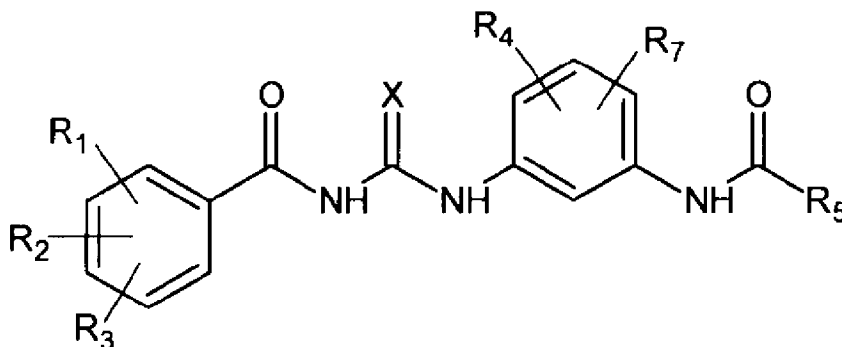




(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2012/09/21
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2013/03/28
(45) **Date de délivrance/Issue Date:** 2020/04/21
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2014/03/19
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** IB 2012/055033
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2013/042082
(30) **Priorité/Priority:** 2011/09/23 (FR11 58519)

(51) **Cl.Int./Int.Cl. C07C 279/22** (2006.01),
A61K 31/155 (2006.01)
(72) **Inventeurs/Inventors:**
RUAT, MARTIAL, FR;
FAURE, HELENE, FR;
ROUDAUT, HERMINE, FR;
HOCH, LUCILE, FR;
SCHOENFELDER, ANGELE, FR;
TADDEI, MAURIZIO, IT;
MANN, ANDRE, FR
(73) **Propriétaires/Owners:**
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR;

(54) **Titre : NOUVEAUX COMPOSES MODULATEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES PROTEINES HEDGEHOG, LEURS FORMES MARQUEES, ET APPLICATIONS**
(54) **Title: NOVEL COMPOUNDS MODULATING THE HEDGEHOG PROTEIN SIGNALING PATHWAY, MARKED FORMS THEREOF, AND APPLICATIONS**



(I)

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention est relative à de nouveaux composés répondant à la formule (I) suivante : ainsi qu'à leur utilisation à titre de médicament, notamment pour le traitement de tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines

(73) **Propriétaires(suite)/Owners(continued)**:UNIVERSITE DE STRASBOURG, FR

(74) **Agent**: ROBIC

(57) **Abrégé(suite)/Abstract(continued)**:

Hedgehog, pour le traitement de pathologies de type neuro-dégénératif, pour le traitement de maladies liées au développement cérébral (holoprosencéphalie), au contrôle de cellules souches, au traitement d'accident vasculaire cérébral et aux accidents cardiovasculaires, ainsi qu'aux maladies des oligodendrocytes et des cellules de Schwann, pour leur application in vitro pour moduler le renouvellement des cellules souches humaines ou animales, ainsi que pour le traitement du diabète. présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un composé de formule (I). Un procédé de radio-marquage de composés de formule (I), les composés marqués et leur utilisation comme outils de recherche font également parties de l'invention. Enfin, la présente invention concerne également une méthode de criblage et/ou d'identification de ligands des sites de liaison Smo du récepteur Smoothened, des méthodes d'identification d'agonistes et d'antagonistes du récepteur Smoothened et une méthode d'identification de cellules.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
28 mars 2013 (28.03.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/042082 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
C07C 279/22 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2012/055033
- (22) Date de dépôt international :
21 septembre 2012 (21.09.2012)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
11 58519 23 septembre 2011 (23.09.2011) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-PARIS 75016 (FR).
- (71) Déposant : UNIVERSITE DE STRASBOURG [FR/FR];
4, rue Blaise Pascal, CS 90032, F-67081 Strasbourg Cedex (FR).
- (72) Inventeurs; et
(71) Déposants (pour US seulement) : RUAT, Martial [FR/FR]; 16, rue du Bois du Roi, F-91400 Orsay (FR). FAURE, Hélène [FR/FR]; 84 allée des fours blancs, F-91190 Gif-sur-yvette (FR). ROUDAUT, Hermine [FR/FR]; 1 rue Messire Jean l'Hermitte, F-95670 Marly-la-ville (FR). HOCH, Lucile [FR/FR]; 28 rue de la croix pi-

card, F-78610 Auffargis (FR). SCHOENFELDER, Angèle [FR/FR]; 31, rue de Pflugriesheim, F-67450 Lampertheim (FR). TADDEI, Maurizio [IT/IT]; Via di Uopini 58, I-53035 Monteriggioni (IT). MANN, André [FR/FR]; 16, rue Pablo Neruda, F-67540 Ostwald (FR).

(74) Mandataires : MENA, Sandra et al.; CABINET ORES, 36 rue de Saint Petersburg, F-75008 Paris (FR).

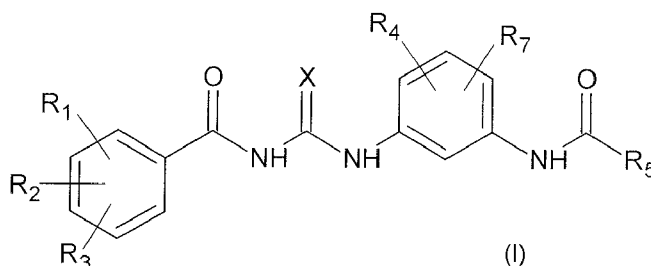
(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : NOVEL COMPOUNDS MODULATING THE HEDGEHOG PROTEIN SIGNALING PATHWAY, MARKED FORMS THEREOF, AND APPLICATIONS

(54) Titre : NOUVEAUX COMPOSÉS MODULATEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES PROTÉINES HEDGEHOG, LEURS FORMES MARQUÉES, ET APPLICATIONS



(57) Abstract : The present invention relates to novel compounds having the following formula (I), and the use thereof as a drug, particularly for the treatment of tumors associated with hyperactivation of the hedgehog protein signaling pathway, for the treatment of neurodegenerative diseases, for the treatment of diseases related to cerebral development (holoprosencephaly), for stem cell monitoring, for the treatment of cerebrovascular accidents and cardiovascular accidents, for the treatment of diseases involving oligodendrocytes and diseases involving neurolemmocytes, for application thereof *in vitro* for modulating human or animal stem cell renewal, and for the treatment of diabetes. The present invention also relates to pharmaceutical compositions comprising at least one compound having formula (I). The invention also relates to a method for radio-marking compounds having formula (I), the marked compounds, and the use of said compounds as research tools. Finally, the present invention also relates to a method for screening and/or identifying ligands in the Smoothed receptor (Smo) binding sites, methods for identifying agonists and antagonists of the Smoothed receptor, and a method for identifying cells.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2013/042082 A1 

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

La présente invention est relative à de nouveaux composés répondant à la formule (I) suivante : ainsi qu'à leur utilisation à titre de médicament, notamment pour le traitement de tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog, pour le traitement de pathologies de type neuro-dégénératif, pour le traitement de maladies liées au développement cérébral (holoprosencéphalie), au contrôle de cellules souches, au traitement d'accident vasculaire cérébral et aux accidents cardiovasculaires, ainsi qu'aux maladies des oligodendrocytes et des cellules de Schwann, pour leur application in vitro pour moduler le renouvellement des cellules souches humaines ou animales, ainsi que pour le traitement du diabète. présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un composé de formule (I). Un procédé de radio-marquage de composés de formule (I), les composés marqués et leur utilisation comme outils de recherche font également parties de l'invention. Enfin, la présente invention concerne également une méthode de criblage et/ou d'identification de ligands des sites de liaison Smo du récepteur Smoothened, des méthodes d'identification d'agonistes et d'antagonistes du récepteur Smoothened et une méthode d'identification de cellules.

NOUVEAUX COMPOSÉS MODULATEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES PROTÉINES HEDGEHOG, LEURS FORMES MARQUÉES, ET APPLICATIONS

La présente invention est relative à de nouveaux composés de formule (I), à leur utilisation à titre de médicament, notamment pour le traitement de tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog, pour le traitement de pathologies de type neuro-dégénératif, pour le traitement de maladies liées au développement cérébral (holoprosencéphalie), au contrôle de cellules souches, au traitement d'accident vasculaire cérébral et aux accidents cardiovasculaires, ainsi qu'aux maladies des oligodendrocytes et des cellules de Schwann, pour leur application *in vitro* pour moduler le renouvellement des cellules souches humaines ou animales, ainsi que pour le traitement du diabète. La présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant, à titre de principe actif, au moins un composé de formule (I). Un procédé de radio-marquage de composés de formule (I), les composés marqués et leur utilisation comme outils de recherche font également parties de l'invention. Enfin, la présente invention concerne également une méthode de criblage et/ou d'identification de ligands des sites de liaison Smo du récepteur Smoothened, des méthodes d'identification d'agonistes et d'antagonistes du récepteur Smoothened et une méthode d'identification de cellules, telles que des cellules tumorales exprimant le récepteur Smoothened.

La molécule de signalisation Hedgehog (Hh) est une protéine auto-protéolytique sécrétée qui active la voie de signalisation des protéines Hedgehog, une voie de signalisation qui joue un rôle fondamental dans la morphogenèse de nombreux tissus, en particulier dans la formation de l'endoderme et de l'axe embryonnaire, le développement du cerveau et des follicules pileux, ainsi que dans la prolifération cellulaire, et serait impliquée dans le maintien et la réparation tissulaire chez l'adulte (Ingham *et al.*, Genes Dev., 2001, 15, 3059-3087 ; Marti *et al.*, Trends Neurosci., 2002, 25, 89-96 ; Weschler *et al.*, Annu. Rev. Neurosci., 2001, 24, 385-428).

La protéine Hedgehog et la voie de transduction associée, initialement mises en évidence chez la drosophile, sont conservées chez les vertébrés et les invertébrés. Un seul homologue de Hh est présent chez la Drosophile, alors que trois homologues de Hh : Sonic (Shh), Indian (Ihh) et Desert (Dhh) sont présents chez les mammifères. Parmi ces trois homologues, Shh a été la plus étudiée du fait de son profil d'expression étendu durant le développement. Shh participe à la ventralisation du tube neural en spécifiant le phénotype précoce de plusieurs types neuronaux le long de la ligne médiane ventrale (motoneurones de

la moelle épinière, neurones dopaminergiques ou cholinergiques), et en induisant la génération des précurseurs oligodendrocytaires à partir de la moelle épinière ventrale. Par ailleurs, Shh induit la survie des neurones gabaergiques et dopaminergiques, oriente le devenir des précurseurs sérotoninergiques et prévient la mort des neurones dopaminergiques provoquée par la toxine MPP. Il induit enfin la prolifération des précurseurs des cellules granulaires dans le cervelet post-natal précoce. Les autres membres de la famille Hedgehog participent, quant à eux, respectivement au développement du tissu osseux (Ihh), des testicules et des nerfs périphériques (Dhh). En outre, les résultats obtenus avec Shh s'appliquent également à Dhh et Ihh.

Shh est synthétisé sous la forme d'un précurseur qui subit une série de modifications post-traductionnelles au cours desquelles la protéine est clivée par une activité enzymatique présente dans sa partie C-terminale. Cette autoprotéolyse génère un fragment C-terminal (ShhC) et un fragment N-terminal (ShhN) qui représente le fragment actif. Lors de cette réaction, on observe également l'addition d'une molécule de cholestérol dans la partie C-terminal de ShhN, qui favorise l'ancrage de ShhN à la membrane. Enfin une acétyl-transférase permet l'ajout d'une molécule de palmitate sur un résidu cystéine près de l'extrémité N-terminale. Ces événements produisent une protéine Shh biologiquement active. La sécrétion de la protéine est dépendante de la protéine Dispatched (Disp) dont deux isoformes Disp 1 et 2 existent chez les mammifères (Heretsch *et al.*, 2010, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 : 6613-6624).

Le fragment ShhN soluble transmet son action par l'intermédiaire d'un complexe contenant deux protéines transmembranaires : Patched (Ptc) une protéine à 12 domaines transmembranaires présentant une structure de type transporteur et Smoothed (Smo) une protéine à 7 domaines transmembranaires homologue aux membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Chez les mammifères, il existe une deuxième forme de Patched : Ptc2.

En absence de son ligand Shh, Ptc inhibe Smo. Une cascade intracellulaire, faisant intervenir de nombreux facteurs dont la protéine Suppressor of Fused (SuFu) et la protéine PKA, est alors induite. SuFu est un régulateur négatif de la voie de signalisation Shh, il peut se lier aux trois facteurs de transcription de la famille Gli et réguler leur activation. De plus, la délétion de SuFu résulte en une activation de la voie. Les facteurs de transcription de la famille Gli sont alors phosphorylés, ubiquitinylés puis clivés sous leur forme négative (GliR) par le protéasome, GliR pénètre dans le noyau et la transcription est inactive. Lorsque Shh se lie à Ptc, l'inhibition que celui-ci exerce sur Smo est levée avec translocation nucléaire

de la forme active des facteurs de transcription Gli (GliA) et activation transcriptionnelle de gènes cibles tels que *ptc* et *gli1*.

La protéine Hedgehog interacting protein (Hip) est capable de lier Shh avec une affinité comparable à celle de la protéine Ptc (Traiffort *et al.*, J. Neurochem., 2010, 113 : 576-590). Hip est considérée comme un modulateur négatif de la voie car en liant Shh elle diminue la quantité de ligand disponible pour activer la voie de signalisation via Ptc. Cdo et Boc appartiennent à la famille des protéines de surface cellulaire possédant des motifs immunoglobulines et fibronectines de type III. Ces protéines régulent positivement la voie de signalisation Shh en facilitant la présentation du ligand Shh à Ptc, en accroissant les quantités de morphogène à proximité des cellules cibles et en affectant éventuellement l'activité des protéines Gli (Heretsch *et al.*, 2010, Bioorg. Med. Chem. Lett 18 : 6613-24 : Scales et de Sauvage, 2009, Trends Pharmacol. Sci. 30 : 303-312).

Le rôle régulateur de la voie de signalisation des protéines Hedgehog durant le développement embryonnaire a été largement étudié : Hh a été associée aux processus de maintien et de réparation du tissu normal, à la régulation spatiotemporelle de la prolifération et de la différenciation, permettant ainsi aux tissus en développement d'atteindre leur taille correcte avec les types cellulaires appropriés et des degrés appropriés de vascularisation et d'innervation. Elle a notamment été impliquée dans le développement du système nerveux central (Dessaud *et al.*, 2008, Development, 135 : 2489-503). Le rôle essentiel de la fonction de signalisation Hh est démontré par les conséquences dramatiques des défauts dans cette voie de signalisation chez le fœtus humain, comme l'holoprosencéphalie observée avec les mutants de Shh (Traiffort *et al.*, J. Biol. Chem., 2004, 279 : 42889-42997).

Plus récemment la voie Shh a été identifiée dans le cerveau adulte, où la forme active amino-terminale de la molécule est exprimée dans de nombreuses régions du système nerveux mature suggérant de nouveaux rôles pour cette voie. En effet, elle participe notamment à l'établissement et au maintien des niches neurogéniques et régule la prolifération de précurseurs neuronaux ou gliaux dans le cerveau adulte (Traiffort *et al.*, 2010, J. Neurochem., 113 : 576-590). La modulation de la voie de signalisation Shh représente donc un enjeu pour le développement de thérapies pour les maladies neurodégénératives. Des études ont déjà permis de mettre en évidence des effets positifs de l'activation de la voie de signalisation Shh par la protéine Shh elle-même, sur la réduction des troubles du comportement de rat atteints de la maladie de Parkinson (Tsuboi *et al.*, 2002, Exp. Neurol. 173 : 95-104) ou sur la remyélinisation de neurones de rat atteints de sclérose en plaque (Mastronardi *et al.* 2004, J. Immunol. 172:6418-26). De plus, il a été montré que l'activation

de la voie de signalisation Shh par un agoniste de Smo permettait une augmentation de la prolifération de précurseurs neuraux au niveau des aires de neurogenèse de souris adulte (Machold *et al.*, 2003, *Neuron.*, 39 : 937-950). Cependant, les agonistes de Smo restent peu nombreux et encore mal caractérisés.

Des dysfonctionnements de la voie de signalisation Shh ont également été associés à de nombreux cancers. En effet, des mutations inactivatrices de *Ptc* sont associées au Syndrome de Gorlin ou naevomatose basocellulaire, une maladie autosomale dominante caractérisée par des malformations cranofaciales et cérébrales, mais surtout par une incidence élevée de diverses tumeurs, plus particulièrement des carcinomes basocellulaires au niveau cutané et des médulloblastomes, au niveau cervelet. Des mutations des gènes *Ptc* ou *Smo* humains sont également observées dans des tumeurs primitives neuroectodermes du système nerveux central, principalement des médulloblastomes (30% des cas), mais aussi dans des formes sporadiques de carcinomes basocellulaires (respectivement 40% et 20% des cas pour *Ptc* et *Smo*). En outre, des mutations de Shh sont également associées à des carcinomes basocellulaires. D'autres types de tumeurs ont également été associés à un défaut de la voie de signalisation Hedgehog, la localisation de ces tumeurs est étroitement corrélée aux sites d'expression des composantes de la voie au cours du développement embryonnaire (Scales et de Sauvage, 2009, *Trends in Pharmacol. Sci.*, 30 : 303-312). A titre d'exemple non-limitatif on peut citer : des cancers du sein et des méningiomes associés à des mutations de *Ptc*, des glioblastomes associés à des mutations de Gli, des cancers gastro-intestinaux, notamment les cancers primaires de l'estomac et du colon, des cancers de la prostate, de la vessie, des fibromes et des dermoïdes ovariens, des rhabdomyosarcomes, des cancers du poumon à petites cellules, des carcinomes oraux à cellules squameuses.

Du fait du rôle crucial de la voie de signalisation des protéines Hedgehog dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, les composantes de cette voie, telles que les protéines Smoothened (Smo 1 et Smo 2), Frizzled (Fz 1 à Fz 10), Patched (Ptc 1 et Ptc 2), les protéines Dispatched (Disp 1 et Disp 2) ou bien encore la protéine Hip représentent des cibles pour la mise au point de nouvelles molécules capables de moduler (activer ou inhiber) cette voie et donc de réguler positivement ou négativement le développement [prolifération, différenciation, migration, survie (apoptose)] et/ou l'activité de cellules différenciées et de cellules souches, *in vitro* et/ou *in vivo* chez l'embryon ou chez l'adulte.

Il est démontré que de telles molécules sont utiles dans le traitement des tumeurs associées à une hyperactivation de la voie Hedgehog (Scales et de Sauvage, 2009,

Trends in Pharmacol. Sci., 30 : 303-312). De telles molécules seraient donc utilisables dans le traitement de tumeurs variées telles que les tumeurs du tissu nerveux (médulloblastomes, tumeurs primitives neuroectodermiques, glioblastomes, méningiomes et oligodendrogliomes), des tumeurs cutanées (carcinomes basocellulaires, trichoépithéliomes), les tumeurs des tissus musculaires et osseux (rhabdomyosarcomes, ostéosarcomes, mélanomes) et les tumeurs d'autres tissus (rein, vessie, prostate, poumon, estomac, pancréas, sein, foie).

De telles molécules sont également utiles dans le traitement des pathologies de type neuro-dégénératif nécessitant un blocage de la voie Hedgehog (maladie de Parkinson, Chorée de Huntington, maladie d'Alzheimer, sclérose en plaques, maladie du motoneurone), et des maladies dans lesquelles le blocage de la voie de signalisation Hedgehog pourrait être bénéfique comme le diabète.

De telles molécules sont également utiles dans le traitement médical ou chirurgical (chirurgie plastique ou réparatrice, greffe de tissus ou d'organes) de nombreuses pathologies aiguës, subaiguës ou chroniques, génétiques ou acquises - impliquant un dysfonctionnement tissulaire lié à une dérégulation de la voie Hedgehog -, pour induire la formation, la régénération, la réparation et/ou l'augmentation de l'activité de tissus tels que le tissu nerveux [système nerveux central (cerveau) et périphérique (neurones sensoriels, moteurs, sympathiques)], l'os, le cartilage, les testicules, le foie, la rate, l'intestin, le pancréas, les reins, les muscles lisses et squelettiques, le cœur, les poumons, la peau et le système pileux, les muqueuses, les cellules sanguines et les cellules du système immunitaire. A titre d'exemple non-limitatif de ces pathologies, on peut citer notamment les neuropathies et les maladies neuromusculaires associées, le diabète, l'alopécie, les brûlures, les ulcérations (peau et muqueuses) et les troubles de la spermatogenèse.

Différentes molécules, capables de moduler l'activité de la voie Hedgehog, ont été identifiées.

En premier lieu, les protéines Hedgehog et des polypeptides dérivés (fragments, variants...), notamment des agonistes et des antagonistes des protéines Hedgehog (Demande Internationale PCT WO 01/98344 au nom de BIOGEN) ; du fait de leur taille, ces protéines et les polypeptides dérivés ne peuvent pas passer la barrière hématoencéphalique et ne peuvent donc pas être administrés par voie systémique, notamment pour le traitement des tumeurs cérébrales liées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog. En outre, de telles molécules sont peu stables, et difficiles à produire et à purifier. A l'inverse, il existe des molécules qui inhibent l'effet du ligand Shh, la robotnikinin et l'anticorps monoclonal 5E1.

La voie de signalisation Hh peut également être modulée plus en aval. L'effet inhibiteur de Ptc sur Smo peut par exemple être modulé. Il est augmenté par les statines et réduit par les oxystérols par un mécanisme qui n'est pas encore bien compris (Heretsch et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 18 : 6613-6624). Des produits naturels (Physalin F) ou synthétiques (GANT58, GANT61, HPI-1) sont également connus pour inhiber la liaison des facteurs de transcription Gli à l'ADN dans le noyau.

Toutefois, la plupart des recherches se sont concentrées sur la découverte de modulateurs agissant au niveau du récepteur Smoothened :

- des molécules organiques hétérocycliques inhibant ou activant (SAG et dérivés) la voie de signalisation Hh : Demande Internationale PCT WO 01/74344 au nom de CURIS ; Chen *et al.*, *PNAS*, 2002, 99, 14071-14076,

- la purmorphamine une petite molécule activant la voie de signalisation Hh : Wu *et al.*, *Chemistry & Biology*, 2004, 1229-1238,

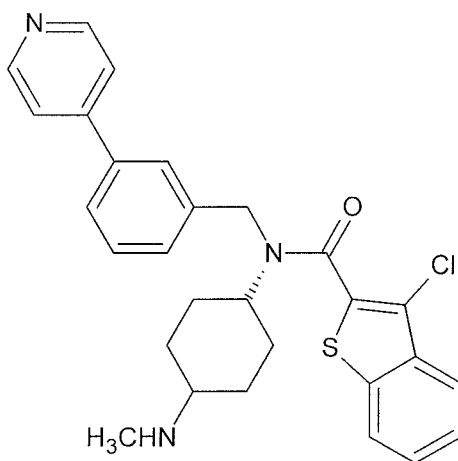
- des molécules hétérocycliques azotées : Demandes Internationales PCT WO 01/19800, WO 01/26644 et WO 02/30421 au nom de CURIS ; Kamenetsky *et al.*, *J. Biol.*, 2002, 1, 1-19,

- des stéroïdes végétaux dérivés de *Veratrum* spp (jervine, cycloamine et cycloposine) et de *Solanum* spp. (solanidine), substitués en position 16, 17 ou 18 par une amine ou un dérivé d'amine, et du cholestérol : Brevet américain US 6,432,970 et Demandes Internationales PCT WO 99/52534 et WO 01/27135 au nom de JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE ; Brevet américain US 6,291,516 ; Demande Internationale PCT WO 00/41545 au nom de ONTOGENY INC. ; Demande Internationale PCT WO 02/30462 au nom de CURIS ; Taipale *et al.*, *Nature*, 2000, 406, 1005-1009 ; Berman *et al.*, *Science*, 2002, 297, 1559-1561. Toutefois, il a été démontré que des concentrations en cycloamine supérieures à 10 μ M s'avéraient être cytotoxiques pour les cellules (Borzillo *et al.*, *Curr. Top Med. Chem.*, 2005, 5(2), 147-157). De plus, les effets *in vivo* de la cycloamine sur la croissance tumorale ont été remis en question car ils pourraient être liés à une activité en dehors de la tumeur elle-même (Yauch *et al.*, 2008, *Nature*, 455 : 406-410). Un dérivé de la cycloamine (IPI-926) est actuellement en phase clinique II (Mahindroo *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 3829 ; Tremblay *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2009, 52 : 14, 4400-4418),

- la mifepristone (17 β -hydroxy 11 β -(4-diméthylamino phényl) 17 α -(prop-1-ynyl)estra-4,9-dien 3-one), également dénommée RU-486 ou RU-38486 (Brevet français FR

2 850 022 au nom du CNRS) pour laquelle une activité inhibitrice de l'activité de la voie de signalisation des protéines Hedgehog a été démontrée,

- les molécules SANT74 et le SANT75 ayant une structure analogue à celle du SAG, composé activateur synthétique de type chlorobenzothiophène (CAS N° : 364590-63-6) sont également connus pour être des inhibiteurs stables permettant de contrôler efficacement la conformation de l'activateur *Smo* (Yang *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, publié le 14 avril 2009).



SANT75

Plus récemment, d'autres composés inhibiteurs de la voie de signalisation Hedgehog ont également été décrits (Peukert et Miller-Moslin, 2010, ChemMedChem 5 : 500-512 ; Low et De Sauvage, 2010, J. Clin. Oncol. ; Ng et Curran, 2011, Nature Review Cancer) :

- Des inhibiteurs à base de bisamide (Demande Internationale PCT WO 2007/059157 au nom de GENENTECH INC. et CURIS INC.) et de pyridyle (Demande Internationale PCT WO 2006/028958 au nom de GENENTECH INC. et CURIS INC. ; Brevet US 2009/0281089 au nom de GENENTECH INC.). Un des composés à base pyridyle, le GDC-0449 (phase clinique II) a montré son efficacité chez un patient atteint de métastases de médulloblastome. Toutefois, le patient a progressivement développé une résistance à la molécule. Une mutation d'un acide aspartique (D473H) de *Smo* est apparue. Elle perturbe la capacité du composé à se lier à *Smo* et à inhiber cette voie. Une mutation du même acide aminé a été identifiée chez un modèle souris atteint de médulloblastomes et traité par ce composé (Yauch *et al.*, 2009, Science 326 : 572-574).

- Des inhibiteurs développés par la société Novartis. Par exemple, le LDE225 (phase clinique II) a été testé pour traiter des médulloblastomes chez le modèle

souris et a induit une régression de ces tumeurs. Toutefois, une résistance a été observée au cours du traitement. Une étude a révélé plusieurs mécanismes de résistance dont une amplification chromosomique de Gli2 et, plus rarement, des mutations ponctuelles du récepteur Smo qui conduisent à la réactivation de la croissance tumorale. Ils ont également identifié une régulation positive de la signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Buonamici *et al.*, 2010, *Sci. Transl. Med.*, 51-70).

- Des inhibiteurs développés par Bristol-Myers Squibb Inc tels que le BMS-833923 (XL-139).

- Des inhibiteurs décrits par la société Pfizer Products, Inc. (WO 2008/075196 et US 2009/0005416). Le PF-04449913 est actuellement en phase clinique II.

- Des inhibiteurs décrits par la société MERCK (Dessole *et al.*, 2009, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 19 : 4191-4195).

- Les composés LEQ506 de Novartis et le TAK-441 de la société Millennium viennent également d'entrer en phase clinique I.

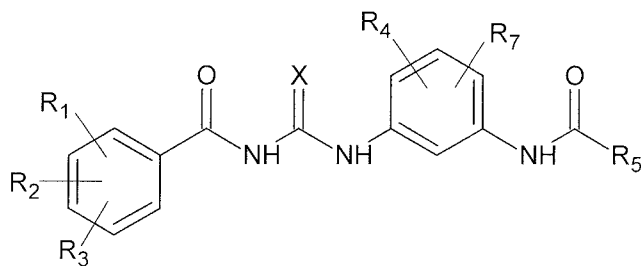
- Des inhibiteurs à base d'acyl-urées, -thiourées et -guanidines ont également été protégés en tant que modulateurs de la voie Hedgehog (WO 2009/130422 et WO 2011/010013 au nom du CNRS). Ces derniers ont le mérite d'être faciles à préparer en comparaison aux autres molécules existantes. Les dérivés acyl-guanidines sont, de plus, solubles dans l'eau.

Les Inventeurs se sont maintenant donnés pour but de pourvoir à de nouveaux composés modulateurs (stimulateurs ou inhibiteurs) de la voie de signalisation des protéines Hedgehog qui répondent mieux aux besoins de la pratique, notamment en ce qu'ils sont simples à synthétiser et potentiellement utilisables en thérapie humaine.

Cet objectif est atteint par les composés de formule (I) qui sont décrits ci-après et qui constituent le premier objet de l'invention, ces composés étant les plus puissants antagonistes du récepteur Smoothed identifiés à ce jour (5 à 30 fois plus puissants que les composés actuellement en phase clinique). Ces molécules présentent également une affinité 10 à 30 fois supérieure à celle des molécules GDC-0449 et LDE225, ces dernières s'étant par ailleurs heurtées à l'apparition de résistance chez certains patients (résistances en particulier liées à l'apparition de mutations sur le récepteur Smoothed). En outre, les molécules de l'invention présentent l'avantage d'être facilement préparées, généralement en trois ou quatre étapes, selon des procédés de synthèse analogues aux procédés classiques connus de l'homme de l'art, les composés acyl-urée, -thiourée et guanidine étant facilement accessibles à partir de matières premières disponibles. La fonction guanidine, en tant que base, est salifiable, ce qui a

l'avantage de produire des composés ayant une bonne solubilité en milieu aqueux. L'ensemble des composés de formule (I) est obtenu de manière très commode en utilisant des réactions chimiques simples bien connues de l'homme de l'art.

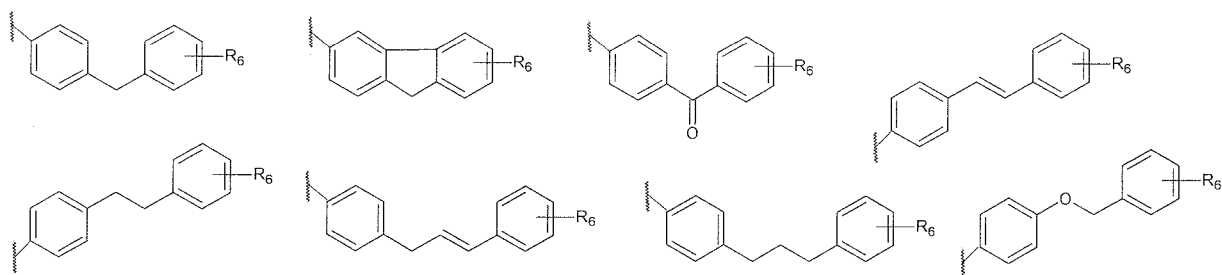
La présente invention a pour objet les composés de formule (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

- R_1 , R_2 et R_3 , identiques ou différents et indépendamment les uns des autres, représentent un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical hydroxyle, un groupe alkyle, perfluoroalkyle, alcoxy, alkylthio ou nitrile, lesdits groupes alkyle, perfluoroalkyle, alcoxy et alkylthio pouvant comprendre de 1 à 6 atomes de carbone,
- X représente O, S ou NH, et de préférence X est NH,
- R_4 et R_7 , identiques ou différents et indépendamment l'un de l'autre, représentent un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un groupe alkyle,
- R_5 représente un des groupes choisis parmi :



substitué par au moins un radical R_6 représentant un atome d'halogène ou un groupe alkyle, alcoxy, aminoalkyle, thioalkyle ou hydroxyle, lesdits groupes alkyle, alcoxy, aminoalkyle et thioalkyle pouvant comprendre de 1 à 6 atomes de carbone.

Au sens de la présente invention, on entend par :

- Alkyle : un groupe aliphatique hydrocarboné saturé, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone, de préférence de 1 à 2 atomes de carbone. Le terme « ramifié » signifie qu'au moins un groupe alkyle inférieur tel qu'un méthyle ou un éthyle est porté par une chaîne alkyle linéaire. Le terme alkyle "inférieur" désigne un alkyle ayant 1 ou 2 atomes de carbone ; le terme "alkyle supérieur" désigne un groupe alkyle linéaire ou ramifié

ayant de 3 à 6 atomes de carbone. A titre de groupe alkyle, on peut mentionner par exemple les groupes méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, t-butyle et n-pentyle.

- Atome d'halogène : désigne un atome de brome, de chlore, d'iode ou de fluore ; les désignations brome, chlore et fluore étant préférées ;

- Perfluoroalkyle : désigne un groupe alkyle tel que défini ci-dessus dans lequel tous les atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de fluore. Parmi les groupes perfluoroalkyle, les groupes trifluorométhyle et perfluoroéthyle sont préférés ;

- Alcoxy : désigne un groupe O-alkyle dans lequel le groupe alkyle peut prendre la même signification que celle indiquée ci-dessus. A titre d'exemple de groupes alcoxy, on peut notamment citer les groupes méthoxy, éthoxy, n-propoxy, iso-propoxy, n-butoxy et pentoxy ;

- Alkylthio : désigne un groupe alkyl-S dans lequel le groupe alkyle peut prendre la même signification que celle indiquée ci-dessus. A titre d'exemples de groupe alkylthio, on peut notamment citer les groupes méthylthio, éthylthio, iso-propylthio, butylthio et pentylthio ;

- Aminoalkyle : désigne un groupe alkyl-N dans lequel le groupe alkyle peut prendre la même signification que celle indiquée ci-dessus. A titre d'exemples de groupe aminoalkyl, on peut notamment citer les groupes aminométhyl, aminoéthyl, iso-propylamino, butylamino et pentylamino.

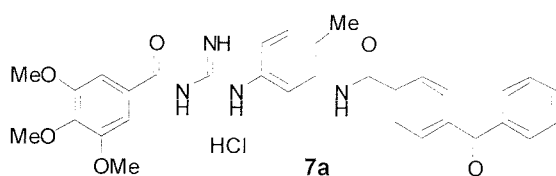
Selon une forme de réalisation préférée de l'invention, les composés de formule (I) sont choisis parmi ceux dans lesquels R₁, R₂ et R₃ représentent un radical alcoxy, et de préférence un radical méthoxy.

Selon un autre mode de réalisation préféré, R₄ et R₇ représentent un atome d'hydrogène ou de chlore, un groupe méthyle, éthyle ou isopropyle.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, R₆ représente un atome d'halogène ou un groupe alcoxy ou aminoalkyle, lesdits groupes alcoxy ou aminoalkyle pouvant comprendre de 1 à 6 atomes de carbone. Plus préférentiellement, R₆ représente un atome de chlore ou de fluor, un radical méthoxy ou diméthylamino.

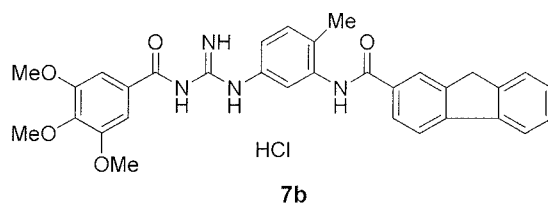
A titre de composés de formule (I), on peut en particulier citer :

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzoylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



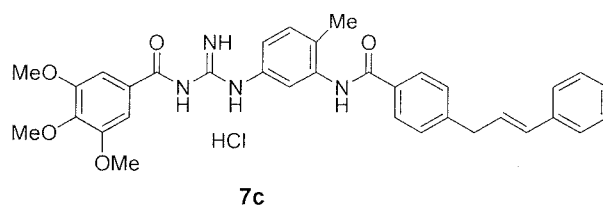
(Composé 7a) ;

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzoylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



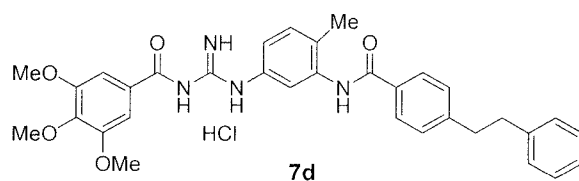
(Composé 7b) ;

- l'hydrochlorure de 3,4,5-triméthoxy-*N*-(*N*-(4-méthyl-3-(4-(3-phénylpropyl)benzamido)phényl)carbamimidoyl) benzamide de formule suivante :



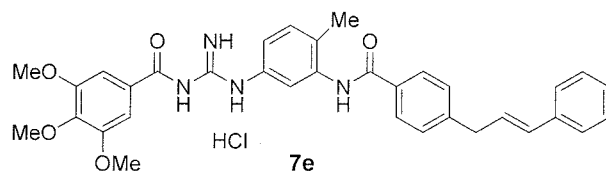
(Composé 7c) ;

- l'hydrochlorure de 3,4,5-triméthoxy-*N*-(*N*-(4-méthyl-3-(4-phénéthylbenzamido)phényl)carbamimidoyl)benzamide de formule suivante :



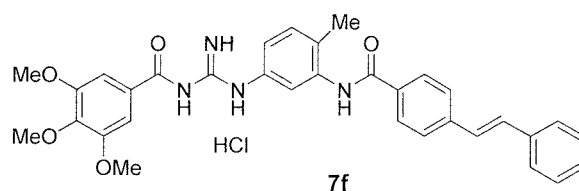
(Composé 7d) ;

- l'hydrochlorure de (*E*)-*N*-(*N*-(3-(4-cinnamylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



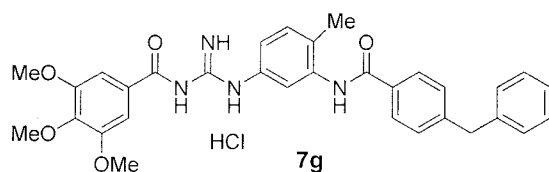
(Composé 7e) ;

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



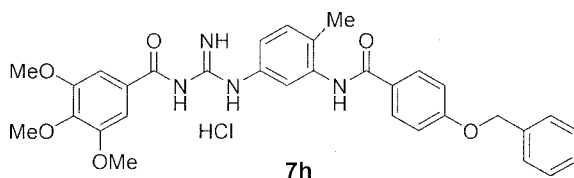
(Composé 7f) ;

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



(Composé 7g) ;

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-(benzyloxy)benzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



(Composé 7h).

Les composés de formule (I) conformes à l'invention peuvent être facilement préparés, généralement en trois ou quatre étapes, selon des procédés de synthèse analogues aux procédés classiques connus de l'homme du métier.

Dans un premier temps un fragment central, le fragment (VI), est préparé selon le Schéma 1 ci-dessus.

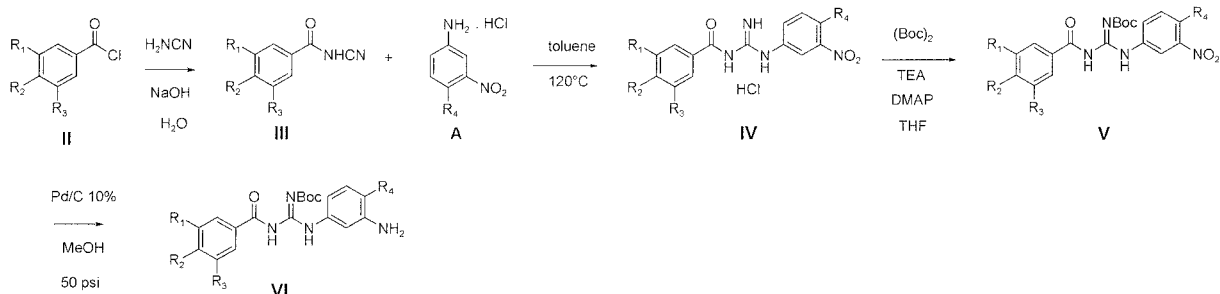


Schéma 1

Il s'agit de condenser un chlorure de benzoyl (II) sur la cyanamide en milieu aqueux, de manière à obtenir une acyl-cyanamide (III), qui est à son tour condensé avec une aniline (A) pour obtenir la guanidine (IV).

La fonction basique de la guanidine est ensuite protégée par un résidu Boc en milieu basique, pour obtenir un composé nitro (V), puis réduite en amine par hydrogénation pour obtenir l'aniline intermédiaire (VI).

Le Schéma réactionnel 2 ci-après indique la préparation de composés possédant dans leur formule (I) des groupements $R_1 = R_2 = R_3 = \text{MeO}$.

Les chlorures d'acides (1a-h) sont préparés selon les indications de la littérature (J. Med. Chem, 2001, 44, 3175 ; Chem. Eur. J. 2010, 16, 5848 ; Org. Lett. 2007, 9,

4571 ; Org. Biomol. Chem. 2008, 6, 3005 ; Adv. Cat. Synth. 2008, 350, 2065 ; J. Org. Chem. 2001, 66, 2874 ; J. Med. Chem. 2010, 53, 5770).

L'intermédiaire (VI) est ensuite condensé avec différents chlorures d'acide (1a-h) le plus souvent commerciaux pour fournir les composés attendus le plus souvent sous forme de sels (chlorures) (Schéma 2).

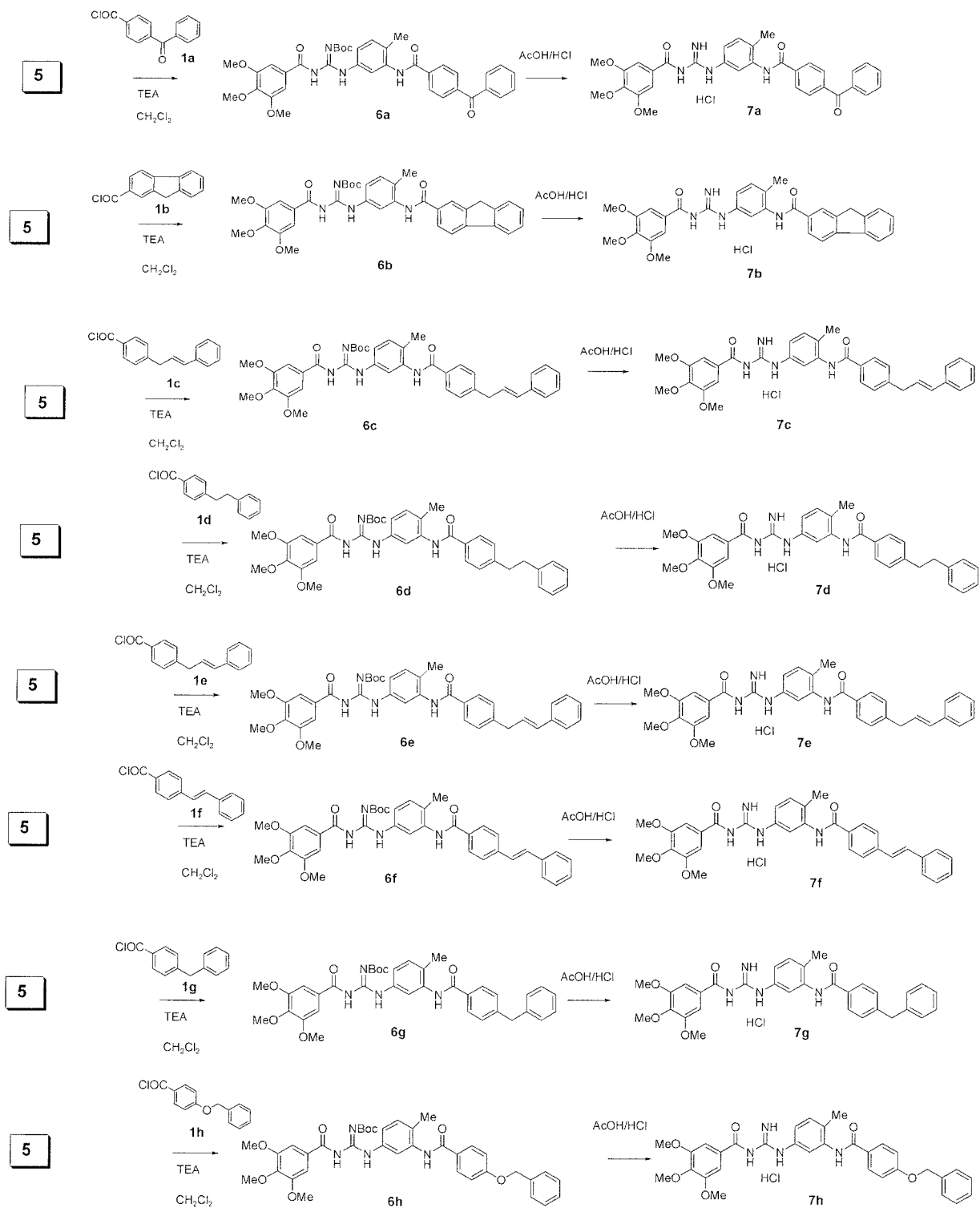


Schéma 2

Les composés de formule (I) conformes à l'invention présentent la propriété de moduler négativement (effet inhibiteur) ou positivement (effet activateur) le voie de signalisation des protéines Hedgehog et peuvent donc être utilisés, à titre de principe actif, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée aux traitements des pathologies associées à une hyperactivation ou à un déficit de la voie de signalisation des protéines Hedgehog.

Par conséquent, la présente invention a également pour objet des composés de formule (I), pour leur application en tant que médicament, et notamment des composés de formule (I) pour leur application en tant que médicament pour le traitement de tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog.

Et plus particulièrement, la présente invention concerne également les composés de formule (I) :

- à titre de médicament destiné au traitement des tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog ; de telles tumeurs sont notamment les tumeurs du tissu nerveux (médulloblastomes, tumeurs primitives neuroectodermiques, glioblastomes, méningiomes et oligodendrogliomes), des tumeurs cutanées (carcinomes basocellulaires, trichoépithéliomes), des tumeurs des tissus musculaires et osseux (rhabdomyosarcomes, ostéosarcomes) ou des tumeurs d'autres tissus (rein, vessie, prostate, poumon, estomac, pancréas),

- à titre de médicament pour le traitement de pathologies de type neuro-dégénératif comme la maladie de Parkinson, la Chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques ou la maladie du motoneurone,

- à titre de médicament pour le traitement de maladies liées au développement cérébral (holoprosencéphalie), au traitement d'accident vasculaire cérébral et aux accidents cardiovasculaires, ainsi qu'aux maladies des oligodendrocytes et des cellules de Schwann,

- pour une utilisation *in vitro* pour contrôler et moduler le renouvellement des cellules souches humaines ou animales,

- à titre de médicament pour le traitement d'autres pathologies dans lesquelles la modulation de la voie de signalisation Hedgehog pourrait être bénéfique, comme par exemple le diabète.

La posologie utile variera en fonction de l'affection à traiter, de la voie et du rythme d'administration, ainsi que de la nature et du poids de l'espèce à traiter (humaine ou animale) ; elle peut varier par exemple de 10 mg à 2 g par jour chez l'adulte par voie orale.

Un autre objet de la présente invention est une composition pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comprend, à titre de principe actif, au moins un composé de formule (I) tel que défini précédemment, et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Au sein des compositions pharmaceutiques conformes à l'invention, le ou les composés de formule (I) sont de préférence utilisés en une quantité permettant d'administrer des doses unitaires comprises entre 10 mg et 2 g environ.

L'homme du métier choisira un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables en fonction de la voie d'administration de la composition pharmaceutique. Bien entendu, l'homme de l'art veillera, à cette occasion, à ce que le ou les excipients utilisés soient compatibles avec les propriétés intrinsèques attachées à la composition conforme à la présente invention.

En outre, la forme du médicament ou de la composition pharmaceutique (par exemple, une solution, une suspension, une émulsion, des comprimés, des gélules, des suppositoires, etc...) dépendra de la voie d'administration choisie.

Ainsi, au sens de la présente invention, le médicament ou la composition pharmaceutique peut être administré par n'importe quelle voie appropriée, par exemple par la voie orale, anale, locale, systémique, intraveineuse, intramusculaire ou mucosale, ou bien en utilisant un patch, ou encore sous forme encapsulée dans, ou immobilisée sur, des liposomes, des microparticules, des microcapsules, et analogues.

On peut notamment citer, à titre d'exemples non limitatifs d'excipients appropriés pour une administration par voie orale, le talc, le lactose, l'amidon et ses dérivés, la cellulose et ses dérivés, les polyéthylèneglycols, les polymères d'acide acrylique, la gélatine, le stéarate de magnésium, des matières grasses animales, végétales ou synthétiques, les dérivés de la paraffine, les glycols, les stabilisants, les conservateurs, les anti-oxydants, les agents mouillants, les anti-agglomérants, les dispersants, les émulsionnants, les agents modifiants du goût, les agents de pénétrations, de solubilisation, etc...

Les techniques de formulation et d'administration des médicaments et compositions pharmaceutiques sont bien connues dans la technique ici considérée, l'homme du métier pouvant notamment se référer à l'ouvrage Remington's Pharmaceutical Sciences, (21st édition).

Les composés de formule (I) de l'invention s'avèrent être d'une grande utilité aussi bien comme outils pour la découverte de nouveaux modulateurs de ces voies de

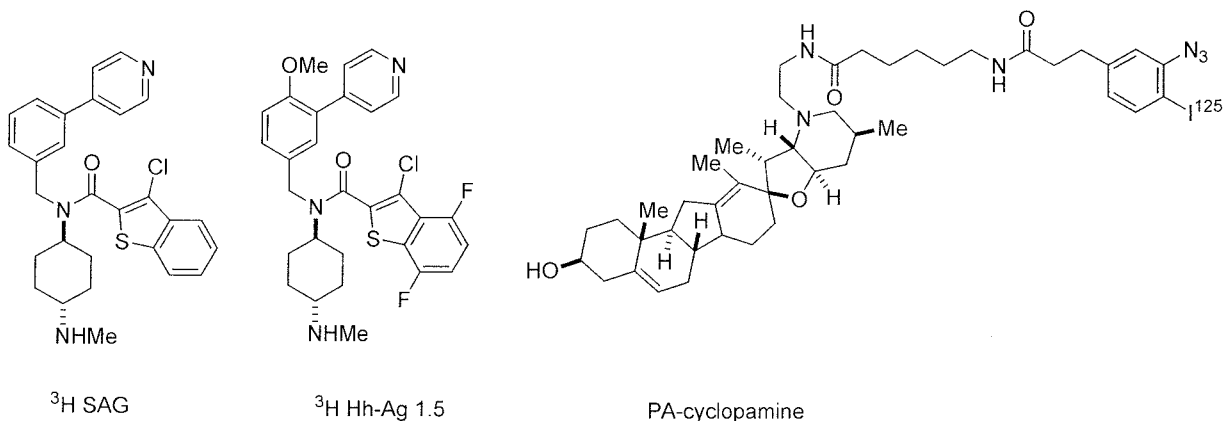
signalisation que pour déceler différentes formes du récepteur Smoothened ou de récepteurs apparentés et identifier des molécules capables de moduler ces différentes formes.

La présente invention se rapporte donc également à l'utilisation d'au moins un composé de formule (I) marqué comme outil de recherche, notamment pour l'identification de molécules capables d'interagir avec le récepteur Smoothened ou un récepteur apparenté, par exemple en se liant sur le site de liaison Smo1 ou sur le site de liaison Smo2.

En effet, les Inventeurs ont constaté de manière tout à fait inattendue que l'introduction d'un marqueur sur l'une des extrémités de fragments structurales des composés de formule (I) pouvait conduire à des radio-ligands présentant une affinité subnanomolaire caractérisée dans de nombreux tests biologiques.

Le marquage des composés de formule (I) peut être radioactif par incorporation d'isotopes radioactifs tels que ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{124}I , ^{13}N , ^{15}O ou encore ^{123}I selon les méthodes classiques de l'état de la technique. Le marquage du composé de formule (I) peut aussi consister en la fixation d'un fluorophore sur ledit composé selon les méthodes connues de l'homme du métier ; la détection du marquage peut se faire classiquement à l'aide de radio-imageurs sélectionnés en fonction de l'atome radioactif à détecter, ou par mesure de la fluorescence.

Dans la littérature, plusieurs radio-ligands de la voie de signalisation ont été décrits, mais encore peu utilisés. Par exemple, les radio-ligands marqués au tritium ^3H ou à l'iode ^{125}I comme le ^3H SAG (Rominger *et al.*, JPET, 2009, 995-1005), le ^3H -Hh-Ag1.5 (Borzillo et Lippa., Curr. Top Med. Chem., 2005, 5(2), 147-57), le [^3H]GDC-0449 (Dijkgraaf *et al.*, 2011, Cancer Res. 435-444) ou la PA-cycloppamine [^3H]-cycloppamine (Chen *et al.*, Genes Dev., 2002, 16 : 2743-2748) :



Une série d'analogues ont été étudiés, dans la perspective d'obtenir une substance marquée au tritium pour entreprendre des expériences de liaisons spécifiques et/ou d'autoradiographie pour analyser d'une manière approfondie le mécanisme d'action des modulateurs de récepteurs de la voie de signalisation des protéines Hedgehog, et plus particulièrement du récepteur Smoothed. En effet, les composés marqués précédemment décrits dans l'art antérieur ne sont pas faciles d'accès ; ils nécessitent un grand nombre d'étapes de synthèse. De plus, parmi les radio-ligands décrits ci-dessus, seule la PA-cycloamine [³H]-cycloamine est disponible commercialement. Elle présente en outre une faible affinité (Kd autour de 10 nM) (Rominger *et al.*, JPET, 2009, 995-1005), contrairement aux composés de l'invention (Kd = 0.3 nM pour le composé (7d)).

Plus particulièrement, les composés de formule (I) sous forme marquée peuvent être utilisée :

- pour la détection de tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog,
- pour le criblage et/ou l'identification de ligands de sites de liaison spécifiques des récepteurs de la voie de signalisation des protéines Hedgehog, tel que le récepteur Smoothed ou des récepteurs apparentés comme les récepteurs Frizzled (Frizzled 1 à 10), ou encore comme les récepteurs Patched (Patched 1 et Patched 2), Dispatched (Dispatched 1 et Dispatched 2) ou Hip, lesdits récepteurs de la voie de signalisation des protéines Hedgehog pouvant être exprimés de façon naturelle ou pouvant être transfectés (transfert de gène plasmidique) ou infectés (grâce à l'utilisation de virus) de façon stable ou transitoire dans des cellules primaires, des lignées cellulaires ou des tissus sains ou pathologiques,
- pour le criblage et/ou l'identification de nouvelles molécules antagonistes des récepteurs de la voie de signalisation des protéines Hedgehog (molécules anticancéreuses) ou d'agonistes des récepteurs de la voie de signalisation des protéines Hedgehog agissant sur les cellules souches,
- en autoradiographie pour analyser le fonctionnement de la voie de signalisation des protéines Hedgehog dans des cellules primaires, des lignées cellulaires ou des tissus sains ou pathologiques,
- pour étudier la régulation pharmacologique des récepteurs de la voie de signalisation des protéines Hedgehog dans des cellules primaires, des lignées cellulaires ou des tissus sains ou pathologiques.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de radio-marquage d'un composé de formule (I) tel que défini ci-dessus comprenant une étape de tritiation d'un composé de formule (I) sous une atmosphère de tritium ^3H , et ledit procédé comprenant une étape préalable d'halogénéation lorsque le composé de formule (I) est substitué par un groupe R_5 exempt de double liaison éthylénique.

Ainsi, un objet supplémentaire de la présente invention concerne un composé de formule (I) susceptible d'être obtenu selon le procédé de radio-marquage décrit ci-dessus, dans lequel au moins un de ses atomes d'hydrogène a été remplacé par un atome de tritium ^3H . Ces composés de formule (I) radio-marqués au tritium ^3H peuvent être utilisés comme outils de recherche, et pour les différentes utilisations énumérées ci-dessus.

Diverses méthodes de criblage de modulateurs de la voie Hedgehog sont connues :

- méthodes utilisant des réponses cellulaires de lignées ou cultures primaires : différenciation cellulaire (C3H10T1/2), prolifération cellulaire (cellules primaires granulaires du cervelet) ;

- méthodes utilisant une compétition avec un composé fluorescent agissant sur les domaines transmembranaires du récepteur ciblé [(bodipycyclopamine (BC)) (US 2007/0218775) ;

- méthodes utilisant un gène rapporteur de la voie impliquée (Taipale *et al.*, 2000, Nature, 406, 1005-1009) ;

- un essai détectant une activité Hh en mesurant les interactions Ptc-Hh en présence ou non de composé à tester (US 2005/0282231) ;

- un essai utilisant des cellules défectives pour Sufu et un rapporteur pour identifier des inhibiteurs de la voie Hh agissant en aval de Smo (WO 2006/080894).

La présente invention se rapporte aussi à une méthode de criblage et/ou d'identification de ligands des sites de liaison Smo (Smo1 ou Smo2) du récepteur Smoothened comprenant les étapes suivantes :

- a) mise en contact du récepteur Smoothened et d'au moins un composé de formule (I) pour l'obtention d'un complexe [Smo-composé de formule (I)] ;

- b) mise en contact du récepteur Smoothened, dudit composé de formule (I) et d'une molécule à tester ;

- c) détection d'une interaction entre ledit récepteur Smoothened et lesdites molécules à tester par comparaison du récepteur Smoothened récupéré à l'étape b) avec le complexe [Smo-composé de formule (I)] ; et

d) sélection desdites molécules à tester pour lesquelles une interaction avec le récepteur Smoothened est mesurée.

L'étape a) peut être mise en œuvre avec des cellules exprimant le récepteur Smoothened ou avec des extraits de membranes comprenant le récepteur Smoothened fonctionnel, il peut notamment s'agir d'extraits de membranes de levures portant le récepteur humain Smoothened fonctionnel susceptibles d'être obtenus avec le procédé décrit par de Rivoyre *et al.* (FEBS Letters 579, 2005, 1529-1533).

Lorsque l'étape a) est mise en œuvre avec des cellules exprimant le récepteur Smoothened, l'expression dudit récepteur est soit constitutive (le récepteur est naturellement exprimé par la cellule), soit elle résulte de la transformation d'une cellule afin qu'elle exprime ou sur-exprime un récepteur Smoothened de la même espèce ou d'une espèce différente. Ce récepteur Smoothened peut aussi porter une mutation qui lui confère des propriétés biochimiques ou pharmacologiques différentes du récepteur sauvage.

Tout composé de formule (I) peut être utilisé pour la mise en œuvre de la méthode selon l'invention ; il pourra toutefois être choisi par l'homme du métier notamment en fonction de son affinité pour le récepteur Smoothened.

L'étape a) peut être mise en œuvre en phase liquide ou sur un support solide convenable ; l'homme du métier choisira et adaptera ces modalités de mise en œuvre par exemple selon qu'il utilise le récepteur Smoothened sous la forme d'extraits de membranes ou sous la forme de protéine purifiée.

Lorsque l'étape a) est mise en œuvre en phase liquide, la méthode de criblage en phase liquide peut être mise en œuvre selon les étapes suivantes :

a) mise en contact du récepteur Smoothened et d'au moins un composé de formule (I) pour l'obtention d'un complexe [Smo-composé de formule (I)] ;

b) mise en contact du récepteur Smoothened, dudit composé de formule (I) et d'une molécule à tester ;

c) récupération dudit récepteur Smoothened éventuellement lié à une ou plusieurs molécules à tester et/ou audit composé de formule (I) ;

d) détection d'une interaction entre ledit récepteur Smoothened et lesdites molécules à tester par comparaison du récepteur Smoothened récupéré à l'étape c) avec le complexe [Smo-composé de formule (I)] ; et

e) sélection desdites molécules à tester pour lesquelles une interaction est mesurée.

L'étape a) peut être mise en œuvre avec des extraits membranaires comprenant le récepteur Smoothened qui sont alors incubés avec le composé de formule (I) et les molécules à tester ; le mélange est ensuite centrifugé ; le culot obtenu après centrifugation est à nouveau suspendu dans un tampon, puis à nouveau centrifugé pour éliminer les interactions non spécifiques. La fixation de molécule à tester au récepteur Smoothened est alors analysée soit par mesure de fluorescence, soit par mesure de radioactivité suivant le marquage du composé de formule (I) :

- selon une variante de la méthode de criblage en phase liquide, ledit composé de formule (I) est préalablement marqué. L'étape d) de détection de l'interaction entre le récepteur Smoothened et une ou plusieurs des molécules à tester se fait par comparaison du marquage (par radioactivité ou fluorescence) des récepteurs Smoothened récupérés à l'étape c) avec celui du complexe [Smo-composé de formule (I)] ; les molécules sélectionnées sont celles pour lesquelles le marquage des récepteurs Smoothened récupérés à l'étape c) est plus faible que celui du complexe [Smo-composé de formule (I)] ;

- selon une autre variante de la méthode de criblage en phase liquide, la détection de l'interaction se fait par chromatographie en comparant la position du complexe [Smo-composé de formule (I)] avec celle du récepteur Smoothened récupéré à l'étape c), si la position est identique alors il n'y a pas d'interaction entre le récepteur Smoothened et la molécule à tester. *A contrario*, une différence de position indique une interaction, il convient ensuite de confirmer que l'interaction entre la molécule à tester et le récepteur Smoothened se produit bien sur un site de liaison Smo.

L'étape a) de la méthode de criblage selon l'invention peut alternativement être mise en œuvre sur un support solide convenable.

Par support solide, on entend en particulier un biocapteur constitué d'une membrane qui comprend une espèce biologique, telle qu'une enzyme, un anticorps, un peptide, un micro-organisme, un tissu biologique, un lipide, un acide nucléique..., permettant la liaison avec une molécule à tester et un transducteur permettant de transformer le signal biologique, tel que la fixation d'un ligand sur un récepteur protéique, en un signal physique mesurable, par exemple électrochimique (ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique), optique (lumineux), piézoélectrique ou calorimétrique. Dans le cas présent, l'espèce biologique fixée sur la membrane est le récepteur Smoothened ; dans deux expériences conduites en parallèle, le récepteur Smoothened sur support solide est mis en contact avec un composé de formule (I) et avec le mélange dudit composé de formule (I) et

d'une molécule à tester, les signaux obtenus dans chacune de ces expériences sont comparés ; sont sélectionnées les molécules qui induisent une modification du signal.

A titre d'exemple, le support solide est un biocapteur de détection d'une liaison par résonance plasmonique dont l'utilisation permet de visualiser et de caractériser (constantes d'affinité, d'association et de dissociation) des interactions entre une protéine et son ligand par changement de masse à la surface du biocapteur. Ce changement de masse se mesure par des variations de l'angle de résonance plasmonique à la surface du biocapteur et ne nécessite pas de ligand marqué ou fluorescent.

Lorsque la méthode de criblage sur support solide est mise en œuvre avec des extraits de membranes comprenant le récepteur Smoothened, ces extraits peuvent être fixés par injection sur un biocapteur lipophile. Lorsqu'un biocapteur lipophile est utilisé, les extraits membranaires se fixent aux groupements lipophiles liés par des liaisons covalentes au dextran, ce qui permet de suivre l'interaction entre récepteurs membranaires et ligands (M. R. Pourshafie *et al.*, J. Microbiol. Meth., 2004, 58, 313-320; A. Wikstrom, Anal. Biochem., 2007, 362, 98-107).

Ainsi selon une variante de l'invention, le biocapteur de détection d'une liaison par résonance plasmonique est un biocapteur lipophile tel qu'un biocapteur hydrophobe « sensorchip L1 » de Biacore (GE Healthcare) sur lequel est fixée par injection une préparation de membranes contenant le récepteur Smoothened.

Lorsque la méthode de criblage sur support solide est mise en œuvre avec le récepteur Smoothened purifié, ledit récepteur peut également être fixé sur un biocapteur permettant une mesure de résonance plasmonique de surface qui consiste à détecter une variation de l'indice de l'interface sur laquelle est fixé le récepteur lorsqu'un ligand s'y fixe.

Selon une autre variante, la méthode de criblage sur support solide permet également d'identifier des ligands du récepteur Smoothened qui ne se lient pas à un site de liaison Smo ; l'action activatrice ou inhibitrice de ces ligands peut être caractérisée par les méthodes qui suivent.

La présente invention se rapporte aussi à une méthode d'identification d'agonistes du récepteur Smoothened, qui, en plus des étapes décrites pour la méthode d'identification de ligand, comprend les étapes additionnelles de mise en contact du ligand identifié avec une cellule qui présente une réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur Smoothened et de sélection des molécules agonistes capables d'induire ladite réponse cellulaire de ladite cellule.

Les cellules qui présentent une réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur Smoothened sont choisies parmi les lignées ou cultures primaires : cellules mésenchymateuses (par exemple, C3H10T1/2) répondant à une activation du récepteur Smoothened par la différenciation cellulaire mesurable par l'activité de la phosphatase alcaline ; cellules primaires granulaires du cervelet répondant à une activation du récepteur Smoothened par une prolifération cellulaire ; cellules souches du cerveau adulte ou des progéniteurs neuraux ou encore des cellules progénitrices présentes dans les tissus au cours du développement ou chez l'adulte pour lesquelles la réponse cellulaire peut, par exemple, consister en l'induction de gènes tels que ceux codants pour les facteurs de transcription de la famille des Gli, ou encore pour Patched ou Hip, gènes activés par la voie Hedgehog.

La présente invention se rapporte également à une méthode d'identification d'une molécule antagoniste du récepteur Smoothened comprenant les étapes suivantes :

- a) mise en culture de cellules qui présentent une réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur Smoothened avec au moins un composé de formule (I) de façon à induire ladite réponse cellulaire ;
- b) mise en contact des cellules obtenues à l'issue de l'étape a) avec une molécule à tester ;
- c) sélection des molécules induisant une inhibition de ladite réponse cellulaire desdites cellules.

La molécule dont on veut tester l'activité antagoniste du récepteur Smoothened peut notamment être un ligand se liant sur un site de liaison Smo du récepteur Smoothened identifié par l'une quelconque des méthodes précédentes d'identification de ligand selon l'invention.

La présente invention se rapporte encore à un kit permettant la mise en œuvre des méthodes selon l'invention comprenant au moins le récepteur Smoothened fonctionnel et au moins un composé de formule (I). Le récepteur Smoothened fonctionnel est soit présent sous forme d'extrait membranaire, soit dans des cellules qui présentent une réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur Smoothened.

Les expériences de liaison entre le récepteur Smoothened et un composé de formule (I) peuvent également être utilisées pour caractériser et identifier :

- de nouveaux types cellulaires exprimant le récepteur Smoothened dans une conformation où le site de liaison Smo est actif ;
- des récepteurs impliqués dans la différenciation, tels que des récepteurs apparentés au récepteur Smoothened.

L'invention se rapporte alors à une méthode d'identification de cellules, telles que des cellules tumorales, exprimant le récepteur Smoothened comprenant les étapes de :

- a) mise en contact de cellules à tester avec un composé de formule (I) marqué ;
- b) nettoyage des cellules afin d'éliminer ledit composé de formule (I) marqué qui ne se serait lié à aucun récepteur des cellules à tester ;
- c) détections des cellules marquées.

Les composés peuvent également servir à l'identification et à la caractérisation de nouveaux récepteurs ou de nouvelles formes de récepteurs impliqués dans la différenciation cellulaire, la prolifération, la mort cellulaire, la migration, la survie cellulaire ou encore permettant à la cellule d'acquérir une propriété ou un état qu'elle n'a pas encore atteint.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de synthèse, de caractérisation et d'évaluation de composés de formule (I) selon l'invention, et à leur marquage, ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels : la Figure 1 illustre l'activité du composé (7d) et des composés de référence dans différents tests cellulaires et sur la liaison de la bodipy-cyclopatamine (BC) au récepteur Smo. Les Figures 1A et 1B montrent l'activité des composés sur la différenciation des cellules C3H10T1/2 (Figure 1A), et sur la prolifération des PCGs de cervelet de rat (Figure 1B). Les courbes d'inhibition ont été générées avec des concentrations croissantes des molécules étudiées en présence de SAG (0.1 μ M, Figure 1A et 0.01 μ M, Figure 1B). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale induite par le SAG. La Figure 1C illustre l'inhibition de la liaison de la bodipy-cyclopatamine (BC) par les différents composés. Les cellules HEK-hSmo sont incubées avec la BC (5 nM) seule (contrôle) ou en présence d'une concentration croissante des molécules étudiées. La liaison de la BC est visualisée par microscopie à fluorescence et la courbe dose-réponse des composés est obtenue après quantification. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la liaison spécifique de la BC. Les données correspondent aux valeurs (moyennes \pm SEM) issues d'une expérience représentative de 2-4 expériences indépendantes,

- la Figure 2 représente la cinétique d'association du composé ^3H -(7d) à des membranes de cellules HEK-hSmo exprimant le récepteur Smoothened humain,
- la Figure 3 représente la courbe de saturation de la liaison du composé ^3H -(7d) au récepteur Smo exprimé dans les cellules HEK-hSmo à l'équilibre. Figure 3A : Les

membranes de cellules HEK-hSmo (2 µg de protéines) ont été incubées dans un volume final de 0.4 ml de tampon HEPES 0.2 % BSA avec des concentrations croissantes de composé ³H-(7d) pendant 3 heures à 37°C. La liaison non spécifique a été évaluée en présence de 1 µM de GDC-0449. L'analyse de la liaison spécifique donne des valeurs de K_d de 0.3 ± 0.1 nM et de B_{max} de 1086 ± 91 cpm. Les données sont les moyennes \pm SEM de triplicats (expérience représentative, n = 3). Figure 3B : Analyse de Scatchard de la liaison spécifique du composé ³H-(7d),

- la Figure 4 illustre l'inhibition de la liaison du composé ³H-(7d) au récepteur Smoothened humain exprimé dans les cellules HEK-hSmo. Les membranes de cellules HEK-hSmo (2 µg de protéines) ont été incubées pendant 3 heures à 37 °C dans un volume final de 0.4 ml de tampon HEPES (0.2 % BSA) avec 0.35 nM de composé ³H-(7d) seul ou en présence de concentrations croissantes de GDC-0449 (A), de composés (7d), MRT-83, LDE225 et de cyclopamine (B). Les données sont les moyennes \pm SEM de triplicats (expérience représentative, n = 2-3) et représentent la liaison totale du composé ³H-(7d) (A) ou le pourcentage de la liaison spécifique du composé ³H-(7d) déterminée en présence de 1 µM de GDC-0449 (B),

- la Figure 5 illustre l'inhibition de la liaison du composé ³H-(7d) au récepteur Smoothened humain exprimé dans les cellules HEK-hSmo par le SAG et la Purmorphamine. Les membranes de cellules HEK-hSmo (2 µg de protéines) ont été incubées dans un volume final de 0.4 ml de tampon HEPES (0.2 % BSA) avec 0.35 nM de composé ³H-(7d) seul ou en présence de concentrations croissantes de SAG ou de Purmorphamine pendant 3 heures à 37 °C. Les données sont les moyennes \pm SEM de triplicats (expérience représentative, n = 2-3) et représentent le % de la liaison spécifique du composé ³H-(7d) déterminée en présence de 1 µM de GDC-0449.

EXEMPLE 1 : PROTOCOLES DE SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DE DIFFÉRENTS COMPOSÉS SELON L'INVENTION

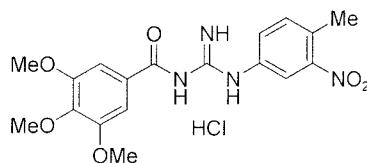
Les réactions ont été conduites sous atmosphère de gaz inerte (azote) en utilisant des techniques de Schlenk (standard). Les solvants ont été séchés selon des méthodes standards et distillés sous azote avant utilisation. Tous les réactifs ont été obtenus dans le commerce et utilisés tels quels sans purification préalable.

Les spectrométries de masse (ESI+) ont été enregistrées sur un spectromètre LC/MSD vendu sous la référence Agilent® 1100. Les spectres de résonance magnétique

nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un appareil Bruker® AC200 à 200 MHz (^1H) ou sur un appareil Bruker® AC400 à 400 MHz (^1H).

A/ Préparation d'un composé de formule IV

Préparation de la 3,4,5-triméthoxy-N-(N-(4-méthyl-3-nitrophényl)carbamimidoyl)benzamide (3)



3

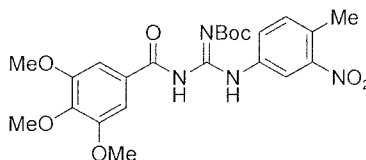
Une solution de cyanamide (2) (1.12 g, 4.77 mmol) et de 4-méthyl-3-nitroaniline (A1) sous forme de chlorhydrate [1.08 g, 5.72 mmol, préparé par l'addition de 1 éq. de HCl (2M dans Et₂O) à l'aniline dans le MeOH (10 mL), suivi d'une concentration sous vide pour obtenir une poudre] dans du toluène (50 mL) est chauffé à reflux pendant 6 heures sous agitation. Il se forme un solide. De l'Et₂O (50 mL) est ajouté pour favoriser la précipitation. Le solide est filtré et séché sous vide ; puis le solide est dissout dans une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ dans H₂O (30 mL). La solution aqueuse est extraite avec de l'Et₂O (2 x 50 mL). La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur du Na₂SO₄ et concentrée pour obtenir la nitro-guanidine (3) (1.22 g, 66%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 300 MHz) δ = 7.80 (brs, 1 H), 7.34-7.27 (m, 5 H), 3.90 (s, 9 H).

PM = 388 for C₁₈H₂₀N₄O₆ [ES/MS] m/z 389 [M + 1]⁺

B/ Préparation d'un composé de formule V

Préparation du tert-butyl (4-méthyl-3-nitrophenylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylène carbamate (4)



4

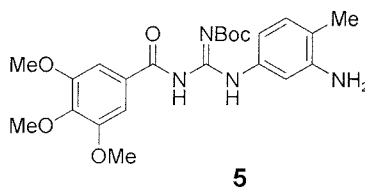
A une solution de guanidine sous forme de base (3) (3.16 g, 8.13 mmol) dans le THF (90 mL) est ajouté goutte à goutte une solution de Boc₂O (1.77g, 8.13 mmol) dans le THF (10 mL) à température ambiante et du DMAP (97 mg, 1 mmol) comme catalyseur. Après 1 heure d'agitation le composé de départ a été consommé. Le solvant est évacué sous vide, et le résidu purifié par chromatographie sur colonne en éluant avec un mélange AcOEt/Hept : 3/7. La Boc-guanidine est obtenue sous forme d'huile (4) (2.3 g, 58%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) d = 7.27 (s, 1 H), 7.09-7.04 (m, 3 H), 6.59 (m, 2 H), 3.82 (s, 3 H), 3.70 (s, 6 H), 2.17 (s, 4 H), 1.39 (s, 9 H).

PM = 488 for C₂₃H₂₈N₄O₈ [ES/MS] m/z 489 [M + 1]⁺

C/ Préparation d'un composé de formule VI

Préparation du *tert*-butyl (3-amino-4-méthylphénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylène carbamate (5)



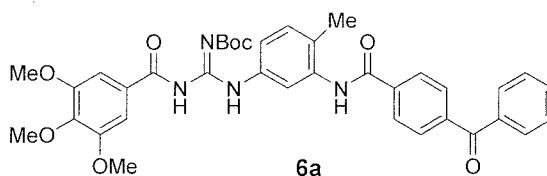
Dans un flacon, un mélange de Boc nitro-guanidine (4) (1.22 g, 2.5 mmol) dans du MeOH (80 mL) et du Pd/C 10% (100 mg) est agité sous H₂ à 50 psi pendant 10 heures. Le substrat de départ a disparu, le catalyseur est filtré et le solvant est évacué sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en éluant avec un mélange d'Hept/AcOEt : 7/3 pour obtenir le composé titre comme huile jaune (5) (840 mg, 73%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) d = 7.27 (s, 1 H), 7.09-7.04 (m, 3 H), 6.59 (m, 2 H), 3.82 (s, 3 H), 3.70 (s, 6 H), 2.17 (s, 3 H), 1.39 (s, 9 H).

PM = 458 for C₂₃H₃₀N₄O₆ [ES/MS] m/z 459 [M + 1]⁺

D/ Préparation de différents composé de formules (6) et (7)

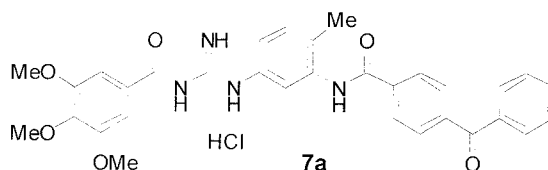
D- 1) Préparation du *tert*-butyl(3-(4-benzoylbenzamido)-4-méthylphénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylèncarbamate (6a)



A une solution de Boc guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.1 mL, 0.66 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 mL) est ajouté goutte à goutte une solution de chlorure d'acide (1a) (73 mg, 0.3 mmol) dans du CH₂Cl₂ (3 mL) à 0°C. Le milieu réactionnel est agité durant une nuit. De l'eau (15 mL) et du CH₂Cl₂ (10 mL) sont ajoutés. La phase organique est lavé avec de la saumure, séchée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne sur gel de silice en éluant avec un mélange d'Hept/AcOEt : 3/2. Le composé titre est obtenu sous la forme d'un solide blanc (6a) (142 mg, 70%, pF 96°C).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) d = 10.47 (brs, 1 H), 9.33 (brs, 1 H), 8.01-7.82 (m, 8 H), 7.55-7.53 (m, 3 H), 7.29-7.10 (m, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.71 (s, 6 H), 2.41 (s, 3 H), 1.44 (s, 9 H).

D- 2) Préparation de l'hydrochlorure de N-(N-(3-(4-benzoylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide (7a)

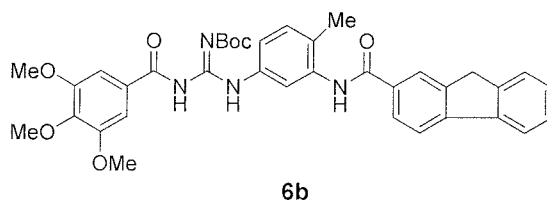


Une solution de Boc-guanidine (6a) (85 mg, 0.127 mmol) dans un mélange d'AcOH (1 mL) et de HCl concentré (0.5 mL) est mélangé durant une nuit. Le mélange de réaction est concentré sous vide, repris dans de l'Et₂O, et à nouveau concentré pour donner un solide blanc (7a) (72 m, 94%, pF 138°C).

¹H-NMR (MeOH, d₄, 400 MHz) d = 8.16 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7.93 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7.85-7.34 (m, 9 H), 3.97 (m, 6 H), 3.89 (s, 3 H), 2.43 (s, 3 H).

PM = 566 for C₃₂H₃₀N₄O₆ [ES/MS] m/z 567 [M + 1]⁺

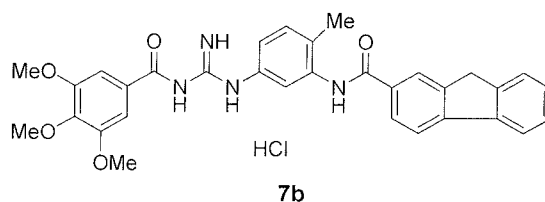
D- 3) Préparation du tert-butyl (3-(9H-fluorène-2-carboxamido)-4-méthylphénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylèncarbamate (6b)



A une solution de Boc-guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.05 mL, 0.36 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 mL) du chlorure d'acide (1b) (82 mg, 0.3 mmol) en solution dans du CH₂Cl₂ (3 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité durant une nuit, puis de l'eau (5 mL) et du CH₂Cl₂ (10 mL) sont rajoutés. La phase organique est traitée par de la saumure, séchée et concentrée sous vide. Le résidu huileux est purifié par chromatographie sur colonne en éluant avec un mélange d'Hept/Et₂O : 3/2 pour obtenir le composé titre (6b) (109 mg, 56%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) d = 10.47 (bs, 1 H), 9.37 (m, 1H), 8.07-7.02 (m, 13 H), 3.99 (s, 2 H), 3.81 (s, 3 H), 3.71 (s, 6 H), 2.41 (s, 3 H), 1.43 (s, 9 H)

D- 4) Préparation de l'hydrochlorure de N-(2-méthyl-5-(3-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)guanidino)phényl)-9H-fluorène-2-carboxamide (7b)

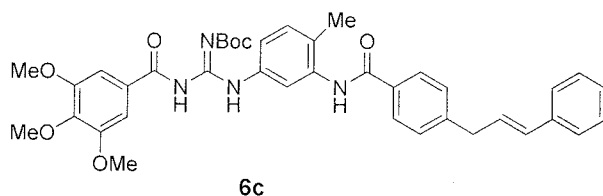


Le composé Boc (6b) (100 mg, 0.154 mmol) est mis en solution dans un mélange d'AcOH (1.1 mL) et de HCl concentré (0.55 mL). Le mélange est agité pendant 4 heures à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu solide est repris par de l'Et₂O, puis filtré pour récupérer un solide blanc (7b) (72 mg, 80%, pF 241°C)

¹H-NMR (DMSO, d₆, 400MHz) d = 12.24 (brs, 1 H), 11.53 (brs, 1 H), 10.2 (s, 1 H), 9.42 (brs, 1 H), 8.95 (brs, 1 H), 8.23-7.40 (m, 12 H), 4.05 (s, 2 H), 3.91 (s, 6 H), 3.78 (s, 3 H), 2.35 (s, 3 H).

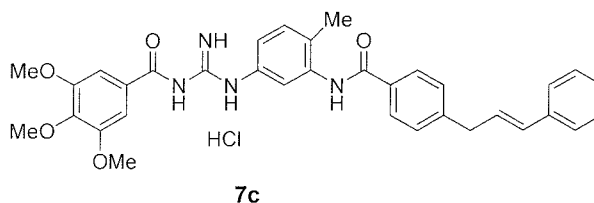
PM = 550 for C₃₂H₃₀N₄O₅ [ES/MS] m/z 551 [M + 1]⁺

D- 5) Préparation du tert-butyl (4-méthyl-3-(4-(3-phénylpropyl)benzamido)phénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylèncarbamate (6c)



A une solution de Boc-guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.1 mL, 0.66 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 ml) est ajoutée une solution du chlorure d'acide (1c) (73 mg, 0.3 mmol) dans du CH₂Cl₂ (3 mL) à température ambiante. Abandonner la réaction la nuit. Ajouter de l'eau (8 mL) et du CH₂Cl₂ (10 mL). Laver la phase organique avec une solution de NaCl saturée. Puis la phase organique est séchée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur colonne sur gel de silice en éluant avec un mélange d'AcOEt/Hept : 2/3. Le composé titre est obtenu sous forme d'un solide blanc (6c) (132 mg, 65%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz) δ = 10.47 (brs, 1 H), 9.37 (brs, 1 H), 8.02-7.01 (m, 18 H), 3.81 (s, 3 H), 3.69 (s, 6 H) 2.72-2.64 (m, 4 H), 2.05-1.92 (m, 2 H), 1.42 (s, 9 H)

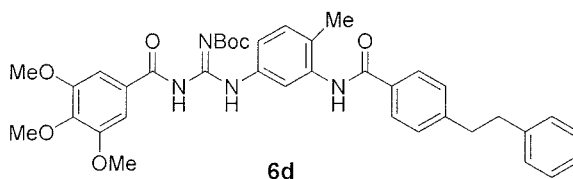


D- 6) Préparation de l'hydrochlorure de 3,4,5-triméthoxy-N-(N-(4-méthyl-3-(4-(3-phénylpropyl)benzamido)phényl)carbamimidoyl) benzamide (7c)

Une solution du composé Boc (6c) (116 mg, 0.17 mmol) dans un mélange d'AcOH (1.5 mL) et de HCL concentré (0.75 mL) est agitée à température ambiante pendant 4 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris dans de l'Et₂O. Le composé titre est récupéré comme un solide blanc (80 mg, 82%, pF 132°C).

PM = 580 pour C₃₄H₃₆N₄O₅ [ES/MS] m/z 581 [M + 1]⁺

D- 7) Préparation de tert-butyl (4-méthyl-3-(4-phénethylbenzamido)phénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylène carbamate (6d)



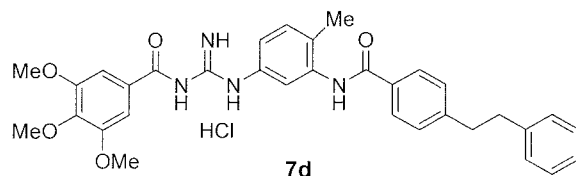
A une solution de Boc-guanidine utilisé comme base (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.06 mL, 0.45 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 mL) est ajoutée une solution de chlorure d'acide (1d) (80 mg, 0.33 mmol) à température ambiante. La solution est

agitée durant une nuit, et de CH_2Cl_2 est ajouté (10 mL), ainsi que de l' H_2O (10 mL). La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne sur gel de silice en éluant avec de l'AcOEt/Hept : 2/3 pour obtenir le composé titre (6d) sous forme de solide (150 mg, 75%, pF 161°C).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 10.47 (brs, 1 H), 9.37 (brs, 1 H), 8.02 - 7.68 (m, 4 H), 7.29-7.01 (m, 11 H), 3.81 (s, 3 H), 3.68 (s, 6 H), 3.01-2.96 (m, 4 H), 2.37 (s, 3 H) 1.42 (s, 9 H).

PM = 666 pour $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7$ [ES/MS] m/z 667 [M + 1]⁺

D- 8) Préparation de l'hydrochlorure de 3,4,5-triméthoxy-N-(N-(4-méthyl-3-(4-phényéthylbenzamido)phényl)carbamimidoyl)benzamide (7d)

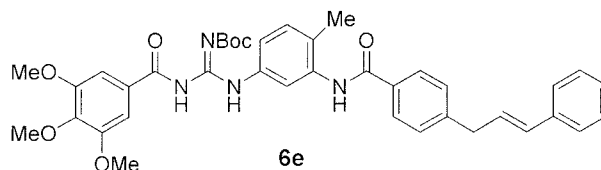


Une solution de l'adduit Boc (6d) (120 mg, 0.18 mmol) dans un mélange d'AcOH (1.3 mL) et de HCl concentré (0.66 mL) est agitée à température ambiante pendant 4 heures. Le solvant est évaporé sous vide, et le résidu repris avec de l'Et₂O (10 mL) et filtré pour obtenir une poudre blanche (7d) (101 mg, 93%, mp 186°C).

$^1\text{H-NMR}$ (MeOH, d₄, 300 MHz) δ = 7.90 (d, 2 H J = 8 Hz), 7.52-7.16 (m, 12 H), 3.95 (s, 6 H), 3.87 (s, 3 H), 3.03-2.99 (m, 4 H), 2.38 (s, 3 H).

PM = 566 for $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5$ [ES/MS] m/z 567 [M + 1]⁺

D- 9) Préparation du *tert*-butyl (3-(4-cinnamylbenzamido)-4-méthylphénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylèncarbamate (6e)

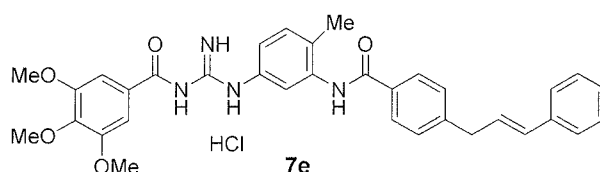


A une solution de Boc-guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.1 mL, 0.66 mmol) dans du CH_2Cl_2 (10 ml) est ajoutée une solution du chlorure d'acide (1e) (73 mg, 0.3 mmol) dans du CH_2Cl_2 (3 mL) à température ambiante. Abandonner la réaction la nuit. Ajouter de l'eau (8 mL) et du CH_2Cl_2 (10 mL). Laver la phase organique avec une

solution de NaCl saturée. Puis la phase organique est séchée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur colonne sur gel de silice en éluant avec un mélange d'AcOEt/Hept : 1/4. Le composé titre est obtenu sous forme d'un solide blanc (6e) (142 mg, 70%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ = 10.47 (brs, 1 H), 9.36 (brs, 1 H), 8.02-7.01 (m, 17 H), 6.51-6.32 (m, 2 H), 3.81 (s, 3 H), 3.69 (s, 6 H), 3.62 (m, 2 H), 2.36 (s, 3 H), 1.42 (s, 9 H)

D- 10) Préparation de l'hydrochlorure de (E)-N-(N-(3-(4-cinnamylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide (7e)

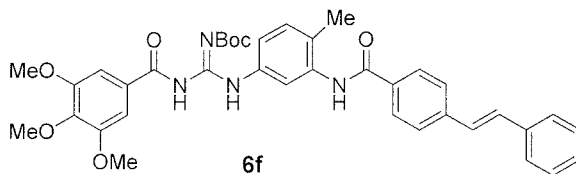


Une solution du composé Boc (6e) (122 mg, 0.15 mmol) dans un mélange d'AcOH (1.5 mL) et de HCL concentré (0.75 mL) est agitée à température ambiante pendant 4 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris dans de l'Et₂O. Le composé titre est récupéré sous forme de solide blanc (7e) (101 mg, 91%, pF 127°C).

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD, d₄, 400MHz) δ = 7.98-7.94 (m, 2 H), 7.52-7.28 (m, 12 H), 6.49-6.43 (m, 2 H), 3.95 (s, 6 H), 3.65 (s, 3 H), 3.66-3.64 (m, 2 H), 2.38 (s, 3 H).

PM = 578 for C₃₄H₃₄N₄O₅ [ES/MS] m/z 579 [M + 1]⁺

D- 11) Préparation du tert-butyl (4-méthyl-3-(4-styrylbenzamido)phénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido)méthylèncarbamate (6f)

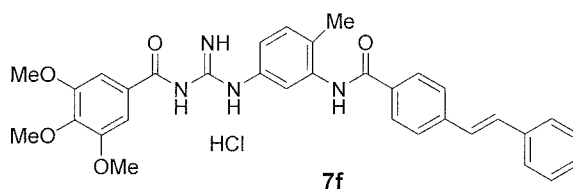


A une solution de Boc guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.1 mL, 0.66 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 mL) est ajoutée une solution du chlorure d'acide (1f) dans du CH₂Cl₂ (3 mL), puis le milieu réactionnel est laissé à réagir pendant une nuit. De l'eau (10 mL) et du CH₂Cl₂ (15 mL) sont ensuite ajoutés. La phase organique est décantée et lavée avec une solution de NaCl (saturée dans H₂O), séchée, évaporée et purifiée par

chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange d'AcOEt/Hept : 3/7, pour obtenir le composé titre sous forme d'un solide blanc (6f) (130 mg, 65%, Mp 166°C).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ = 10.47 (brs, 1 H), 9.35 (brs, 1 H), 8.02-7.09 (m, 17 H), 3.81 (s, 3 H), 3.71 (s, 6 H), 2.39 (s, 3 H), 1.43 (s, 9 H).

D- 12) Préparation de l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamido) (7f)

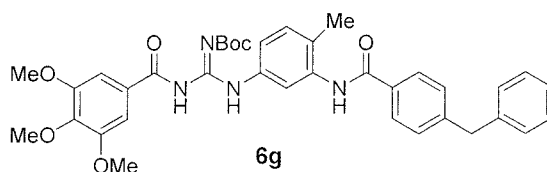


Une solution de composé Boc (6f) (120 mg, 0.18 mmol) dans un mélange d'AcOH (3 mL) et de HCl concentré (1.5 mL) est agitée à température ambiante pendant 2 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris avec de l'Et₂O pour obtenir un solide blanc (70 mg, 70%, pF 221°C).

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD, d₄, 300MHz) δ = 8.02-7.29 (m, 16 H), 3.94 (s, 6 H), 3.87 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H).

PM = 564 for C₃₅H₃₂N₄O₅ [ES/MS] m/z 565 [M + 1]⁺

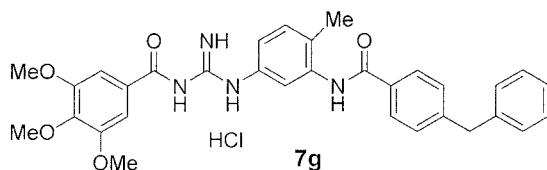
D- 13) Préparation du *tert*-butyl (3-(4-benzylbenzamido)-4-méthylphénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido) méthylèncarbamate (6g)



A une solution de Boc-guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.1 mL, 0.66 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 mL) est ajoutée une solution du chlorure d'acide (1g) (73 mg, 0.3 mmol) dans du CH₂Cl₂ (3 mL) à température ambiante. Le mélange est laissé à réagir durant une nuit. De l'eau (8 mL) et du CH₂Cl₂ (10 mL) sont ensuite ajoutés. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée, puis séchée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur colonne sur gel de silice en éluant avec un mélange d'AcOEt/Hept : 1/8. Le composé titre est obtenu sous forme d'un solide blanc (6g) (144 mg, 71%, pF 105°C).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ = 10.47 (brs, 1 H), 9.35 (brs, 1 H), 8.01-7.07 (m, 16 H), 4.06 (s, 2 H), 3.80 (s, 3 H), 3.68 (s, 6 H), 2.31 (s, 3 H).

D- 14) Préparation de l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide (7g)

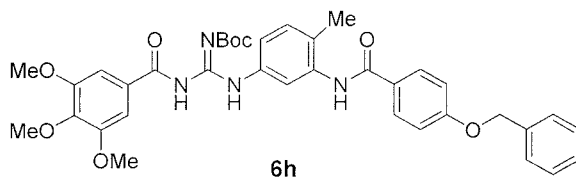


Une solution du composé Boc (7e) (103 mg, 0.15 mmol) dans un mélange d'AcOH (1.5 mL) et de HCL concentré (0.75 mL) est agitée à température ambiante pendant 4 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris dans de l'Et₂O. Le composé titre est récupéré sous forme de solide blanc (7g) (85 mg, 90%, pF 112°C).

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD, d4, 400MHz) δ = 7.95 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.53-7.23 (m, 12 H), 4.09 (s, 2 H), 3.36 (s, 6 H), 3.86 (s, 3 H), 2.39 (s, 3 H).

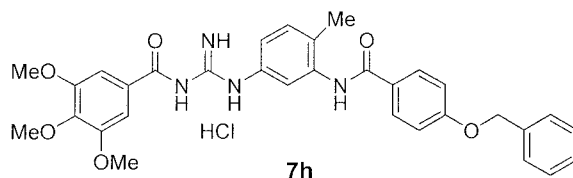
PM = 552 for C₃₂H₃₂N₄O₅ [ES/MS] m/z 553 [M + 1]⁺

D- 15) Préparation du *tert*-butyl (3-(4-(benzyloxy)benzamido)-4-méthylphénylamino) (3,4,5-triméthoxybenzamido)méthylèncarbamate (6h)



A une solution de Boc-guanidine (5) (137 mg, 0.3 mmol) et de triéthylamine (0.1 mL, 0.66 mmol) dans du CH₂Cl₂ (10 ml) est ajoutée une solution du chlorure d'acide (1h) (73 mg, 0.3 mmol) dans du CH₂Cl₂ (3 mL) à température ambiante. Le mélange est laissé à réagir durant une nuit. De l'eau (8 mL) et du CH₂Cl₂ (10 mL) sont ensuite ajoutés. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée, puis séchée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur colonne sur gel de silice en éluant avec un mélange d'AcOEt/Hept : 1/4. Le composé titre est obtenu sous forme d'un solide blanc (6h) (103 mg, 68%, pF 94°C).

D- 16) Préparation de l'hydrochlorure de N-(N-(3-(4-(benzyloxy)benzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide (7h)



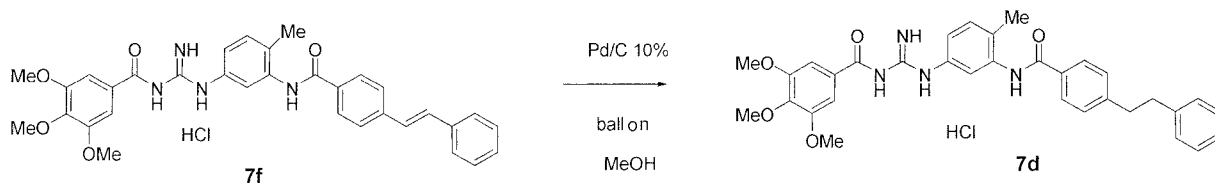
Une solution du composé Boc (6h) (116 mg, 0.18 mmol) dans un mélange d'AcOH (1.5 mL) et de HCL concentré (0.75 mL) est agitée à température ambiante pendant 4 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris dans de l'Et₂O. Le composé titre est récupéré sous forme de solide blanc (7h) (80 mg, 82%, pF 192°C).

¹H-NMR (MeOH, d₆, 300MHz) δ = 8.02-7.99 (m, 2 H), 7.54-7.16 (m, 11 H), 5.23 (s, 2 H), 3.97 (s, 6 H), 3.88 (s, 3 H), 2.39 (s, 3 H)

PM = 568 for C₃₂H₃₂N₄O₆ [ES/MS] m/z 569 [M + 1]⁺

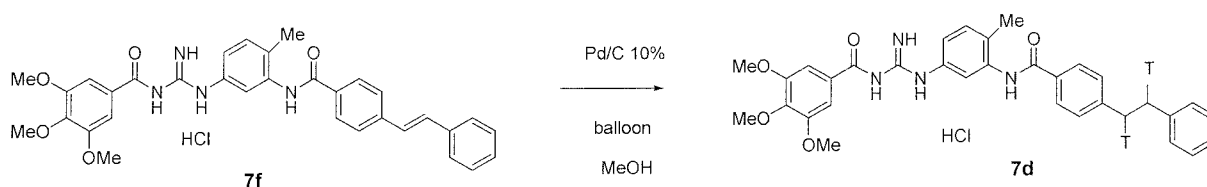
E/ Radio-marquage de composés de formule (I)

E- 1) Hydrogénation du composé (7f) en composé (7d)



Une solution du composé (7f) sous forme de sel de chlorhydrate (5 mg, 0.08 mmol) dans du MeOH et du Pd/C (10%) est agitée sous hydrogène (ballon) pendant 4 heures. Le mélange est ensuite filtré et concentré sous vide pour obtenir le composé (7d) sous forme de sel de chlorhydrate.

PM = 566 for C₃₃H₃₄N₄O₅ [ES/MS] m/z 567 [M + 1]⁺ et 565 [M-1]⁺

E- 2) Tritiation du composé (7f) en ^3H -(7d)

Dans un ballon de 5 mL le composé (7f) (2.5 mg, 0.04 mmol) est dissout dans du MeOH (1 mL) et la solution est refroidi (azote liquide). Le catalyseur (Pd/C 10%) est dispersé à la surface. Une fois le vide fait dans le ballon, du tritium gaz est introduit jusqu'à atteindre une pression de 30 psi. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 heures. Le catalyseur est filtré et l'excès de tritium est évacué sous vide avec du MeOH. Le produit (7d) est obtenu directement sans purification.

Caractéristique du composé [^3H]- (7d) :

- Pureté : > 98% (HPLC)
- Activité Spécifique : 38.1 Ci/mmol (1.41 TBq/mmol)
- Concentration : 1.0 mCi/ml (37 MBq/ml)

Données chromatographiques :

- Colonne HPLC : Macherey + Nagel Nucleodur Gravit[®] C8, (5 flm), 4.6 x 150 mm
- Phase mobile : A : eau 0.05% TFA ; B : MeCN 0.05% TFA
- Gradient : 0 min 30 % B; 10 min 95% B; 14 min 95% B; 14 min 95% B; 14.5 min 30 %
- Débit : 1.0 ml/min
- Echantillon : 1,30 mCi/ml en Methanol (48 .1 MBq/ml)
- Injection : 5.0 μl (6.5 μCi , 240 KBq)
- Détection UV : 254 nm
- Température : 30°C
- Radio-détecteur : Berthold LB 513
- Cocktail: Zinsser Quicksz int Flow 302
- Débit : 2.0 mL/min
- Temps de rétention : 7.17 min (UV) ; 7.30 min (radio-détecteur) (le décalage entre les deux temps de rétention est du à l'installation en série des 2 détecteurs).

EXEMPLE 2 : MISE EN ÉVIDENCE DE L'EFFET MODULATEUR DES COMPOSÉS DE FORMULE (I) SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DES PROTÉINES HEDGEHOG ET DE LEUR FIXATION SUR LE RECEPTEUR SMOOTHENED.

L'effet des composés de formule (I) conformes à l'invention sur l'inhibition de la voie de signalisation des protéines Hedgehog a été déterminé *in vitro* par analyse de la différenciation de la lignée de cellules fibroblastiques pluripotentes C3H10T1/2 après activation de cette voie dans ces cellules par un activateur synthétique : le SAG. L'activité du composé X a également été évaluée sur la croissance d'une culture primaire de cellules granulaires du cervelet. La capacité de ce dernier composé à se lier au récepteur Smoothened de souris a également été déterminée par compétition avec la body-cyclopamine, un composé fluorescent dérivé de la cyclopamine et se fixant sur les domaines transmembranaires du récepteur, comme décrit par Chen *et al.*, Genes Dev., 2002, 16, 2743.

1- Matériels et méthodes

Inhibition de la voie Hedgehog par les composés de formule (I) sur les cellules C3H10T1/2 :

Les composés de formule (I) à tester ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde jusqu'à une concentration de 10 mM, puis stockés à une température de -20°C jusqu'à utilisation.

La lignée de cellules fibroblastiques pluripotentes C3H10T1/2 (ATCC) a été cultivée dans les conditions recommandées par l'ATCC. L'activation de ces cellules a été réalisée en utilisant 0.1 µM de SAG selon les méthodes décrites par Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99, 14071 et Frank-Kamenetsky *et al.*, J. Biol., 2002, 1, 10.

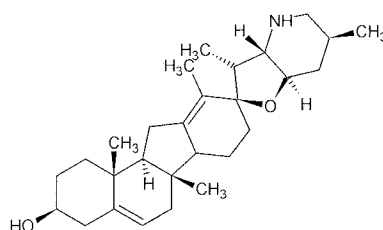
L'activation par le SAG provoque la différenciation de la lignée cellulaire et leur permet d'exprimer la phosphatase alcaline (PA). On a ainsi pu mesurer l'activité de la voie de signalisation des protéines Hedgehog via la mesure de l'activité phosphatase alcaline (PA).

Les cellules C3H10T1/2 ont étéensemencées sur des plaques de 96 puits à une densité de $5 \cdot 10^3$ cellules par puits, 24 heures avant l'addition des composés à tester à une concentration variant de 1 nM à 30 µM et en présence de 0.1 µM de SAG, en utilisant comme milieu de culture du DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) avec 10% de sérum de veau fœtal. Les essais ont été réalisés en quadruplate. Les plaques ont ensuite été incubées

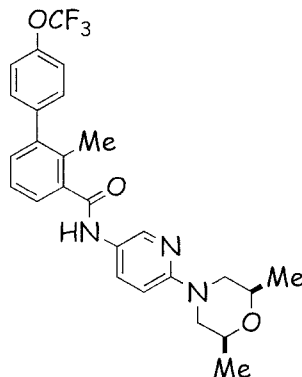
pendant 5 à 6 jours à une température de 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été lavées dans du tampon phosphate froid (« Phosphate Buffer Serum » : PBS), puis lysées par sonication à 4°C dans 50 µL d'une solution contenant 0.9% de NaCl et 0.2% de Triton X-100.

A titre comparatif, l'activité d'autres inhibiteurs connus de la voie de signalisation des protéines Hedgehog ont été testés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour tester les différents composés de formule (I) conformes à l'invention :

- la cyclopamine, telle que décrite par Incardona *et al.*, Development, 1998, 125, 3553, et répondant à la formule suivante :



- le MRT-83 décrit ci-dessus, et
 - le LDE225, tel que décrit par Pan et Dorsch ; ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1 : 130-134, et répondant à la formule suivante :



La mesure de l'activité phosphatase alcaline (PA) dans les lysats ainsi obtenus a ensuite été réalisée selon la méthode décrite par Pepinsky *et al.* (J. Biol. Chem., 1998, 273, 14037). Après addition de 100 µL de tampon réactionnel (200 mM Tris-HCl ; pH 10,5 ; 0,4 M de 2-amino-2-méthylpropanol et 8 mM de MgCl₂) et de 50 µL de substrat (4 mM de p-nitrophényl phosphate disodium), les lysats ont été incubés à 37°C pendant 30-60 min, puis la densité optique a été lue à une longueur d'onde de 415 nm.

Activité des composés de formule (I) sur la prolifération des précurseurs des cellules granulaires de cervelet :

Les précurseurs des cellules granulaires (PCG) sont isolés à partir de cervelets de rats (IFFA- CREDO, France), 8 jours après la naissance (P8). Les cervelets sont prélevés, coupés en petits morceaux, placés dans le tampon de Krebs-Ringer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 15 mM de glucose, 0.04 mM rouge de phénol) et incubés pendant 15 minutes à température ambiante dans un tampon de dissociation composé de Krebs-Ringer additionné de 250 mg/ml de trypsine (Sigma, France). La dissociation enzymatique est arrêtée par addition d'un volume égal de tampon Krebs-Ringer contenant 250 mg/ml d'un inhibiteur de trypsine et de 80 mg/ml de DNase (Sigma, France). Le tissu est centrifugé à 100 g pendant 10 secondes et le culot obtenu est remis en suspension et trituré à l'aide de pipettes pasteur de diamètre décroissant pour obtenir une suspension de cellules isolées. Cette suspension est centrifugée à 200 g pendant 5 minutes et le culot obtenu est remis en suspension dans du milieu Neurobasal supplémenté par 1 mM de pyruvate, 2 mM L-glutamine, pénicilline/streptomycine et 1% de supplément N2, 60 mg/ml N-acétyl cystéine et 100 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma, France).

Les PCG de cervelet obtenus sont transférés en plaques 96 puits préalablement traitées à la poly-D-lysine à une densité de 2.10^5 cellules/puits. Le SAG en présence ou non des autres composés testés est ajouté immédiatement. 12 heures avant la fin de la culture, la thymidine tritiée (³H-Thymidine) est ajoutée. Les cellules sont aspirées et récupérées sur un filtre en fibre de verre (GF/C) en utilisant un collecteur de cellules automatisé (Brandel, USA). La quantité de radioactivité incorporée par les cellules a été quantifiée en présence de scintillant dans un compteur à scintillation liquide (Wallac, USA).

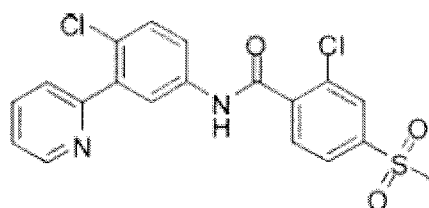
Compétition des composés de formule (I) avec la bodipy-cyclopropamine (BC) :

Des cellules de la lignée de HEK293 transfectées de façon stable avec le récepteur Smo humain sont utilisées. L'expérience a été menée selon le protocole décrit dans Roudaut *et al.*, Mol. Pharmacol. 79 : 453-460, 2011. L'inhibition de la liaison de la bodipy-cyclopropamine (BC) par les composés de formule (I) est mesurée par la décroissance de fluorescence photographiée et quantifiée à l'aide du logiciel Simple PCI 6.2 (Hamamatsu Corporation), puis rapportée à la surface des noyaux présents sur la photographie.

Test de radio-liaison du composé tritié ^3H -(7d) :

Le test de liaison se fait sur des membranes enrichies en récepteur Smoothened. Nous avons utilisé des cellules de la lignée de HEK-hSmo pour préparer ces membranes. Les cellules sont lavées et récupérées dans du PBS glacé. Après une centrifugation à 100 g pendant 7 minutes à 4°C, le culot est repris dans 10 fois son volume d'un tampon A glacé (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA) additionné de 10 μl d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Sigma) par ml de tampon, puis il est homogénéisé avec un broyeur Polytron. Après une centrifugation à 500 g pendant 30 minutes à 4°C qui permet d'éliminer les noyaux des cellules, le surnageant est à nouveau centrifugé à 48 000 g pendant 45 min à 4°C. Le culot est repris dans 2 ml de tampon A additionné de PIC puis la suspension est homogénéisée avec un broyeur conique en verre et passée à travers une aiguille de 23 G. Enfin, elle est aliquotée en tubes eppendorf et stockée à -80°C. La concentration de protéine totale de la préparation est déterminée par la méthode de Lowry utilisant la BSA pour réaliser la gamme étalon. Cette concentration est de 10.9 mg/ml.

Les membranes sont à nouveau suspendues dans un tampon (50 mM HEPES et 3 mM MgCl_2) contenant 0.2 % de BSA. Les expériences de liaison du ^3H -(7d) sont réalisées dans des tubes en polypropylène. Les membranes (2 μg de protéines) sont incubées avec le ^3H -(7d) en présence ou non des composés froids à tester pendant 3 heures à 37°C dans un volume final de 400 μl . L'incubation est stoppée en plongeant les tubes dans de l'eau glacée suivie d'une filtration rapide (Brandel) à travers une membrane de filtration fibres de verre (GF/C) traitée au préalable avec 0.3% de polyéthylèneimine qui permet de diminuer la liaison non spécifique du ^3H -(7d) à la membrane de filtration. La radioactivité retenue sur le filtre est mesurée en présence de 3 ml de scintillant dans un compteur à scintillation liquide. La liaison spécifique est définie comme la liaison pouvant être inhibée par 1 μM de GDC-0449 tel que décrit par Romer *et al.*, Cancer Cell, 2004, 6, 229 et répondant à la formule suivante :



2- Résultats sur l'activité biologiques des composés de formule (I)

Inhibition de la voie Hedgehog par les composés de formule (I) sur les cellules C3H10T1/2 :

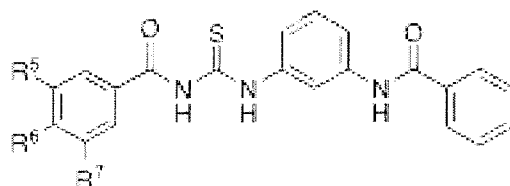
Des résultats obtenus avec des composés de formule (I) et les composés de référence cyclopamine, LDE225 et MRT-83 sont reportés dans le Tableau 1 ci-après. Pour chacun des composés la concentration qui permet d'inhiber 50% de l'activité phosphatase alcaline (PA) (CI_{50}) après induction par le SAG à 0.1 μ M a été évaluée. Les courbes d'inhibition obtenues avec le composé (7d) et les composés de référence sont montrées à la Figure 1A.

Tableau 1 : Activité des composés sur la différenciation des cellules C3H10T1/2.

Composés	CI_{50} (nM)
Cyclopamine*	620 \pm 30
GDC-0449*	10 \pm 1
LDE225*	22 \pm 3
MRT-83*	11 \pm 3
7a	32 \pm 11
7b	28 \pm 3
7c	39 \pm 9
7d	6 \pm 1
7e	57 \pm 2
7f	15 \pm 4
7g	220 \pm 25
7h	72 \pm 15

* : Composés de référence ne faisant pas partie de l'invention

L'activité du composé (7d) a également été comparée au composé MRT-10 et à différents composés thiourés (composés 20 à 27 ci-dessous). Les résultats sont résumés dans le Tableau 2.



- 20: R⁵ = R⁷ = OMe, R⁶ = H; 24: 2-OMe, R⁵ = R⁷ = H, R⁶ = OMe.
 21: R⁵ = R⁷ = OMe, R⁶ = OEt; 25: R⁵ = R⁶ = R⁷ = OEt;
 22: R⁵ = R⁶ = OEt, R⁷ = OMe; 26: R⁵-R⁶ = -OCH₂CH₂O-, R⁷ = H;
 23: R⁷ = OMe, R⁵-R⁶ = -OCH₂O-; 27: R⁵ = R⁶ = OMe, R⁷ = H

Tableau 2 : Activité comparées des composés (7d), MRT-10 et de composés thiourés sur la différenciation des cellules C3H10T1/2.

C3H10T1/2, (SAG 0.1 μ M)	
Composé	CI ₅₀ , μ M
7d	0.006 \pm 0.001
MRT-10	0.9 \pm 0.2
20	1.9 \pm 0.2
21	0.6 \pm 0.1
22	0.8 \pm 0.2
23	1.1 \pm 0.6
24	4.1 \pm 0.3
25	0.8 \pm 0.1
26	inactif
27	> 5

Moyenne \pm SEM : n \geq 3

Détermination de l'affinité des molécules sélectionnées sur la prolifération des précurseurs des cellules granulaires de cervelet de rat induite par le SAG :

Les PCGs du cervelet prolifèrent en réponse à l'activation de la voie de signalisation Shh, une réponse qui peut être inhibée par les antagonistes de Smo (Rohatgi *et al.*, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 : 3196-201). Nous avons donc analysé la capacité du composé (7d) à inhiber la prolifération des PCGs de cervelet de rat en culture primaire par une mesure d'incorporation de thymidine tritiée, un marqueur de l'ADN néosynthétisé au cours du processus de prolifération. Des concentrations croissantes de SAG provoquent une augmentation dose-dépendante de l'incorporation de la thymidine tritiée au dessus du niveau basal. Le composé (7d) présente des propriétés d'antagoniste complet avec une CI₅₀ de 0.45

nM sur la prolifération des PCGs induite par le SAG (0.01 μ M) (Figure 1B). Le LDE225, le composé MRT-83 et la cyclopamine bloquent également cette prolifération mais avec une affinité plus faible, leur CI_{50} est de 3, 6 et 103 nM respectivement (Tableau 3).

Détermination de l'affinité des molécules sélectionnées sur la liaison de la bodipy-cyclopamine (BC) au récepteur Smoothened :

Pour étudier les propriétés de liaison du composé (7d) à Smo, nous avons analysé si cette molécule pouvait entrer en compétition avec la liaison de la bodipy-cyclopamine (BC) (b) qui interagit avec Smo au niveau de ces domaines transmembranaires. Les cellules sont incubées pendant 2 heures avec la BC (5 nM) en présence ou en absence de différentes concentrations de composé (7d), MRT-83, LDE225 et cyclopamine. A la fin de l'incubation, les cellules sont fixées et colorées avec du DAPI, une molécule fluorescente de haute affinité pour l'ADN qui permet de visualiser les noyaux en bleu en microscopie à fluorescence. Les quatre molécules testées bloquent la liaison de la BC aux cellules HEK-hSmo, qui exprime de manière stable le récepteur Smo humain, de façon dose-dépendante. On observe que l'affinité du composé (7d) et du MRT-83 restent très proche et élevée (Figure 1C). Toutes ces données démontrent que le composé (7d) est un antagoniste puissant des récepteurs Smo humain et de souris (Tableau 1).

Tableau 3 : Activités comparées des composés (7d), MRT-83, LDE225, GDC-0449 et de la cyclopamine.

	$CI_{50} \pm SEM$ (nM)		
	Cellules C3H10T1/2 (2)	PCGs de cervelet de rat (3)	Liaison BC (4)
Composé (7d)	6 \pm 1	0.4 \pm 0.1	8 \pm 1
MRT-83	11 \pm 3	6 \pm 1	5 \pm 3
LDE225	22 \pm 3	3 \pm 1	8 \pm 2
GDC-0449	10 \pm 3	8 \pm 1	5 \pm 2
Cyclopamine	620 \pm 30	103 \pm 18	53 \pm 11

Les CI_{50} ont été déterminées par mesure de l'activité du rapporteur Gli-luciférase induite par ShhN (4 nM) dans les cellules Shh-Light2 (1), de l'activité de la phosphatase alcaline (PA) associée à la différenciation des cellules C3H10T1/2 induite par le

SAG (0.1 μM) (2), de l'activité proliférative des PCGs de cervelet de rat induite par le SAG (0.01 μM) suivie par l'incorporation de la ^3H -Thymidine (3), de la liaison de la bodipy-cyclopamine (BC) au récepteur Smo humain exprimé dans les cellules HEK-hSmo (4) (d'après les courbes de la Figure 1).

L'ensemble des expériences réalisées met en lumière la capacité des composés de formule (I) à moduler la voie Shh *in vitro*. Leur activité pourrait s'expliquer par une liaison à la protéine Smoothened sur un site concurrent de la bodipy-cyclopamine (BC).

3- Résultats sur les caractéristiques de liaison du radio-ligand ^3H -(7d)

Cinétique d'association du radio-ligand ^3H -(7d) au récepteur Smoothened humain :

Le composé (7d) est un antagoniste très puissant de la voie de signalisation Hh, ce qui nous a encouragés à synthétiser la forme tritiée de cette molécule : le composé ^3H -(7d). Nous avons commencé la caractérisation des propriétés de ce radio-ligand en étudiant la cinétique d'association de la liaison du composé ^3H -(7d) à des homogénats de membranes de cellules HEK293 exprimant de manière stable le récepteur Smo humain (HEK-hSmo). L'association du composé ^3H -(7d) a été examinée en présence d'une concentration fixe du ligand radioactif (0.35 nM) et d'une quantité fixe de récepteur (2 μg de protéines) à 25°C et 37°C pendant 5 heures. Dans cette expérience, il s'agit de déterminer le temps nécessaire pour que la liaison spécifique du composé ^3H -(7d) atteigne l'état d'équilibre. A 25°C, après 5 heures d'incubation, l'équilibre n'est pas atteint. A 37°C, l'équilibre est atteint après 3 heures d'incubation et se maintient après 5 heures d'incubation (Figure 2). Au-delà de 5 minutes d'incubation, la liaison non spécifique du composé ^3H -(7d) (définie en présence de 0.1 μM de GDC0449) est faible (0.4 % de la liaison totale) et reste stable tout au long de l'expérience.

Les membranes de cellules HEK-hSmo (2 μg de protéines) ont été incubées dans un volume final de 0.4 ml de tampon HEPES (0.2 % BSA) avec 0.35 nM de ^3H -(7d) pendant 5 h à 25°C (bleu) ou 37°C (rose). Les liaisons non spécifiques ont été évaluées en présence de 1 μM de GDC-0449, un antagoniste de référence de Smo. L'analyse par GraphPad Prism de la liaison spécifique donne un temps de demi-association de 33 min à 37°C et de 71 min à 25°C. Les données sont les moyennes \pm SEM de triplicats (expérience représentative, n=2).

Expérience de saturation de la liaison du composé ^3H -(7d) au récepteurSmoothened humain :

Les propriétés du composé ^3H -(7d) ont ensuite été caractérisées en étudiant la saturation de sa liaison au récepteur Smo exprimé dans les membranes des cellules de la lignée HEK-hSmo. Il s'agit de mesurer la liaison spécifique à l'équilibre, lors de l'incubation de concentrations croissantes du ligand radioactif, avec une quantité fixe de récepteur (2 μg de protéines). La saturation de la liaison spécifique du composé ^3H -(7d) au récepteur Smo exprimé dans les membranes des cellules HEK-hSmo, définie en utilisant 1 μM de GDC-0449, est illustrée à la Figure 3A. L'analyse de la courbe indique un seul site de liaison de haute affinité : $K_d = 0.3 \pm 0.1$ nM et $B_{\text{max}} = 1086 \pm 91$ cpm visualisés par la représentation de Scatchard (Figure 3B).

Afin de s'assurer que la liaison du composé ^3H -(7d) était bien spécifique au récepteur Smo, nous avons également réalisé cette expérience de saturation avec des membranes de cellules HEK293 non transfectées par l'ADNc codant pour le récepteur Smo humain. Le GDC-0449 (1 μM) n'a pas d'effet sur la liaison du composé ^3H -(7d) à ces membranes. La liaison du composé ^3H -(7d) aux membranes des cellules HEK-hSmo est donc bien spécifique du récepteur Smo.

Analyse pharmacologique de la liaison du composé ^3H -(7d) au récepteurSmoothened humain :

La pharmacologie de la liaison du composé ^3H -(7d) au récepteur Smo exprimé dans les membranes des cellules de la lignée HEK-hSmo a été analysée en présence d'antagonistes et d'agonistes de Smo. Dans cette expérience, le ligand froid entre en compétition avec le ligand radioactif pour sa liaison au récepteur, et l'affinité (K_i) de chaque ligand froid pour le récepteur peut être analysée à partir des CI_{50} déduites des courbes d'inhibition. Le composé (7d) froid est le plus puissant pour inhiber la liaison du composé ^3H -(7d) à Smo ($\text{CI}_{50} = 1.5$ nM). Les composés LDE225, GDC-0449 et MRT-83 présentent des valeurs de CI_{50} respectives de 4 nM, 12 nM et 11 nM. La concentration de 1 μM de GDC-0449 inhibe complètement la liaison spécifique du composé ^3H -(7d). La liaison non spécifique a été définie pour chaque expérience en présence de 1 μM de GDC-0449. La cyclopamine et le composé Cur61414 sont également capables d'inhiber la liaison du composé ^3H -(7d) mais avec une affinité très inférieure, notamment pour le Cur61414 avec une valeur de CI_{50} de l'ordre du micromolaire (Figure 4). Pour les agonistes, le SAG présente une affinité de l'ordre du nanomolaire ($\text{CI}_{50} = 5$ nM) alors que la Purmorphamine n'est pas

active ($CI_{50} > 1000$) (Figure 5). Les valeurs des K_i calculées pour les composés sont présentées dans le Tableau 3.

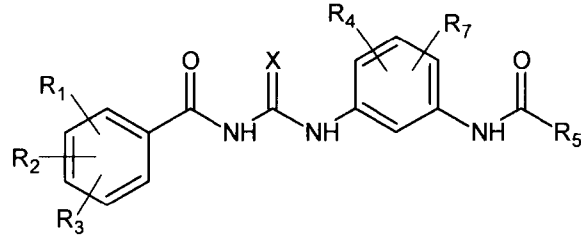
Tableau 4 : Affinités de molécules de référence vis-à-vis de la liaison du composé 3H -(7d) au récepteur Smoothened humain

	Liaison du composé 3H -(7d)	
	$CI_{50} \pm SEM$ (nM)	$K_i \pm SEM$ (nM)
Composé (7d)	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1
MRT-83	10.5 ± 2.5	4.8 ± 1.2
LDE225	4.2 ± 0.8	1.9 ± 0.3
Cyclopamine	30 ± 4	14 ± 2
GDC-0449	12 ± 5	6 ± 2
SAG	5.2 ± 0.8	2.4 ± 0.3
Purmorphamine	inactive	inactive

Les valeurs de CI_{50} et K_i ont été déterminées par mesure de la liaison du composé 3H -(7d) au récepteur Smo humain exprimé dans les cellules de la lignée HEK-hSmo. Les données sont les moyennes \pm SEM de 2-3 expériences représentatives.

REVENDEICATIONS

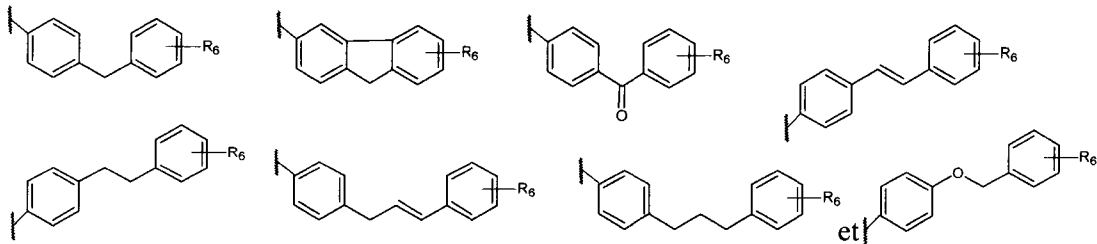
1. Composé caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

- R₁, R₂ et R₃, identiques ou différents et indépendamment les uns des autres, représentent un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical hydroxyle, un groupe alkyle, perfluoroalkyle, alcoxy, alkylthio ou nitrile,
- X représente O, S ou NH,
- R₄ et R₇, identiques ou différents et indépendamment l'un de l'autre, représentent un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un groupe alkyle,
- R₅ est choisi dans le groupe constitué par:



substitué par au moins un radical R₆ représentant un atome d'halogène ou un groupe alkyle, alcoxy, aminoalkyle, thioalkyle ou hydroxyle.

2. Composé de formule (I) selon la revendication 1, caractérisé en ce que R₁, R₂ et R₃ représentent un radical alcoxy.

3. Composé de formule (I) selon la revendication 1, caractérisé en ce que R₁, R₂ et R₃ représentent un radical méthoxy.

4. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que X est NH.

5. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R₄ et R₇ représentent un atome d'hydrogène ou de chlore, un groupe méthyle, éthyle ou isopropyle.

6. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que R₆ représente un atome d'halogène ou un groupe alcoxy ou aminoalkyle.

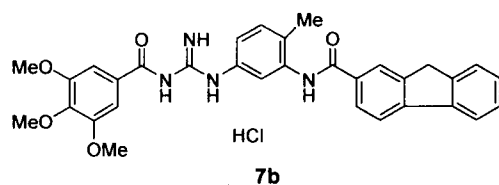
7. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzoylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



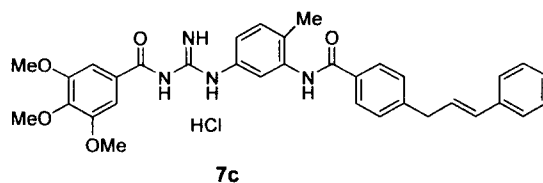
(Composé 7a) ;

- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzoylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



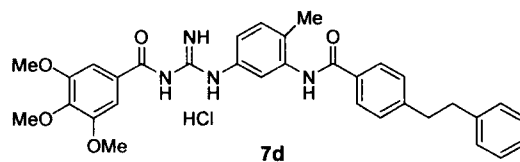
(Composé 7b) ;

- l'hydrochlorure de 3,4,5-triméthoxy-*N*-(*N*-(4-méthyl-3-(4-(3-phénylpropyl)benzamido)phényl)carbamimidoyl) benzamide de formule suivante :



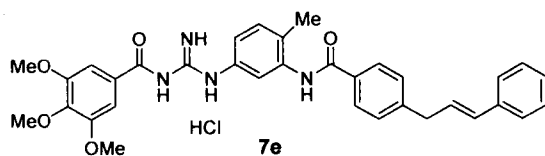
(Composé 7c) ;

- l'hydrochlorure de 3,4,5-triméthoxy-*N*-(*N*-(4-méthyl-3-(4-phénéthylbenzamido)phényl)carbamimidoyl)benzamide de formule suivante :

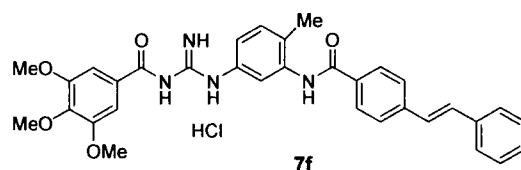


(Composé 7d) ;

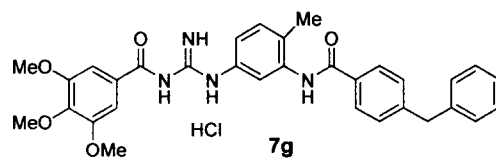
- l'hydrochlorure de (*E*)-*N*-(*N*-(3-(4-cinnamylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



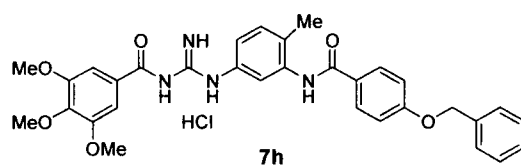
(Composé 7e) ;
- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-benzylbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



(Composé 7f) ;
- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-(E)-benzylidenbenzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



(Composé 7g) ; et
- l'hydrochlorure de *N*-(*N*-(3-(4-(benzyloxy)benzamido)-4-méthylphényl)carbamimidoyl)-3,4,5-triméthoxybenzamide de formule suivante :



(Composé 7h).

8. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour son application en tant que médicament pour le traitement de tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog.

9. Composé de formule (I) selon la revendication 8, caractérisé en ce que les tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog sont des tumeurs du tissu nerveux, des tumeurs cutanées, des tumeurs des tissus musculaires et osseux ou des tumeurs d'autres tissus.

10. Composé de formule (I) selon la revendication 8, caractérisé en ce que les tumeurs associées à une hyperactivation de la voie de signalisation des protéines Hedgehog sont choisie parmi des médulloblastomes, des tumeurs primitives neuroectodermiques, des glioblastomes, des méningiomes, des oligodendrogliomes, des carcinomes des basocellulaires,

des trichoépithéliomes, des rhabdomyosarcomes, des ostéosarcomes, des tumeurs du rein, des tumeurs de la vessie, des tumeurs de la prostate, des tumeurs du poumon, des tumeurs de l'estomac, des tumeurs du pancréas et une combinaison de ceux-ci.

11. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour son application en tant que médicament pour le traitement de pathologies de type neuro-dégénératif.

12. Composé de formule (I) selon la revendication 11, caractérisé en ce que les pathologies de type neuro-dégénératif sont la maladie de Parkinson, la Chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques ou la maladie du motoneurone.

13. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour son application en tant que médicament pour le traitement de maladies liées au développement cérébral, au traitement d'accident vasculaire cérébral, aux accidents cardiovasculaires, ou aux maladies des oligodendrocytes et des cellules de Schwann.

14. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour son application *in vitro* pour moduler le renouvellement des cellules souches humaines ou animales.

15. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour son application en tant que médicament pour le traitement du diabète.

16. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, au moins un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

17. Utilisation d'un composé de formule (I) marqué comme outil de recherche, ledit composé de formule (I) étant défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisé en ce que le composé de formule (I) est utilisé pour l'identification de molécules capables d'interagir avec le récepteur Smoothed ou un récepteur apparenté.

19. Procédé de radio-marquage d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de tritiation d'un composé de formule (I) sous une atmosphère de tritium ^3H , et ledit procédé comprenant une étape préalable d'halogénéation lorsque le composé de formule (I) est substitué par un groupe R_5 exempt de double liaison éthylénique.

20. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'au moins un de ses atomes d'hydrogène a été remplacé par un atome de tritium ^3H .

21. Méthode de criblage et/ou d'identification de ligands des sites de liaison Smo du récepteur Smoothened, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact du récepteur Smoothened et d'au moins un composé de formule (I) défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour l'obtention d'un complexe [Smo-composé de formule (I)] ;

b) mise en contact du récepteur Smoothened, dudit composé de formule (I) et d'une molécule à tester ;

c) détection d'une interaction entre ledit récepteur Smoothened et lesdites molécules à tester par comparaison du récepteur Smoothened récupéré à l'étape b) avec le complexe [Smo-composé de formule (I)] ; et

d) sélection desdites molécules à tester pour lesquelles une interaction avec le récepteur Smoothened est mesurée.

22. Méthode de criblage et/ou d'identification selon la revendication 21, caractérisée en ce que l'étape a) est mise en œuvre en phase liquide, et en ce que ladite méthode comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact du récepteur Smoothened et d'au moins un composé de formule (I) défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour l'obtention d'un complexe [Smo-composé de formule (I)] ;

b) mise en contact du récepteur Smoothened, dudit composé de formule (I) et d'une molécule à tester ;

c) récupération dudit récepteur Smoothened éventuellement lié à une ou plusieurs molécules à tester et/ou audit composé de formule (I) ;

d) détection d'une interaction entre ledit récepteur Smoothened et lesdites molécules à tester par comparaison du récepteur Smoothened récupéré à l'étape c) avec le complexe [Smo-composé de formule (I)] ; et

e) sélection desdites molécules à tester pour lesquelles une interaction est mesurée.

23. Méthode d'identification d'agonistes du récepteur Smoothened, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de la méthode telle que définie à la revendication 21 ou 22, et les étapes additionnelles suivantes :

- mise en contact du ligand identifié avec une cellule qui présente une réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur Smoothened, et
- sélection des molécules agonistes capables d'induire ladite réponse cellulaire de ladite cellule.

24. Méthode d'identification d'une molécule antagoniste du récepteur Smoothened, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) mise en culture de cellules qui présentent une réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur Smoothened avec au moins un composé de formule (I), défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, de façon à induire ladite réponse cellulaire ;
- b) mise en contact des cellules obtenues à l'issue de l'étape a) avec une molécule à tester ;
- c) sélection des molécules induisant une inhibition de ladite réponse cellulaire desdites cellules.

25. Méthode d'identification de cellules exprimant le récepteur Smoothened, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de cellules à tester avec un composé de formule (I) marqué, ledit composé de formule (I) étant défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ;
- b) nettoyage des cellules afin d'éliminer ledit composé de formule (I) marqué qui ne se serait lié à aucun récepteur des cellules à tester ;
- c) détections des cellules marquées.

26. Méthode d'identification selon la revendication 25, caractérisée en ce qu'elle permet d'identifier des cellules tumorales.

27. Méthode d'identification selon la revendication 25 ou 26, caractérisée en ce que le composé de formule (I) est marqué au tritium H³.

28. Kit caractérisé en ce qu'il comprend au moins un récepteur Smoothened fonctionnel et au moins un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

1/5

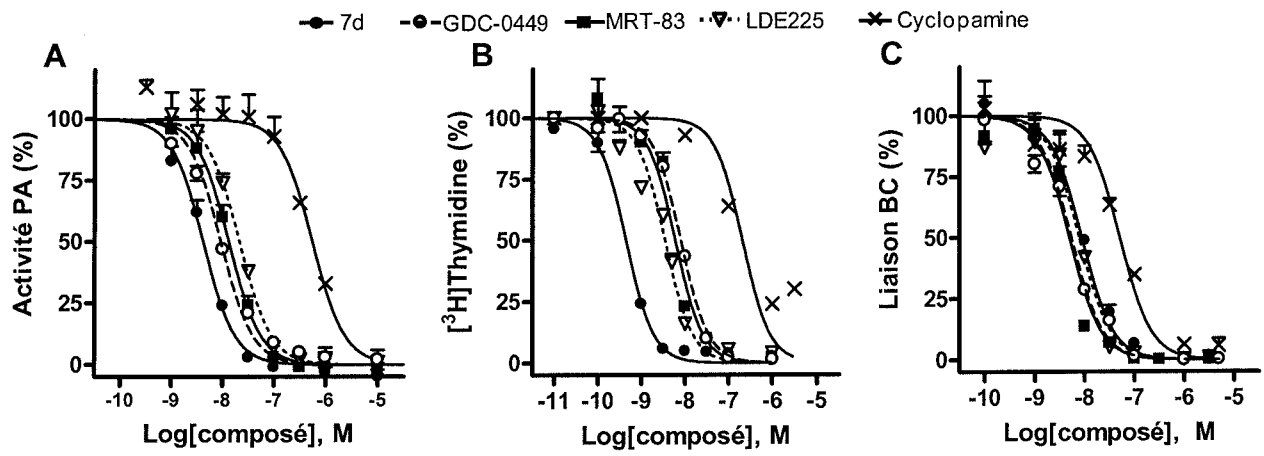


FIGURE 1

2/5

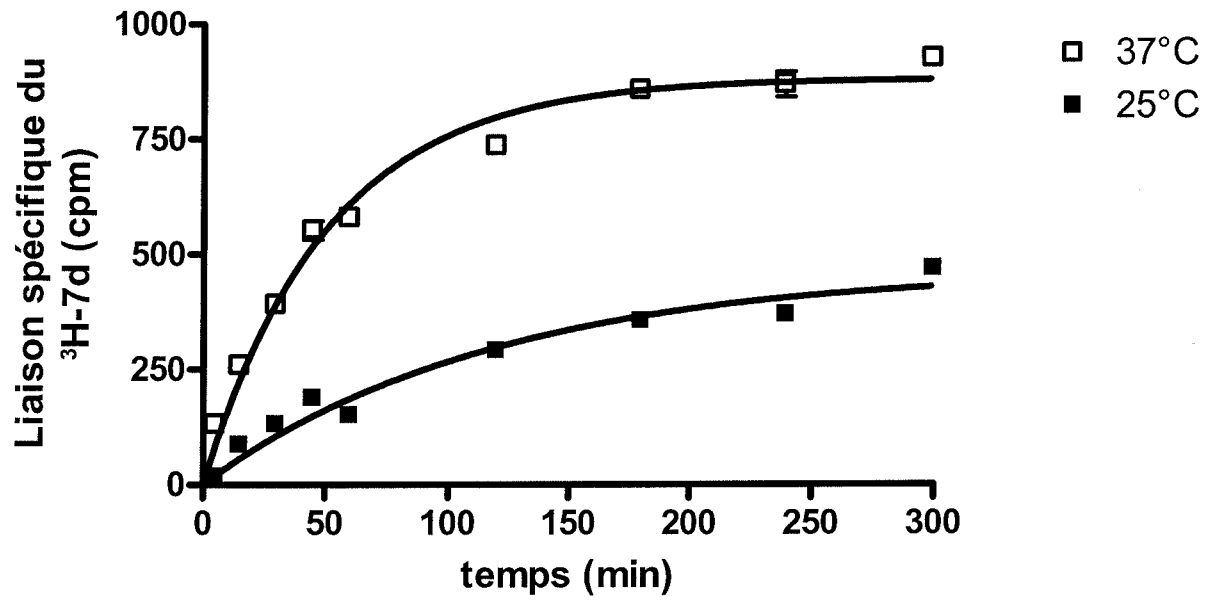


FIGURE 2

3/5

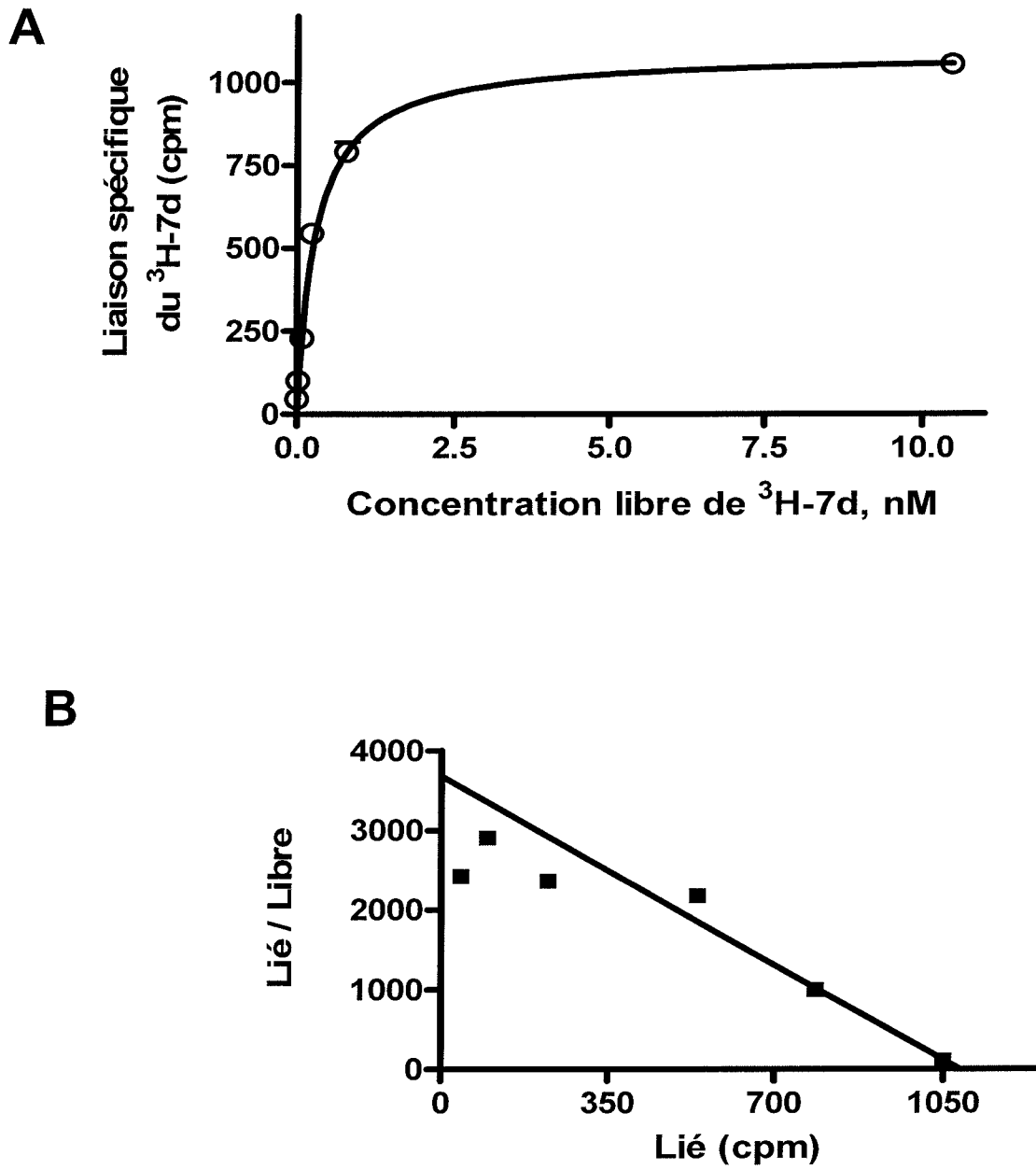


FIGURE 3

4/5

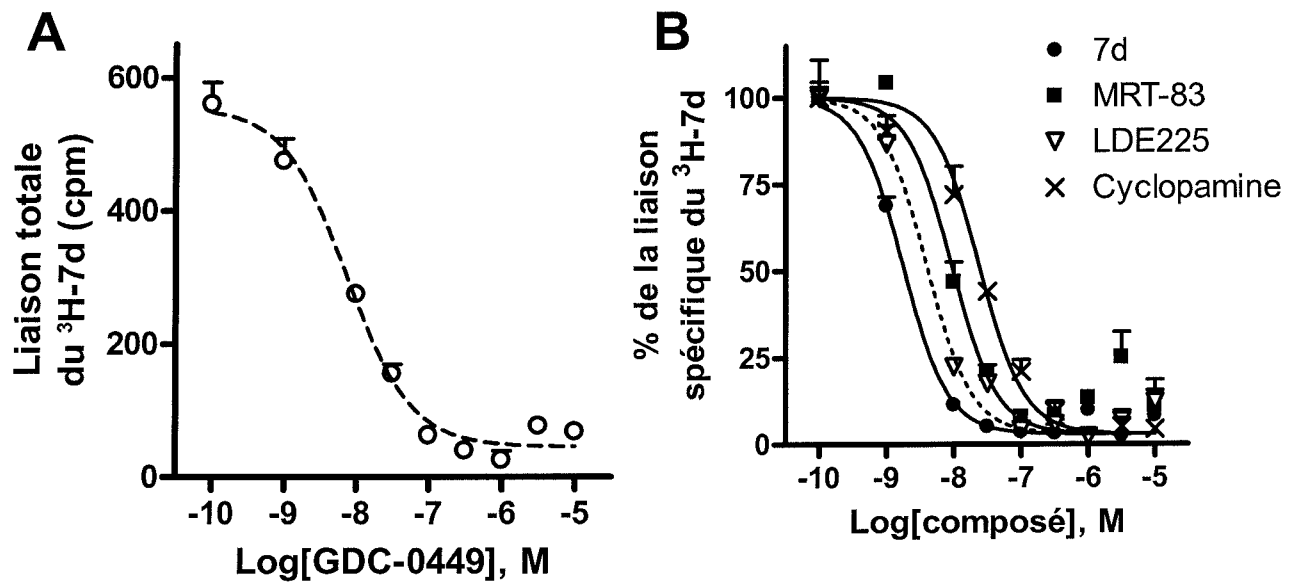


FIGURE 4

5/5

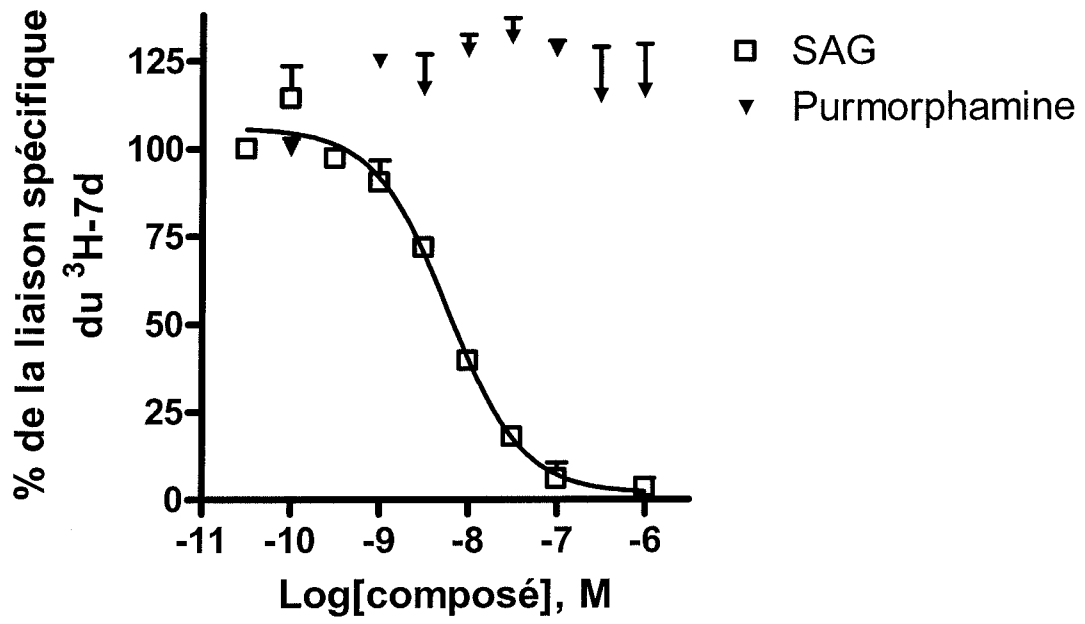
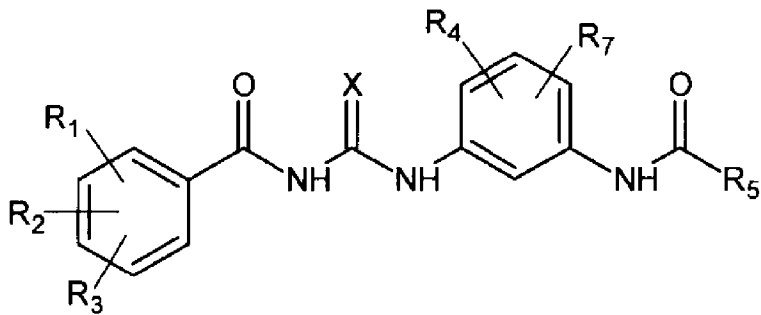


FIGURE 5



(I)