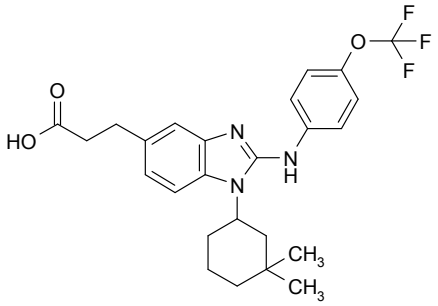
La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos, después de los cuales se agregaron 40 µl de una mezcla de detección (0,75 µg/ml de luciferasa, 0,02 U/ml de oxidoreductasa, FMN 4 µg/ml, decanal/etanol 2 µl/ml, Tris 50 mM pH 7,5, glicerol 0,5%, Tween 20 0,01%, BSA 0,05%). La luminiscencia se determinó usando un lector de luminiscencia (10 segundos de tiempo de medición, 1 segundo de tiempo de integración, 30% de sensibilidad). La disminución en la luminiscencia es proporcional a la actividad de mIDH1. Los valores de IC_{50} se determinaron por interpolación de los gráficos de la luminiscencia relativa contra la concentración de inhibidor. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

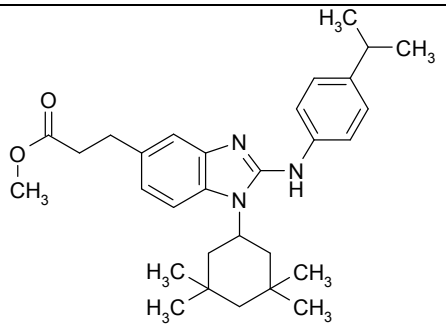
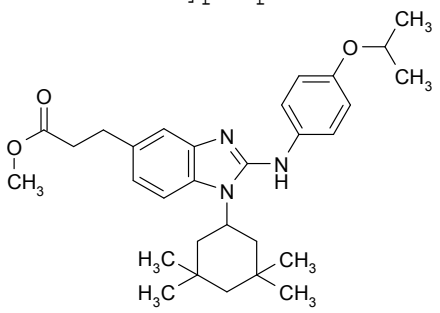
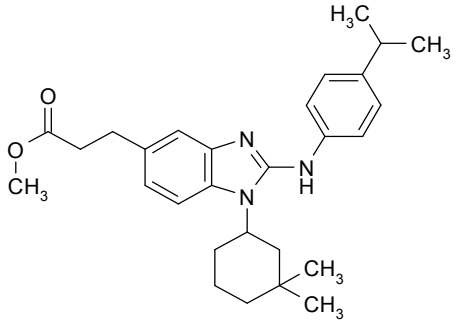
Tabla 2:

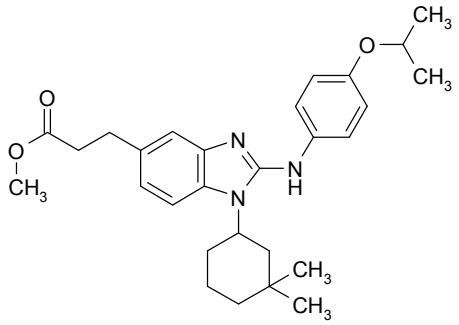
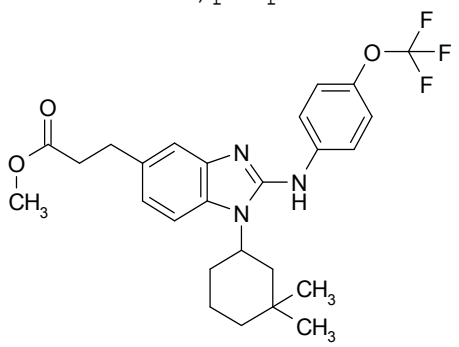
Valores IC_{50} de inhibidores de IDH1 R132H seleccionados

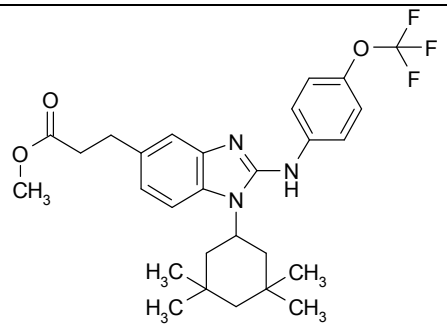
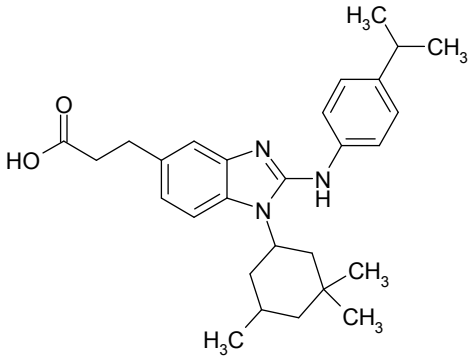
Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
Ácido 3-[1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoico	0,03

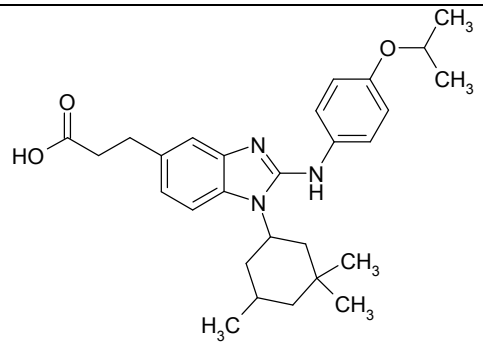
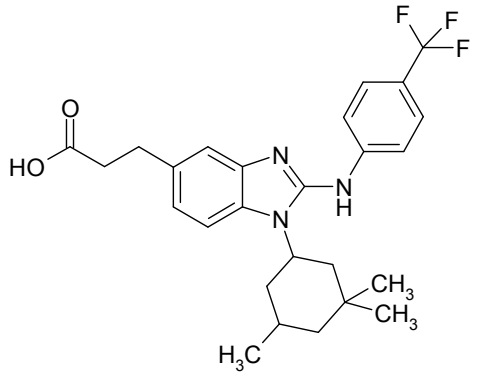
Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) Ácido 3-(1-[3,3-dimetilciclohexil]-2-{[4-(propan-2-iloxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,30
(±) Ácido 3-(1-[3,3-dimetilciclohexil]-2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,05

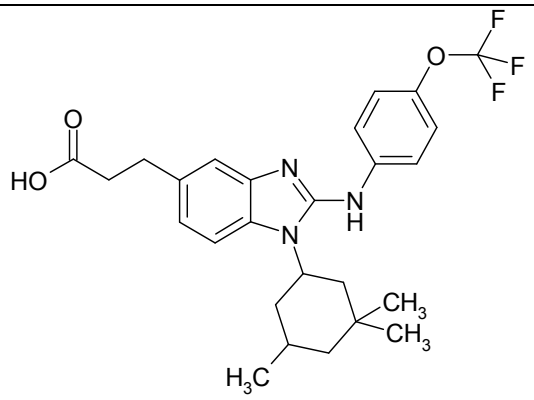
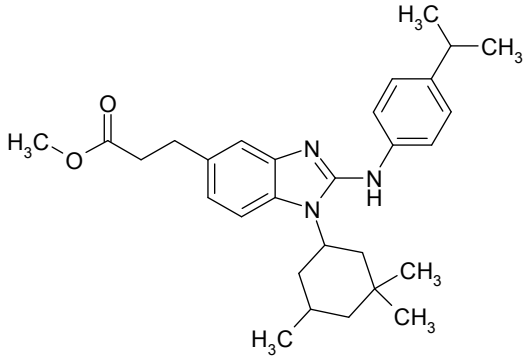
Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
Ácido 3-[2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoico 	0,02
(±) Ácido 3-(1-[3,3-dimetilciclohexil]-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,06
3-[2-{[4-(Propan-2-il)fenil]amino}-1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoato de metilo	0,09

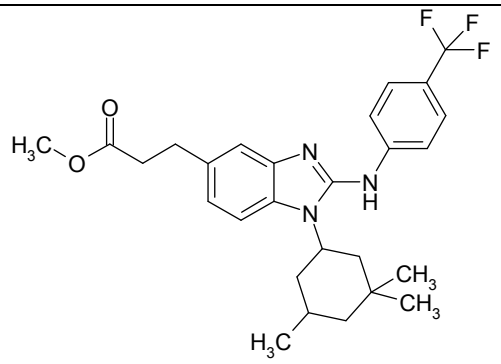
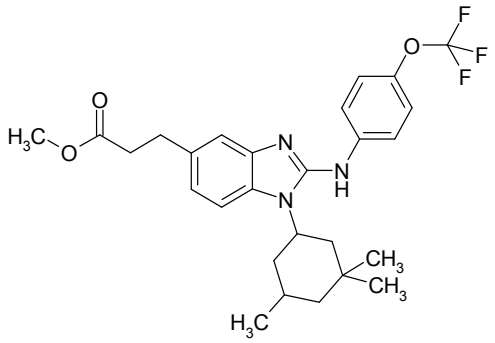
Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
3-[2-{[4-(Propan-2-iloxi)fenil]amino}-1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoato de metilo 	0,43
(±) 3-(1-[-3,3-Dimetilciclohexil]-2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo 	0,9
(±) 3-(1-[3,3-Dimetilciclohexil]-2-{[4-	1,9

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
(propan-2-iloxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo 	
(±) 3-(1-[3,3-Dimetilciclohexil]-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo 	1,7
3-[1-(3,3,5,5-Tetrametilciclohexil)-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoato de metilo	0,18

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) Ácido 3-(2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,02
(±) Ácido 3-(2-{[4-(propan-2-iloxi)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico	0,06

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) Ácido 3-(2-{[4-(trifluorometil)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,04
(±) Ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico	0,02

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) 3-(2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo 	0,17
(±) 3-(2-{[4-(Trifluorometil)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo	0,28

Ejemplo	IC_{50} de IDH1 R132H [µM]
	
(±) 3-(2-{[4-(Trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo 	0,30

Ensayo celular

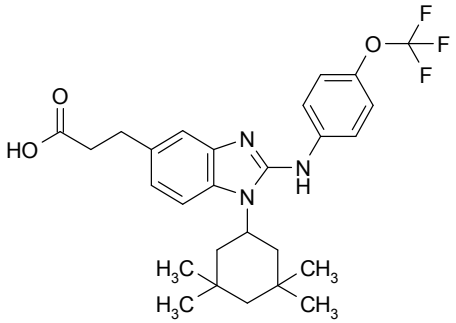
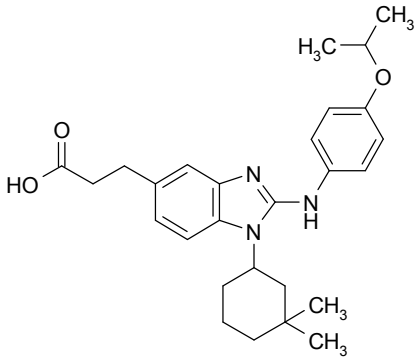
Las concentraciones de (2R)-2-hidroxiglutarato (2HG) se determinaron en un medio de una línea celular que tiene una sobreexpresión de la proteína isocitrato deshidrogenasa mutada. La mIDH cataliza la reducción dependiente de NADPH de alfa-cetoglutarato a 2-HG. Las células (LN229 R132H, Mohrenz y col., Apoptosis (2013)

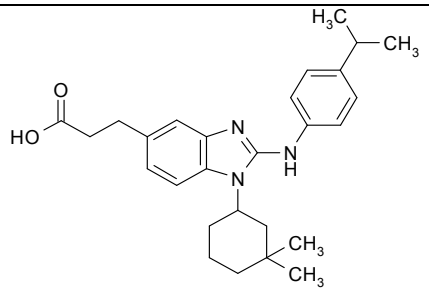
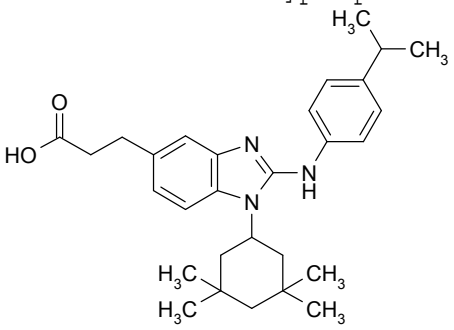
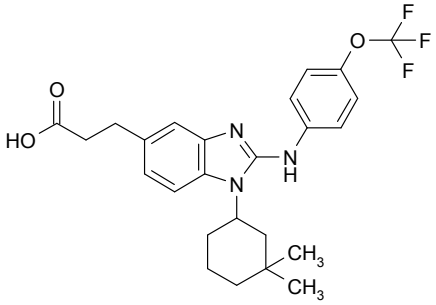
18:1416–1425) se cultivaron en DMEM que contenía FCS 10%. Las células se obtuvieron usando tripsina y se colocaron en placas tituladoras de 96 pocillos. Las células se incubaron durante la noche a 37°C en CO_2 5%. Al día siguiente, se agregaron los compuestos de ensayo a las células. La concentración final de DMSO fue 0,1% y se usaron los controles de DMSO. Las placas tituladoras se colocaron luego en un incubador durante 24 horas.

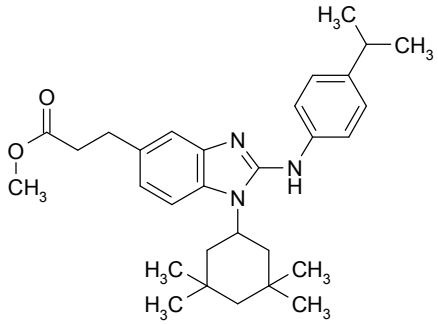
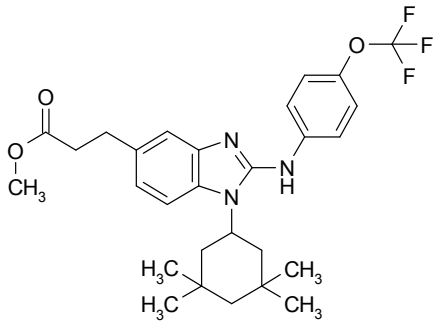
Se midió 2-HG usando el método publicado por Balss y col. (Acta Neuropathol (2012) 124: 883–891). Se agregó $HClO_4$ a cada pocillo y se centrifugaron las placas tituladoras. Se extrajeron alícuotas y se incubaron con hidroxiglutarato deshidrogenasa (HGDH), diaforasa, NAD^+ y resazurina. La conversión de resazurina a resorufina se determinó por espectroscopía de fluorescencia a Ex 540 nm Em 600 nm. El aumento en la señal de fluorescencia es proporcional a la formación de 2-HG. Los valores de IC_{50} se determinaron por interpolación a partir de gráficos de la fluorescencia relativa contra la concentración de inhibidor. Los resultados se compilan en la Tabla 3.

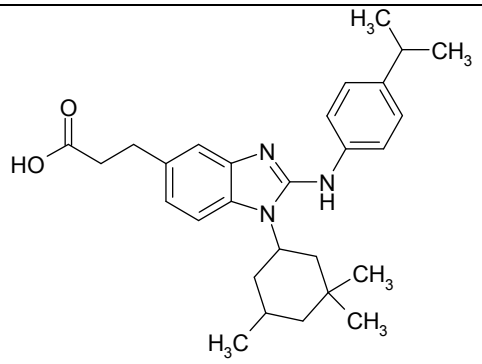
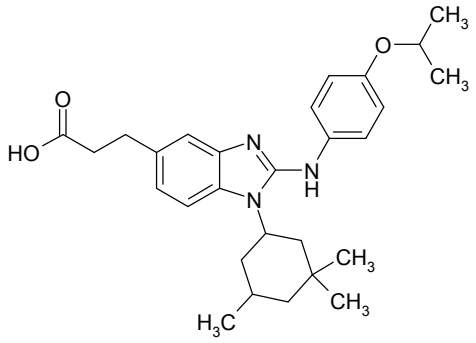
Tabla 3:

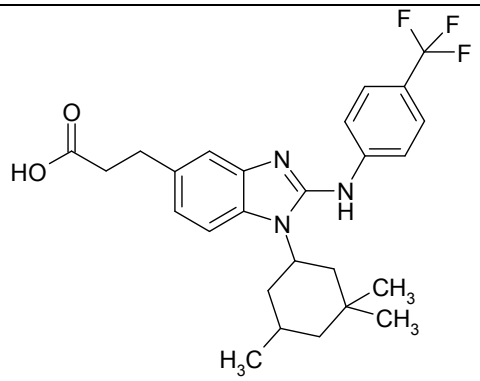
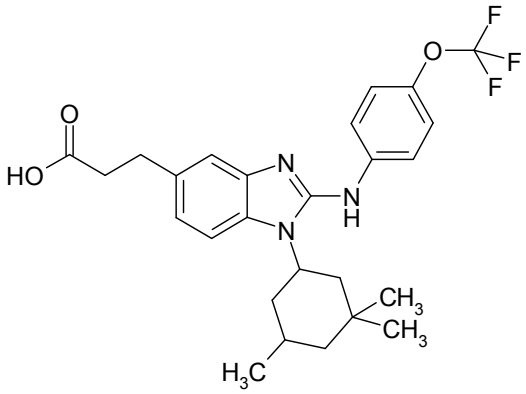
Inhibición de IDH1 R132H en el ensayo celular

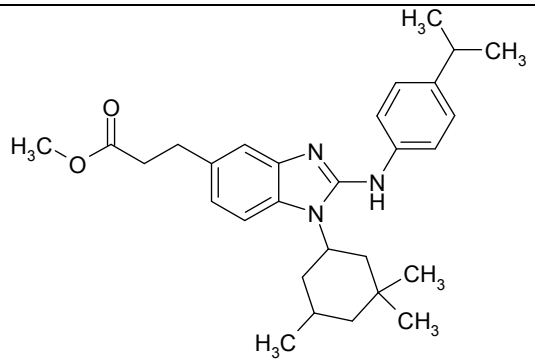
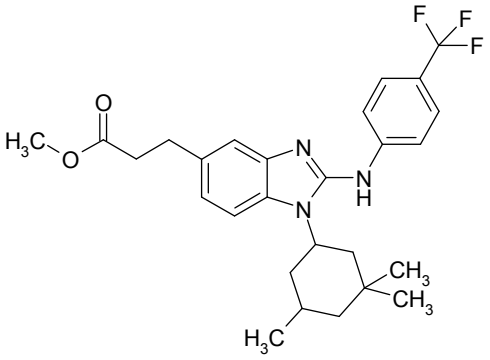
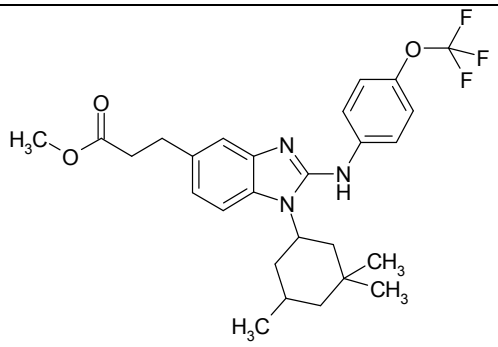
Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
Ácido 3-[1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoico 	0,30
(±) Ácido 3-(1-[3,3-dimetilciclohexil]-2-{[4-(propan-2-iloxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,85
(±) Ácido 3-(1-[3,3-dimetilciclohexil]-2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico	0,40

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
Ácido 3-[2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoico 	0,03
(±) Ácido 3-(1-[3,3-dimetilciclohexil]-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,85
3-[2-{[4-(Propan-2-il)fenil]amino}-1-(3,3,5,5-tetrametilciclohexil)-1*H*-	0,05

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
bencimidazol-5-il]propanoato de metilo 	
3-[1-(3,3,5,5-Tetrametilciclohexil)-2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1*H*-bencimidazol-5-il]propanoato de metilo 	0,08
(±) Ácido 3-(2-{[4-(propan-2-il)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico	0,08

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) Ácido 3-(2-{[4-(propan-2-iloxi)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,40
(±) Ácido 3-(2-{[4-(trifluorometil)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico	0,07

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) Ácido 3-(2-{[4-(trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoico 	0,17
(±) 3-(2-{[4-(Propan-2-il)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo	0,09

Ejemplo	**IC_{50} de IDH1 R132H [µM]**
	
(±) 3-(2-{[4-(Trifluorometil)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo 	0,20
(±) 3-(2-{[4-(Trifluorometoxi)fenil]amino}-1-[(cis)-3,3,5-trimetilciclohexil]-1*H*-bencimidazol-5-il)propanoato de metilo	0,30

Ejemplo	IC_{50} de IDH1 R132H [µM]