

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 378**

51 Int. Cl.:
C07D 417/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/428 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03771002 .7**
96 Fecha de presentación: **23.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1542997**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54 Título: **Derivados de pirazolilbenzotiazol y su uso como agentes terapéuticos**

30 Prioridad:
24.07.2002 US 398504 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.07.2012

73 Titular/es:
Dermira (Canada), Inc.
2055 Woodside Road, Suite 270
Redwood City, CA 94061, US

72 Inventor/es:
ZHANG, Zaihui;
DAYNARD, Timothy S.;
WANG, Shisen;
DU, Xinyao;
CHOPIUK, Gregory B.;
YAN, Jun;
CHEN, Jianxin y
SVIRIDOV, Serguei V.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 385 378 T3

DESCRIPCIÓN

Derivados de pirazolilbenzotiazol y su uso como agentes terapéuticos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a derivados y composiciones de pirazolilbenzotiazol, a composiciones farmacéuticas que contienen los derivados y a los derivados y composiciones de pirazolilbenzotiazol para uso como agentes terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 En los últimos años, ha quedado cada vez más claro que la muerte celular es tan importante para la salud de un organismo multicelular como la división celular; si existe la proliferación, también debe existir un medio para regular su descendencia celular. Mediante la división y diferenciación celular repetida durante el desarrollo o la reparación de tejido, se generan células excedentes o incluso células dañinas, y deben ser eliminadas o exterminadas. En adultos, las células senescentes son eliminadas y reemplazadas por células recién generadas para mantener la homeostasis.

15 La delicada interacción entre el crecimiento y la muerte celular en un organismo se refleja en el equilibrio molecular complejo que determina si una célula individual se somete a división, se obstaculiza en el ciclo celular o procede a muerte celular programada. Transducción de señales es la expresión que describe el proceso de conversión de señales extracelulares, tales como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, citocinas y otras, en una respuesta intracelular específica tal como expresión de genes, división celular o apoptosis. Este proceso comienza en la membrana celular, donde un estímulo externo inicia una cascada de reacciones enzimáticas dentro de la célula que típicamente incluyen fosforilación de proteínas como mediadores de procesos en dirección 3' que con alta frecuencia finalizan en un evento en el núcleo de la célula. Los controles y contrapesos de estas vías de transducción de señales pueden considerarse redes superpuestas de moléculas que interactúan y controlan puntos de control decisivos "go-no go". Dado que prácticamente todas las enfermedades conocidas exhiben aspectos disfuncionales en estas redes, ha habido un gran entusiasmo en investigaciones que ofrezcan dianas y agentes terapéuticos basados en componentes de transducciones de señales vinculados a la enfermedad.

25 La desregulación de la proliferación celular, o una falta de muerte celular apropiada, tiene amplias implicancias clínicas. Una serie de enfermedades asociadas con dicha desregulación incluye hiperproliferación, inflamación, remodelación y reparación de tejido. Las indicaciones familiares en esta categoría incluyen cáncer, restenosis, hiperplasia neointima, angiogénesis, endometriosis, trastornos linfoproliferativos, rechazo de injertos, poliposis, pérdida de la función neural en el caso de remodelación de tejido, y similares. Dichas células pueden perder el control regulador normal de la división celular, y pueden también no someterse a muerte celular apropiada.

35 En un ejemplo, las células endoteliales, células musculares y otras sufren apoptosis cuando pierden contacto con la matriz extracelular, o se unen a través de una integrina inapropiada. Este fenómeno, que ha sido denominado "anoikis" (término que en griego significa "sin hogar"), evita que las células epiteliales propagadas colonicen en cualquier otro sitio, protegiendo así contra neoplasias, endometriosis y similares. Es también un mecanismo importante en la etapa de cavitación inicial del desarrollo embrionario, en involución glandular mamaria, y se ha explotado para prevenir angiogénesis tumoral. Las células epiteliales pueden tornarse resistentes a anoikis a través de la activación excesiva de la señalización de integrina- La resistencia a anoikis también puede surgir de la pérdida de señalización apoptótica, por ejemplo, por expresión excesiva de Bcl-2 o inhibición de la actividad de caspasa.

40 Un aspecto de la hiperproliferación que con frecuencia se asocia al desarrollo de tumores es la angiogénesis. El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es esencial para las etapas posteriores del crecimiento de tumores sólidos. La angiogénesis es causada por la migración y proliferación de las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos.

45 En otro ejemplo, un grupo importante de enfermedades autoinmunitarias sistémicas se asocia con linfoproliferación anormal, como consecuencia de defectos en la terminación de la activación y el desarrollo de linfocitos. Con frecuencia, dichas enfermedades se asocian con inflamación, por ejemplo con artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino-dependiente, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y similares. Se han hecho avances recientes en la comprensión de las causas y consecuencias de estas anomalías. A nivel molecular, pueden ocurrir múltiples defectos, que producen una incapacidad de ajustar el mecanismo apoptótico funcional.

50 Es de gran interés médico y comercial desarrollar compuestos que inhiban las enfermedades hiperproliferativas, particularmente aquellos selectivamente dirigidos a las células indeseables.

Bibliografía relacionada:

55 La regulación de cinasa vinculada a integrina por fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato es descrita por Delcommenne et al. (1998) Proc Natl Acad Sci 95;11219-6. Los nitrilos activados en síntesis heterocíclicas se analizan en Kandeel et al (1985) J. Chem. Soc. Perkin. Trans 1499.

como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable, donde:

5

R^4 se selecciona de hidrógeno; y

10

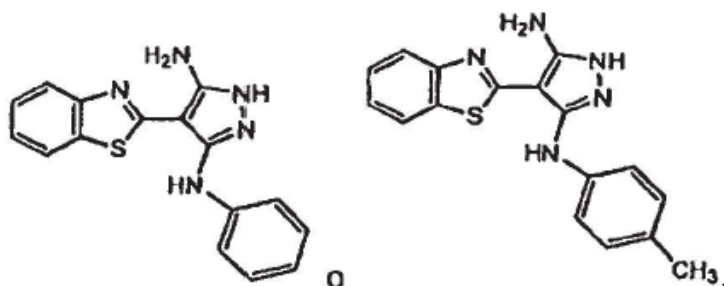
15

donde el resto hidrocarbilo de heteroalquilo es hidrocarbilo C₁₋₁₅:

20

heteroarilo es un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre:

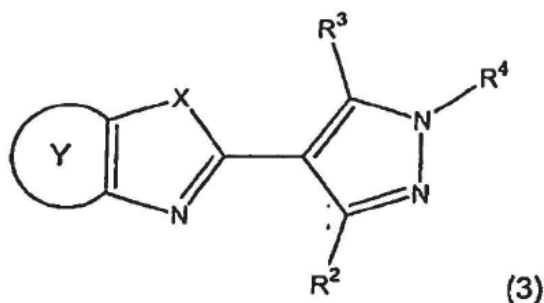
con la salvedad de que el compuesto de Fórmula (2) no sea:



25

30

Se describen otros compuestos de fórmula (3):



como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros, o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable; donde: R² y R³ en cada

caso se seleccionan independientemente entre amino, aminosulfonilo, aminosulfonilo, arilo, azido, halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidrocarbilo, hidrógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido; R^4 se selecciona entre hidrógeno, heteroalquilo, heteroarilo e hidrocarbilo; X se selecciona entre S, O y NR^9 , y R^9 se selecciona entre hidrógeno, heteroalquilo, heteroarilo e hidrocarbilo; Y es un heterociclo de 6 miembros que tiene 1 o 2 átomos de nitrógeno y que está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre amino, aminosulfonilo, aminosulfonilo, arilo, azido, halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidrocarbilo, hidrógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

La presente invención provee nuevos compuestos, composiciones y métodos expuestos dentro de esta memoria. En general, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por el experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención, a menos que se indique claramente algo distinto. Para aclaración, a continuación se enumeran las definiciones de determinados términos y expresiones empleados en esta memoria para describir la presente invención. Estas definiciones rigen para los términos y expresiones utilizados en la presente memoria, a menos que se indique claramente otra cosa.

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS Y EXPRESIONES

Tal como se emplean en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "un compuesto" se refiere a uno o más de dichos compuestos, mientras que "la enzima" incluye una enzima particular y también otros miembros de la familia y sus equivalentes, como es de conocimiento de los expertos en la materia. Tal como se emplean en la presente memoria y en las reivindicaciones anejas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos y expresiones tienen el significado que se indica:

"Alquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada monovalente lineal o ramificada que consiste exclusivamente en átomos de carbono e hidrógeno, no contiene insaturación, tiene entre uno y ocho átomos de carbono, y está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, p. ej., metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (iso-propilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo) y similares. A menos que se indique específicamente lo contrario, se entiende que para radicales, como se define a continuación, que contienen un grupo alquilo o alqueno sustituido, la sustitución puede tener lugar en cualquier carbono del grupo alquilo.

"Cadena de alqueno" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, divalente, que consiste exclusivamente en carbono e hidrógeno, no contiene insaturación y tiene entre uno y ocho átomos de carbono, p. ej., metileno, etileno, propileno, n-butileno y similares.

"Alqueno" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, monovalente, que consiste exclusivamente en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un doble enlace, que tiene entre dos y ocho átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, p. ej., etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo y similares.

"Alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula $-OR_a$ en la que R_a es un radical alquilo como se definió anteriormente, p. ej., metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxí (iso-propoxi), n-butoxi, n-pentoxi, 1,1-dimetiletoxí (t-butoxi) y similares.

"Arilo" se refiere a un radical fenilo o naftilo. A menos que se indique específicamente algo distinto en la memoria, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (como en "aralquilo") tiene como fin incluir radicales arilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, hidroxí, halo, haloalquilo, haloalcoxi, amino y carboxi como se define en la presente memoria.

"Aralquilo" se refiere a un radical de la fórmula $-R_aR_b$ en la que R_a es un radical alquilo como se definió anteriormente y R_b es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, p. ej., bencilo, difenilmetilo y similares. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido como se describió anteriormente.

"Aralqueno" se refiere a un radical de la fórmula $-R_eR_b$ en la que R_b es un radical arilo como se definió anteriormente y R_e es un radical alqueno como se definió anteriormente, p. ej., 2-feniletieno y similares.

"Carboxi" se refiere al radical $-C(O)OH$.

"Cicloalquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente, monocíclico o bicíclico, que consiste exclusivamente en átomos de carbono e hidrógeno, que tiene entre tres y diez átomos de carbono, y que está saturado y unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, decalinilo y similares. A menos que se indique específicamente algo distinto en la memoria, el término "cicloalquilo" tiene como fin incluir radicales cicloalquilo que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes

independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo, alcoxi, halo, haloalquilo, haloalcoxi, hidroxi, amino y carboxi.

"Halo" se refiere a bromo, cloro, yodo o fluoro.

- 5 "Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se definió anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se definió anteriormente, p. ej., trifluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1-bromometil-2-bromoetilo y similares.

"Haloalcoxi" se refiere a un radical de la fórmula $-OR_c$ en la que R_c es un radical haloalquilo como se definió anteriormente, p. ej., trifluorometoxi, difluorometoxi, triclorometoxi, 2,2,2-trifluoroetoxi, 1-fluorometil-2-fluoroetoxi, 3-bromo-2-fluoropropoxi, 1-bromometil-2-bromoetoxi y similares.

- 10 "Heterociclilo" se refiere a un radical de anillo de 3 a 15 miembros, estable, que consiste en átomos de carbono y entre uno y cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Para los fines de la presente invención, el radical heterociclilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados o puente; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado;
- 15 y el radical heterociclilo puede ser aromático o parcial o totalmente saturado. El radical heterociclilo puede no estar unido al resto de la molécula en cualquier átomo del heteroátomo. Los ejemplos de dichos radicales heterociclilo incluyen, aunque sin limitarse a ello, azepinilo, acridinilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzopiranoilo, benzopiranoilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo, carbazolilo, cinnolinilo, decahidroisoquinolilo, dioxolanilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, indolizínilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, oxiranilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirrolidinilo, pirazolilo, pirazolidinilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinuclidinilo, isoquinolinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tetrahidrofurilo, triazinilo, tetrahidropiranoilo, tienilo, tiamorfolinilo, sulfóxido de tiamorfolinilo y sulfona de tiamorfolinilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria, el término "heterociclilo" tiene como fin incluir radicales heterociclilo según se definió anteriormente, que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxi, halo, alquilo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, nitro, ciano, amino y carboxi. Los radicales heterociclilo preferidos para R_5 son aquellos radicales seleccionados del grupo que consiste en furanilo, isooxazolilo, piridinilo, tienilo, pirrolilo, quinolinilo, benzotienilo, benzodioxolilo, benzoaxadiazolilo, pirazol, tiadiazolilo y quinoxalinilo.
- 20
- 25
- 30

- "N-heterociclilo" se refiere a un radical heterociclilo según se definió anteriormente, en el que uno a cinco heteroátomos contenidos allí se seleccionan solamente de nitrógeno. Los radicales N-heterociclilo preferidos para R_2 son aquellos radicales seleccionados entre el grupo que consiste en piridinilo, tiazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, isoquinolinilo, quinolinilo y ftalazinilo;
- 35

- "Heterocicilalquilo" se refiere a un radical de la fórmula $-R_aR_d$ donde R_a es un radical alquilo como se definió anteriormente y R_d es un radical heterociclilo según se definió anteriormente, y si el heterociclilo es un heterociclilo que contiene nitrógeno, el heterociclilo puede estar unido al radical alquilo en el átomo de nitrógeno. Un radical heterocicilalquilo preferido para R^3 es morfolinialquilo; los radicales heterocicilalquilo preferidos para R^5 son aquellos radicales seleccionados del grupo que consiste en isoindoldionilalquilo, morfolinialquilo y triazolilalquilo.
- 40

"Heterocicililcarbonilo" se refiere a un radical de la fórmula $-C(O)-R_d$ donde R_d es un radical heterociclilo como se definió anteriormente, y si el heterociclilo es un heterociclilo que contiene nitrógeno, el heterociclilo puede estar unido al carbonilo en el átomo de nitrógeno. Un radical heterocicililcarbonilo preferido para R^3 es piridinilcarbonilo.

- 45 "Hidrocarbilo", algunas veces abreviado como "Hy", se refiere a un radical compuesto exclusivamente por carbono e hidrógeno. El grupo hidrocarbilo puede estar saturado o insaturado, y puede tener independientemente los carbonos dispuestos en un modo lineal, ramificado o cíclico. En diversas realizaciones opcionales de la invención, el resto hidrocarbilo tiene 1-100, o 1-90, o 1-80, o 1-70, o 1-60, o 1-50, o 1-45, o 1-40, o 1-35, o 1-30, o 1-29, o 1-28, o 1-27, o 1-26, o 1-25, o 1-24, o 1-23, o 1-22, o 1-21, o 1-20, o 1-19, o 1-18, o 1-17, o 1-16, o 1-15, o 1-14, o 1-13, o 1-12, o 1-11, o 1-10, o 1-9, o 1-8, o 1-7, o 1-6, o 1-5, o 2-100, o 2-90, o 2-80, o 2-70, o 2-60, o 2-50, o 2-45, o 2-40, o 2-35, o 2-30, o 2-29, o 2-28, o 2-27, o 2-26, o 2-25, o 2-24, o 2-23, o 2-22, o 2-21, o 2-20, o 2-19, o 2-18, o 2-17, o 2-16, o 2-15, o 2-14, o 2-13, o 2-12, o 2-11, o 2-10, o 2-9, o 2-8, o 2-7, o 2-6, o 2-5, o 3-100, o 3-90, o 3-80, o 3-70, o 3-60, o 3-50, o 3-45, o 3-40, o 3-35, o 3-30, o 3-29, o 3-28, o 3-27, o 3-26, o 3-25, o 3-24, o 3-23, o 3-22, o 3-21, o 3-20, o 3-19, o 3-18, o 3-17, o 3-16, o 3-15, o 3-14, o 3-13, o 3-12, o 3-11, o 3-10, o 3-9, o 3-8, o 3-7, o 3-6, o 3-5 carbonos. Independientemente, el resto hidrocarbilo puede describirse como un resto alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno o arilo, donde el alquilo, alqueno y alquino está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy^1 seleccionados entre cicloalquilo, cicloalqueno y arilo, donde cada grupo Hy^1 está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy^2 seleccionados entre alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno y arilo, y cicloalquilo, cicloalqueno y arilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos Hy^2 , siempre que cuando Hy^2 se seleccione entre alquilo, alqueno o alquino, entonces Hy^2 puede estar sustituido con uno o más grupos Hy^3 .
- 50
- 55

seleccionados entre cicloalquilo, cicloalquileo y arilo, donde cada grupo Hy^3 está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy^4 seleccionados entre alquilo, alquileo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquileo y arilo, y cuando Hy^2 se selecciona entre cicloalquilo, cicloalquileo y arilo, entonces Hy^2 está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy^4 , y siempre que arilo incluya un anillo arilo condensado a un anillo hidrocarbocíclico no aromático.

5 Hidrocarbilo sustituido con halógeno se refiere a un grupo hidrocarbilo en el que uno o más de los hidrógenos han sido reemplazados con un número equivalente de halógenos.

"Mamífero" incluye seres humanos y animales domesticados, tales como gatos, perros, porcinos, ganado, ovejas, cabras, caballos, conejos y similares.

10 Tal como se emplean en la presente memoria, los "métodos conocidos por el experto en la técnica" pueden identificarse mediante diversos libros y bases de datos de referencia. Los libros y tratados de referencia adecuados que detallan la síntesis de reaccionantes útiles en la preparación de los compuestos de la presente invención, o que ofrecen referencias a artículos que describen la preparación, incluyen por ejemplo, "Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandier et al., "Organic Functional Group Preparations," 2ª Ed., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions", 2ª Ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif.

15 1972; T. L. G. Ilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4ta Ed., Wiley-Interscience, New York, 1992. También se pueden identificar reaccionantes específicos y análogos a través de los índices de sustancias químicas conocidas preparados por Chemical Abstract Service of the American Chemical Society, disponibles en la mayoría de las bibliotecas públicas y universitarias, como también a través de bases de datos en línea (se puede contactar a

20 American Chemical Society, Washington, D.C., www.acs.org para más detalles). Las sustancias químicas que se conocen pero que no están disponibles comercialmente en catálogos pueden ser preparadas por empresas de síntesis química habitual, donde muchas de las empresas de suministro de sustancias químicas estándar (p.ej., las mencionadas anteriormente) proveen servicios de síntesis habitual.

25 "Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso de circunstancias posteriormente descrito puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho suceso o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, "arilo opcionalmente sustituido" significa que el radical arilo puede o no estar sustituido y que la descripción incluye tanto radicales arilo sustituidos como radicales arilo que no tienen sustitución.

"Sal farmacéuticamente aceptable" incluye tanto sales de adición de ácidos como sales de adición de bases.

30 "Sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres, que no son biológicamente ni de ningún otro modo indeseables, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido

35 etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y similares.

La "sal de adición de bases farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia y las propiedades biológicas de los ácidos libres, que no son biológicamente ni de ningún otro modo indeseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, aunque sin limitarse a ello, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio,

40 magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, aunque sin limitarse a ello, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitlohexilamina,

45 lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína.

50 "Excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se emplea en la presente memoria, tiene como fin incluir, sin limitación, cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, adhesivo, edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, saporífero, tensioactivo, humectante, disgregante, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, disolvente, emulsionante o estabilizante que haya sido aprobado por la Administración Federal de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration*) como aceptable para uso en seres humanos o animales domésticos.

55 "Profármacos" tiene como fin indicar un compuesto que puede convertirse bajo condiciones fisiológicas o por solvolisis a un compuesto biológicamente activo de la invención. Por lo tanto, el término "profármaco" se refiere a un precursor metabólico de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede ser inactivo cuando se administra a un sujeto que lo necesita, pero se convierte *in vivo* a un compuesto activo de la invención. Los profármacos típicamente se transforman *in vivo* para producir el compuesto madre de la invención,

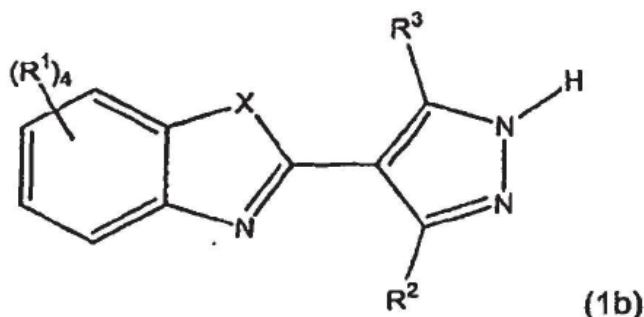
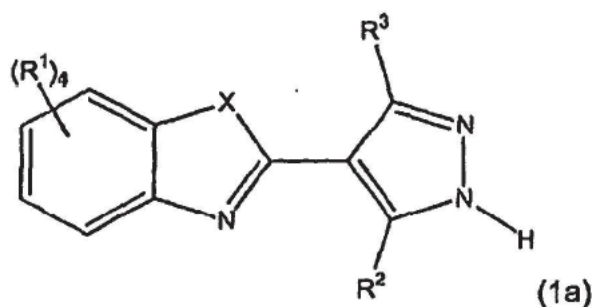
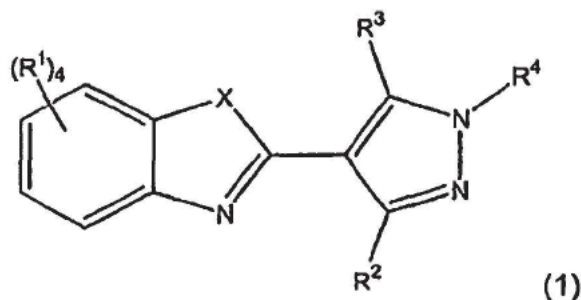
por ejemplo, por hidrólisis en la sangre. El compuesto del profármaco con frecuencia ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad de tejido o liberación demorada en un organismo mamífero (véase, Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pág. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam).

- 5 Se provee un análisis de los profármacos en Higuchi, T., et al., "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," A.C.S. Symposium Series, Vol. 14, y en Bioreversible Carriers In Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

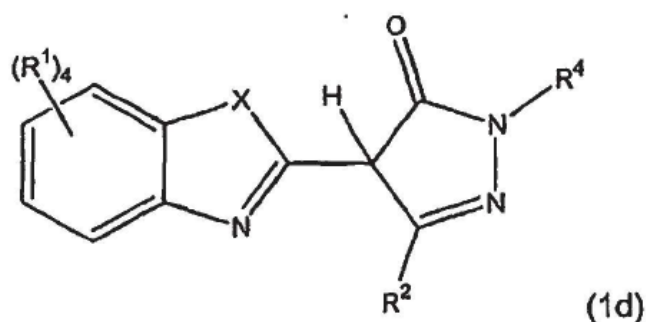
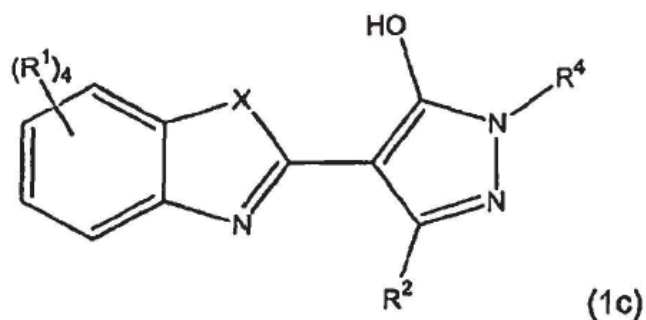
10 El término "profármaco" también pretende incluir cualquier vehículo covalentemente unido que libera el compuesto activo de la invención *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un mamífero. Los profármacos de un compuesto de la invención se pueden preparar modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto de la invención, en un modo tal que se escinden las modificaciones, o bien en la manipulación de rutina o *in vivo*, al compuesto madre de la invención. Los profármacos incluyen compuestos de la invención en los que un grupo hidroxilo, amino o mercapto está unido a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto de la invención se administra a un mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, aunque sin limitarse a ello, derivados de acetato, formiato y benzoato de alcohol y grupos funcionales amina en los compuestos de la invención, y similares.

"Compuesto estable" y "estructura estable" tienen como fin indicar un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y formulación en un agente terapéutico eficaz.

- 20 Los tautómeros se refieren a diversas formas de un compuesto que difieren solamente por el desplazamiento de uno o más doble enlaces y el desplazamiento concomitante de los átomos de hidrógeno. Por ejemplo, cuando R^4 es hidrógeno en la fórmula (1), entonces los dos doble enlaces pueden desplazarse para proveer dos formas tautoméricas, como se muestra en las fórmulas (1a) y (1b).



- 25 Otro ejemplo de tautomería surge cuando un sustituyente en el anillo pirazol es adyacente a un doble enlace y puede tener sustitución de hidrógeno. Un ejemplo específico se muestra en las fórmulas (1c) y (1d).



"Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de un compuesto de la invención que, cuando se administra a un mamífero, particularmente un ser humano que lo necesita, es suficiente para tratar, como se ha de definir a continuación, trastornos hiperproliferativos. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una

5 "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, el trastorno hiperproliferativo y su gravedad, y la edad del mamífero que se ha de tratar, pero puede determinarla rutinariamente el experto en la técnica empleando sus propios conocimientos y considerando la presente descripción.

"Tratar" o "tratamiento", tal como se emplea en la presente memoria, abarca el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero, preferiblemente un ser humano, e incluye:

10 (i) prevenir que ocurra el trastorno en un ser humano, en particular, cuando dicho mamífero está predispuesto al trastorno, pero no ha sido diagnosticado con dicho trastorno;

(ii) inhibir el trastorno, es decir, detener su desarrollo; o

(iii) aliviar el trastorno, es decir, causar la regresión del trastorno.

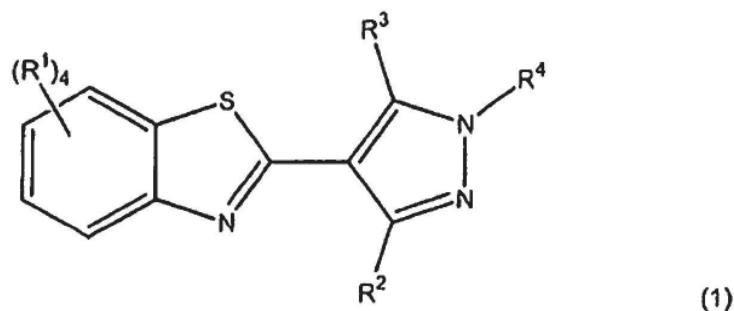
15 Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener uno o más centros asimétricos y pueden, por lo tanto, originar enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse en términos de estequiometría absoluta, como (R)- o (S)- o, como (D)- o (L)- para aminoácidos. La presente invención tienen como fin incluir todos los isómeros posibles, como también sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros (R)- y (S)-, o (D)- y (L)- ópticamente activos pueden prepararse usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en la

20 presente memoria contienen enlaces dobles olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se indique específicamente algo distinto, se entiende que los compuestos incluyen tanto isómeros geométricos E como Z.

A menos que la nomenclatura indique específicamente otra cosa, los nombres de los compuestos tienen como fin incluir cualquier tautómero sencillo, estereoisómero sencillo, enantiómero, racemato o sus mezclas.

25 REALIZACIONES PREFERIDAS

Como se mencionó previamente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de fórmula (1):



como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros, o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable; donde:

5 R^1 en cada caso se selecciona independientemente entre amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, fenilo, azido, halógeno, heteroarilo, heteroalquilo, hidrazinilo, hidrocarbilo C_{1-15} , hidrógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido;

R^2 es amino;

R^3 se selecciona entre hidrocarbilo C_{1-16} , -O-hidrocarbilo C_{1-15} , -S-hidrocarbilo C_{1-15} ,

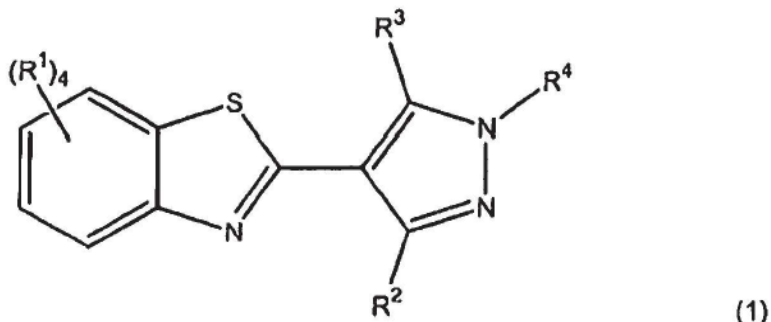
10 R^4 es hidrógeno,

donde heteroalquilo es aminohidrocarbilo, amido, ácido carboxílico, ciano, dihidrocarbilamido, dihidrocarbilamino, di(hidrocarbil)fosfido, formilo, hidrocarbilo, hidrocarbiloxi, hidrocarbilamino, hidrocarbiloxi, hidrocarbiloalcarbonilo, hidrocarbilsiloxi, hidrocarbilsililamino, hidrocarbilsulfido, hidrocarbiltio, hidrocarbilamido, isotiocianato, N-heterociclo, perfluorohidrocarbilo, tiocianato e hidrocarbilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilamino C_{1-15} , amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, azido, di-alquilamino C_{1-15} , halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfóxido de sulfonilo, tiol, tioureido y ureido, donde el resto hidrocarbilo del heteroalquilo es hidrocarbilo C_{1-15} ; N-heterociclo es un radical de anillo de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados de nitrógeno; heteroarilo es un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

En diversas realizaciones opcionales de la presente invención, las composiciones que contienen un compuesto de fórmula (1) pueden describirse como que contienen un compuesto de fórmula (1) donde se utilizan uno o más de los siguientes criterios para describir los compuestos de fórmula (1), donde cualquiera de dos o más de estos criterios puede combinarse para describir un grupo de compuestos de fórmula (1) que puede estar presente en la composición farmacéutica de la invención: heteroalquilo es uno o más de los siguientes: aminohidrocarbilo (es decir, -NH-C(=O)-Hy), amido (es decir, -C(=O)-NH₂), ácido carboxílico (es decir, -COOH), ciano (es decir, -CN), dihidrocarbilamido (es decir, -C(=O)-N(Hy)(Hy)), dihidrocarbilamino (es decir, -N(Hy)(Hy)), di(hidrocarbil) fosfido, formilo (es decir, -C(=O)H), hidrocarbilo (es decir, -C(=O)-Hy), hidrocarbiloxi (es decir, -O-C(=O)-Hy) hidrocarbilamino (es decir, -NH-Hy), hidrocarbiloxi (es decir, -O-Hy), hidrocarbiloalcarbonilo (es decir, -C(=O)-O-Hy) hidrocarbilsiloxi, hidrocarbilsililamino, hidrocarbilsulfido (es decir, -S-Hy), hidrocarbiltio, hidrocarbilamido (es decir, -C(=O)-N(H)(Hy)), isotiocianato, N-heterociclo, perfluorohidrocarbilo, tiocianato e hidrocarbilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilamino, amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, azido, dialquilamino, halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido; hidrocarbilo es uno o más de los siguientes: alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo, donde alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos Hy¹ seleccionados entre cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo, donde cada grupo Hy¹ está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy² seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo; y cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos Hy², siempre que cuando Hy² se selecciona entre alquilo, alquenilo o alquinilo, entonces Hy² puede estar sustituido con uno o más grupos Hy³ seleccionados entre cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo, donde cada grupo Hy³ está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy⁴ seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo, y cuando Hy² se selecciona entre cicloalquilo, cicloalquilenilo y arilo, entonces Hy² está opcionalmente sustituido con uno o más grupos Hy⁴, y siempre que el arilo incluya un anillo arilo condensado a un anillo hidrocarbocíclico no aromático, R^1 en cada caso es hidrógeno; R^4 es hidrógeno; R^2 es amino; R^3 es hidrocarbilo. Opcionalmente, uno o más de los siguientes compuestos se excluyen del alcance del compuesto útil en las composiciones farmacéuticas de la presente invención: 1H-pirazol-3,5-diamina, 4-(2-benzotiazolil); 1H-pirazol 3,5-diamina, 4-(2-benzotiazolil)-N3-(4-metilfenilo);

1H-pirazol-3,6-diamina, 4-(2-benzotiazolil)-N3-fenilo; y 3H-pirazol-3-ona, 4-(2-benzotiazolil)-1,2-dihidro-5-(4-nitrofenilo).

La presente invención provee además compuestos que se pueden usar en los métodos descritos en la presente memoria. En un aspecto, la presente invención provee un compuesto de fórmula (1)



5

como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros, o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable; donde:

10 R¹ en cada caso se selecciona independientemente entre amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, fenilo, azido, halógeno, heteroarilo, heteroalquilo, hidrazinilo, hidrocarbilo C₁₋₁₅, hidrógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfinico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido;

R² es amino:

R³ se selecciona entre hidrocarbilo C₁₋₁₅, -O-hidrocarbilo C₁₋₁₆, -S-hidrocarbilo C₁₋₁₆.

R^4 es hidrógeno,

15 donde heteroalquilo es aminohidrocarbilo, amido, ácido carboxílico, ciano, dihidrocarbilamido, dihidrocarbilamino, di(hidrocarbilo)fosfido, formilo, hidrocarbilo, hidrocarbiloxi, hidrocarbilamino, hidrocarbiloxi, hidrocarbiloxicarbonilo, hidrocarbilsilo, hidrocarbilsililamino, hidrocarbilsulfido, hidrocarbilitio, hidrocarbilamido, isotiocianato, N-heterociclo, perfluorohidrocarbilo, tiocianato e hidrocarbilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilamino C₁₋₁₅, amino, aminosulfonilo, aminosulfonilo, azido, di-alquilamino C₁₋₁₅, halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido, donde el resto hidrocarbilo de heteroalquilo es hidrocarbilo C₁₋₁₅; N-heterociclo es un radical de anillo de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados de nitrógeno; heteroarilo es un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

La invención se refiere además a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

[2-(3-Amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-il]-metanol;

[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-il]-metanol;

[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-metanol;

30 Amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-4,5,6-trifluoro-benzotiazol-7-sulfónico;

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-carboxílico;

Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico;

Ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico:

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico:

35 Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-Metil-1Hpirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;

(2,6-Dimetil-pirimidin-4-il)-amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-7-carboxílico;

- Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-4-fluorobenzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Hidroxietil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-4-sulfónico;
 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Hidroxietil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico
- 5 Ácido (piridin-4-ilmetil)-amida 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico;
 2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-ol;
 Metilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-sulfónico;
 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico;
 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 10 (2-Hidroxietil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Metoxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 4-Fluoro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Tiofen-2-il-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 4-Cloro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 15 4-Metoxi-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 Bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 Fenetil-amida de ácido 2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 12-(4-Amino-fenil)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Morfolin-4-il-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 20 (2,2,2-Trifluoro-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 Ciclopropilmetil-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 [2-(3H-Imidazol-4-il)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 4-Amino-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 25 (2-Dimetilamino-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (3-Dimetilamino-propil)-amida de ácido 2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 Amida (hidrazido acética) de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (Fenilhidrazino) amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 2-[[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil]-amino]-etanol;
- 30 3-[[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil]-amino]-bencenosulfonamida;
 4-(4-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-S-(2-fenil-ciclopropil)-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilamina;
- 35 4-(5-Fluoro-6-metil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;

- 4-(6-Bromo-5-fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Bromo-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Clorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Dimetilaminometil-5-fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 5 4-(6-Dimetilaminometil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Metanosulfonil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(7-cloro-4-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 10 4-(7-Cloro-5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-ciclopropil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-etil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-metilsulfanil-1H-pirazol-3-ilamina;
 15 4-Benzotiazol-2-il-5-fenil-1H-pirazol-3-ilamina;
 5-Ciclopropil-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(4,5,6-trifluoro-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(5-trifluorometilbenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(6-metilaminometil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 20 5-Metil-4-(6-morfolin-4-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(6-pirrolidin-1-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-[6-(4-metil-piperazIn-1-ilmetil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-[6-(4-metil-piperazina-1-sulfonil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina;
 N-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-acetamida;
 25 N-{2-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilamino]-etil}-acetamida; y
 Éster etílico de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-5-carboxílico,
 4-Benzotiazol-2-il-N³-quinolin-5-il-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-3-il-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-4-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina; y
 30 4-Benzotiazol-2-il-N'-(3-metilbutil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros
 o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable.
 En realizaciones opcionales de la invención, se pueden emplear uno o más de los siguientes criterios para describir
 el compuesto en este aspecto de la invención, donde cualquiera de dos o más de estos criterios puede combinarse:
 35 R¹ es hidrógeno en cada caso; R¹ excluye hidrógeno en un caso; R¹ excluye hidrógeno en dos casos;
 R⁴ es hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno; R⁶ es hidrógeno; R⁷ es hidrógeno; R⁸ es hidrocarbilo; R⁸ es heteroalquilo; y R⁸ es heteroarilo. Opcionalmente, uno o más de los siguientes compuestos se excluyen del alcance de este aspecto de la presente invención:

1H-pirazol-3,5-diamina, 4-(2-benzotiazolilo); 1H-pirazol-3,5-diamina, 4-(2-benzotiazolil)-N3-(4-metilfenilo); y 1H-pirazol-3,5-diamina, 4-(2-benzotiazolil)-N3-fenilo.

PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

Se ha de entender que en la siguiente descripción, las combinaciones de sustituyentes y/o variables de las fórmulas representadas se permiten solamente si dichas contribuciones producen compuestos estables.

Los expertos en la materia también han de apreciar que en el proceso descrito a continuación, los grupos funcionales de compuestos intermedios pueden necesitar estar protegidos por grupos protectores adecuados. Dichos grupos funcionales incluyen hidroxilo, amino, mercapto y ácido carboxílico. Los grupos protectores adecuados para hidroxilo incluyen trialquilsililo o diarilalquilsililo (p. ej., t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o trimetilsililo), tetrahidropiranilo, bencilo y similares. Los grupos protectores adecuados para amino, amidino y guanidino incluyen t-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares. Los grupos protectores adecuados para mercapto incluyen -C(O)-R (donde R es alquilo, arilo o aralquilo), p-metoxibencilo, tritilo y similares. Los grupos protectores adecuados para ácido carboxílico incluyen ésteres de alquilo, arilo o aralquilo.

Los grupos protectores pueden añadirse o eliminarse de acuerdo con técnicas estándar, conocidas por el experto en la materia y descritas en la presente memoria.

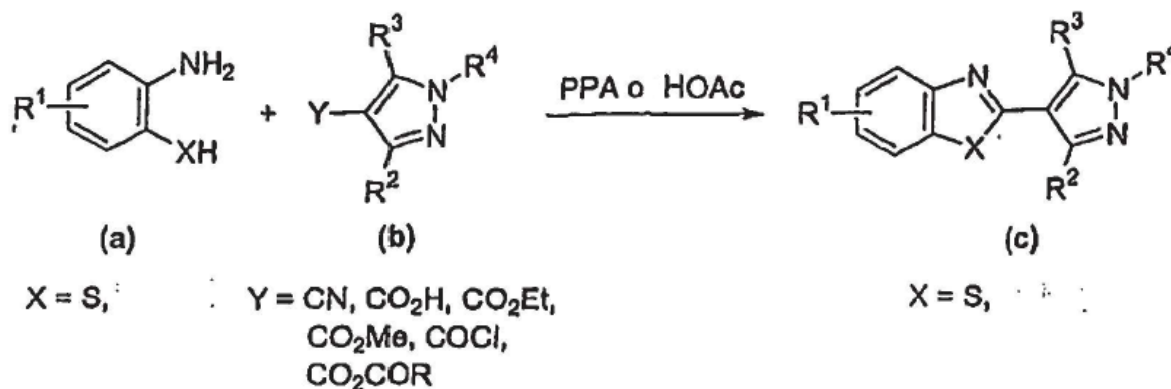
El uso de grupos protectores se describe en detalle en Green, T.W. and P.G.M. Wutz, Protective Groups In Organic Synthesis (1991), 2ª Ed., Wiley-Interscience. El grupo protector puede ser también una resina polimérica tal como una resina Wang o una resina de cloruro de 2-clorotritilo.

Los expertos en la técnica apreciarán también que si bien dichos derivados protegidos de los compuestos de fórmula (1), como se describió anteriormente en Sumario de la invención, pueden no poseer actividad farmacológica como tales, pueden administrarse a un mamífero que padece cáncer o inflamación y de allí en más metabolizarse en el cuerpo para formar los compuestos de la invención que son farmacológicamente activos. Dichos derivados pueden por lo tanto describirse como "profármacos". Todos los profármacos de los compuestos de fórmula (I) se incluyen dentro del alcance de la invención.

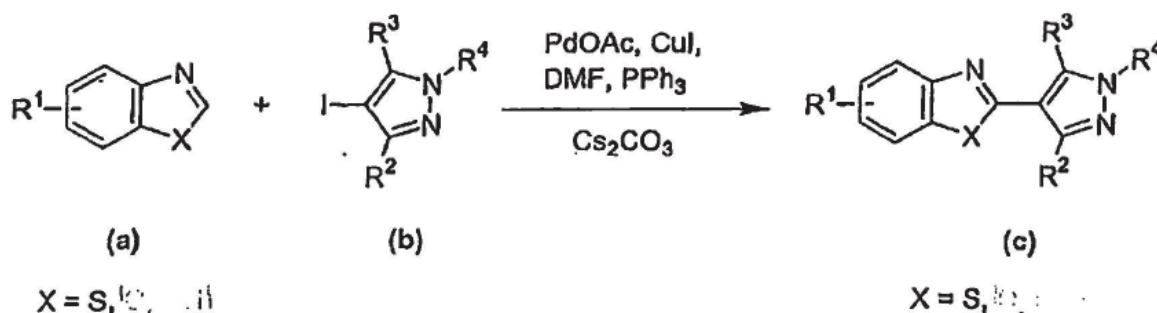
Los siguientes Esquemas de reacción ilustran métodos para elaborar los compuestos de fórmula (1). Se ha de entender que un experto en la técnica sería capaz de elaborar los compuestos de fórmula (1) por métodos similares o por métodos conocidos por el experto en la técnica. En general, los componentes de partida pueden obtenerse de fuentes tales como Aldrich, o sintetizarse de acuerdo con fuentes conocidas por el experto en la técnica (véase, p. ej., Smith and March, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5ta edición (Wiley Interscience, New York)). Asimismo, los grupos R¹ a R⁵ se seleccionan de los componentes indicados en la memoria, y pueden unirse a los componentes de partida, componentes intermedios y/o productos finales de acuerdo con esquemas conocidos por el experto en la técnica. En los siguientes Esquemas de reacción, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son como se definieron anteriormente en el Resumen de la invención, y R representa o bien hidrógeno o un grupo alquilo inferior.

Los compuestos expuestos en las composiciones y métodos de la presente invención se pueden preparar por métodos descritos en la bibliografía, y/o como se resume en los siguientes esquemas:

Esquema de reacción 1



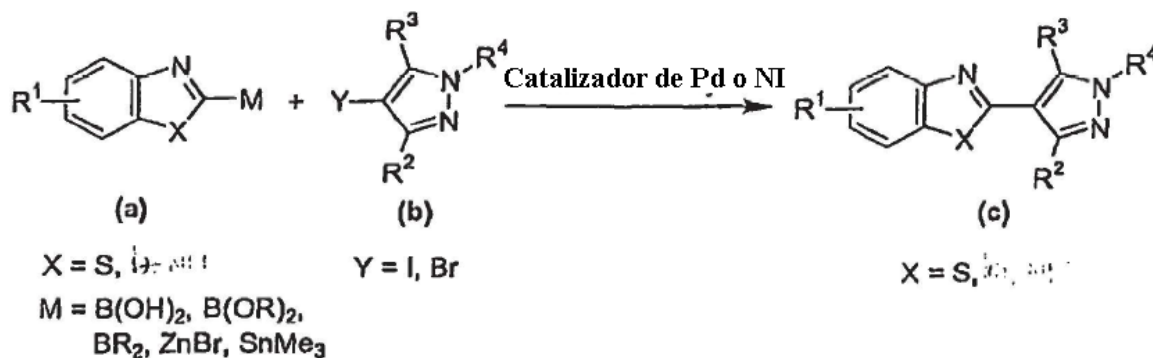
Esquema de reacción 2



En general, los compuestos de fórmula (c) ((2-(1H-pirazol-4-il)benzotiazol (X = S), se pueden preparar por acoplamiento de un compuesto de fórmula (a) con un 4-yodopirazol sustituido de fórmula (b) en un disolvente tal como DMF y en presencia de un catalizador de metales de transición, tal como acetato de paladio y yoduro de cobre, y trifenilfosfina y una base tal como Cs₂CO₃ como se describe en la bibliografía (Pivsa-Art, S.; Satoh, T.; Kawamura, Y. Bull. Chem. Soc. Jpn, (1998) 71, 467).

Alternativamente, los compuestos de la presente invención se pueden preparar como se describe en el Esquema de reacción 3.

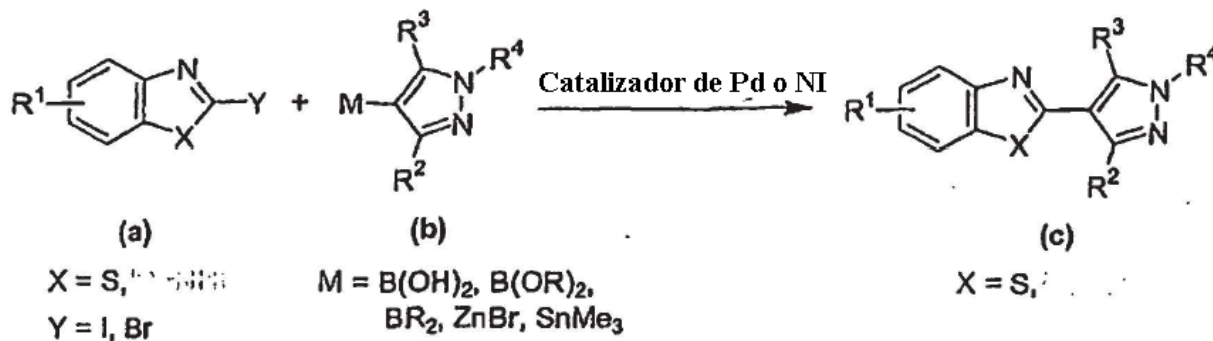
Esquema de reacción 3



En general, los compuestos de fórmula (c) ((2-(1H-pirazol-4-il)benzotiazol (X = S), se pueden preparar mediante el acoplamiento de un compuesto metalado de fórmula (a) con un 4-halopirazol sustituido de fórmula (b) en presencia de un catalizador de metales de transición tal como paladio, níquel u otros. El compuesto metalado de fórmula (a) puede prepararse por rutas habituales conocidas por el experto en la técnica, tales como metalación usando un reactivo organometálico, o por intercambio de halógeno metálico, o por transmetalación. El elemento metálico puede ser boro, zinc, estaño, magnesio, litio u otros.

Por otra parte, los compuestos de la presente invención se pueden preparar como se describe en el Esquema de reacción 4.

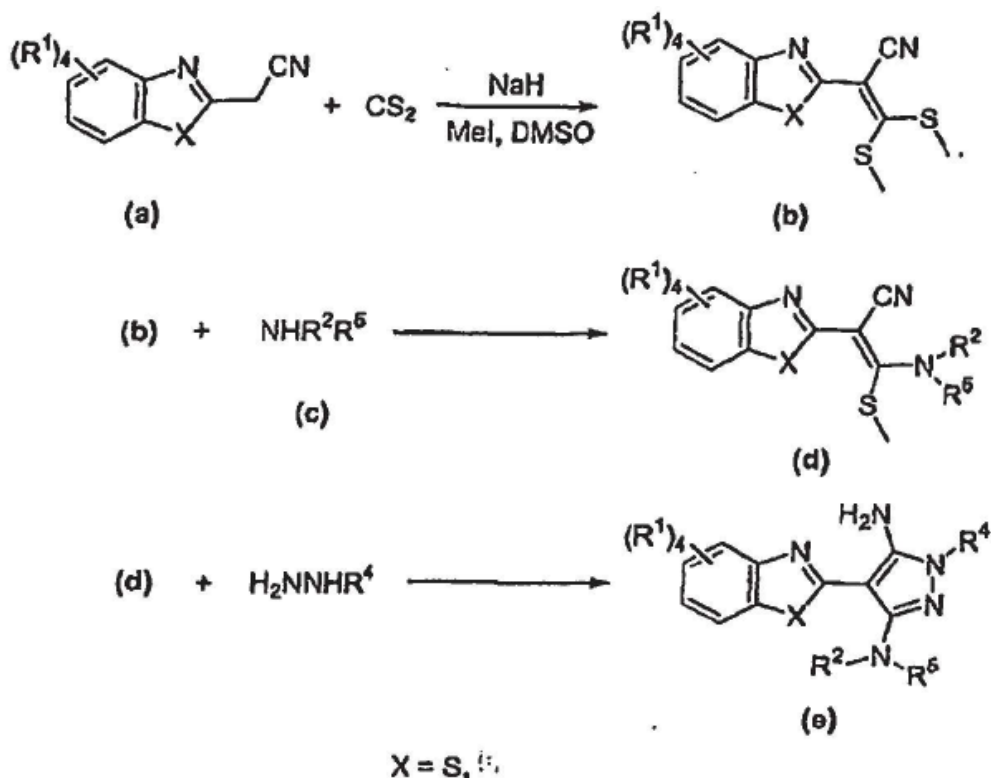
Esquema de reacción 4



En general, los compuestos de fórmula (c) ((2-(1H-pirazol-4-il)benzotiazol (X = S), se pueden preparar mediante el acoplamiento de un compuesto metalado de fórmula (b) con un 2-halobenzotiazol sustituido en presencia de un catalizador de metales de transición tal como paladio, níquel u otros. El compuesto metalado de fórmula (a) se puede preparar por las rutas habituales conocidas por el experto en la técnica, tales como metalación usando un reactivo organometálico, o por intercambio de halógenos de metal, o por transmetalación. El elemento metálico puede ser boro, zinc, estaño, magnesio, litio u otros.

Por otra parte, los compuestos de la presente invención se pueden preparar como se describe en el Esquema de reacción 5.

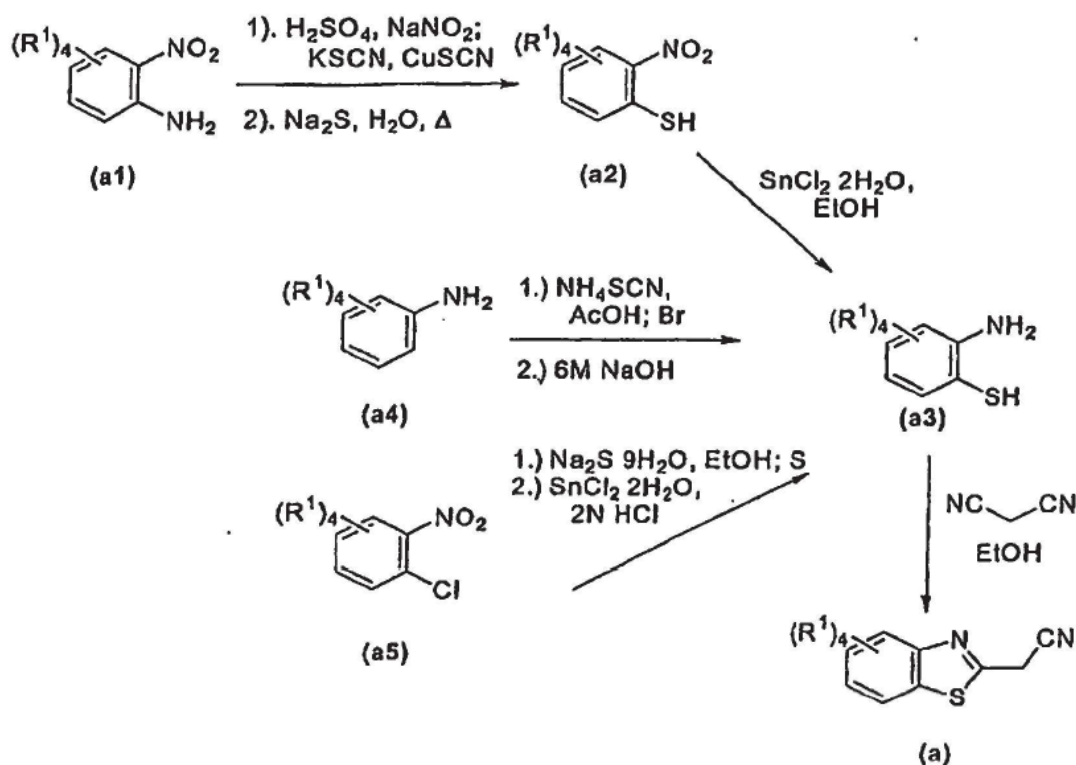
Esquema de reacción 5



En general, los compuestos de fórmula (b) se preparan a partir de acetonitrilos sustituidos de fórmula (a) haciendo reaccionar con disulfuro de carbono en presencia de una base, tal como hidruro de sodio, y un agente alquilante, tal como yoduro de metilo, como se describe en la bibliografía (Augustin, M.; Doelling, W.; J. Prakt. Chem. (1982) 1, 3). Los compuestos obtenidos de fórmula (b) pueden luego sustituirse con un nucleófilo de fórmula (c) como se describe en la bibliografía (Augustin, M.; Doelling, W. *supra*;) para proporcionar los compuestos de fórmula (d). Los compuestos de fórmula (d) pueden luego reaccionar con hidrazina o una hidrazina sustituida en un disolvente tal como etanol, THF o dioxano para proveer los compuestos de fórmula (e) En un modo similar como se describe en la bibliografía (Fadda, A. A.; Amer, F. A.; Zaki, M. E. A.; Samir, K. H.; Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem. (1999), 155, 59), los compuestos pueden purificarse por recristalización o cromatografía instantánea, y pueden aislarse como bases libres o como sales.

Los compuestos de fórmula (a) pueden prepararse de acuerdo con uno de los métodos que se muestran en el Esquema de reacción 6.

Esquema de reacción 6

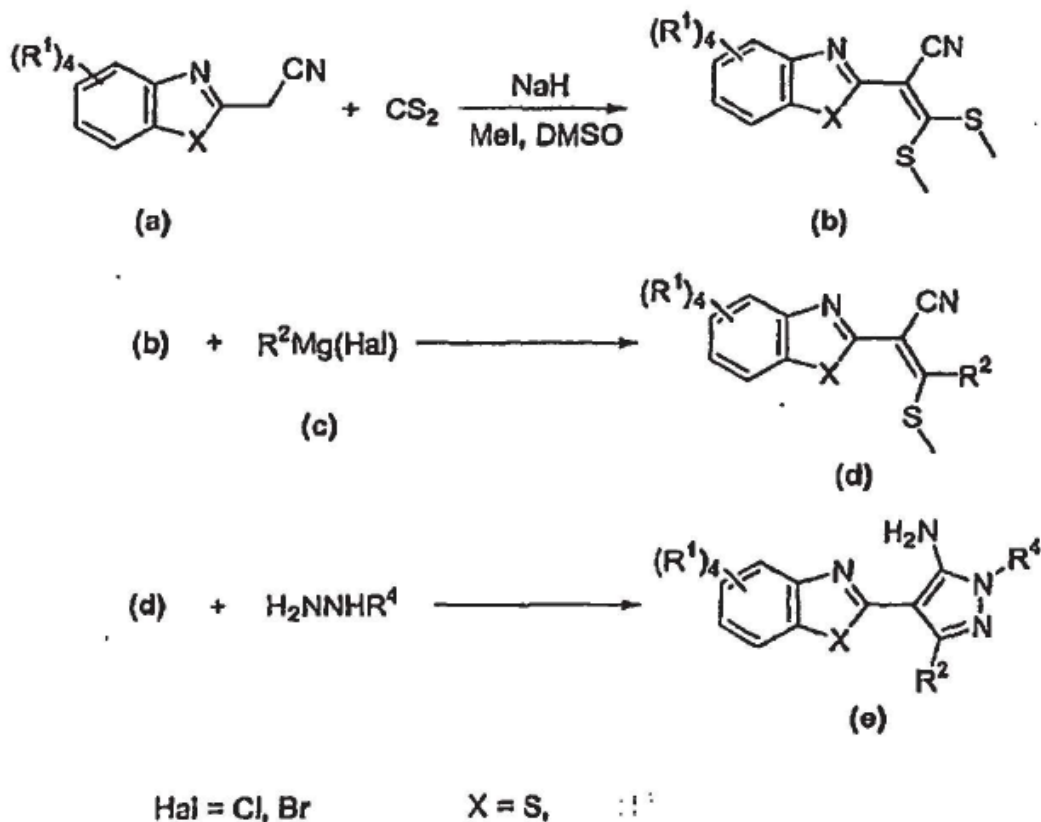


Una 2-nitroanilina de fórmula (a1) puede diazotizarse y luego hacerse reaccionar con tiocianato de potasio y tiocianato cuproso. El producto resultante puede reducirse en presencia de sulfuro de sodio para dar un compuesto de fórmula (a2). El nitrobenzeno sustituido resultante de fórmula (a2) puede reducirse en presencia de dihidrato de cloruro de estaño (II) sometiendo a reflujo el material en un disolvente adecuado tal como etanol para proporcionar un compuesto de fórmula (a3). Alternativamente, un compuesto de fórmula (a3) puede prepararse haciendo reaccionar una anilina sustituida de fórmula (a4) con tiocianato de amonio en ácido acético seguido por la adición de bromo. El producto resultante puede hidrolizarse con el uso de una fuente adecuada de hidróxido tal como una disolución 6M de hidróxido sódico. Un compuesto de fórmula (a3) puede también producirse por la reacción de 2-cloronitrobenzeno sustituido de fórmula (a5) y una disolución de disulfuro de sodio que se genera disolviendo sulfuro de sodio no hidratado en etanol caliente seguido de la adición de azufre. Esta reacción genera un disulfuro que puede reducirse sometiendo a reflujo el intermedio en presencia de dihidrato de cloruro de estaño (II) y ácido clorhídrico 2N para producir un compuesto de fórmula (a3).

El compuesto de fórmula (a) puede luego prepararse tratando un compuesto de fórmula (a3) con malononitrilo en etanol a reflujo. El producto puede aislarse por filtración y purificarse por recristalización o cromatografía ultrarrápida.

Por otra parte, los compuestos de la presente invención pueden prepararse como se describe en el Esquema de reacción 7.

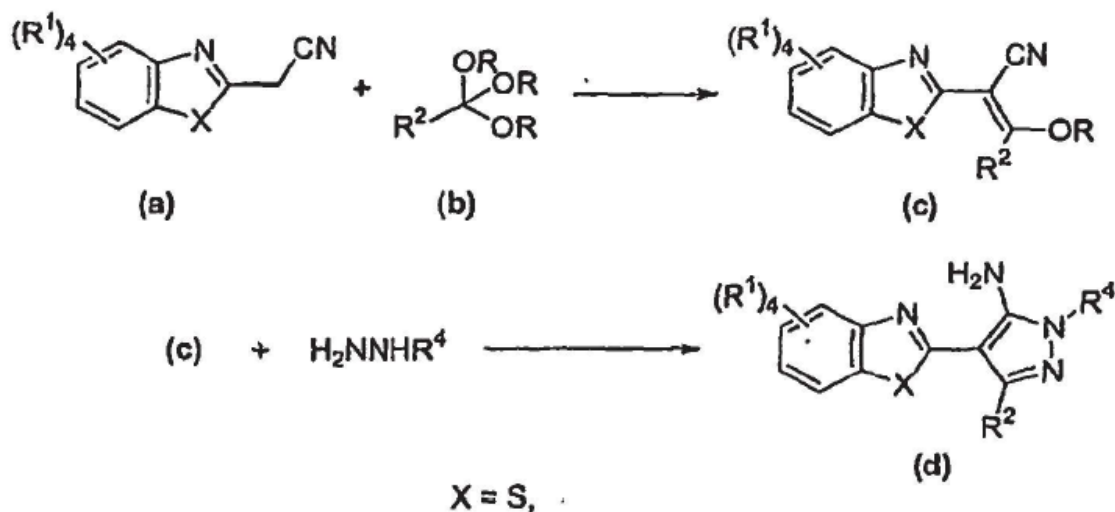
Esquema de reacción 7



En general, los compuestos de fórmula (b) se preparan a partir de acetonitrilos sustituidos de fórmula (a) haciendo reaccionar con disulfuro de carbono en presencia de una base, tal como hidruro de sodio, y un agente alquilante, tal como yoduro de metilo, como se describe en la bibliografía (Augustin, M.; Doelling, W.; *supra*). Los compuestos obtenidos de fórmula (b) pueden luego sustituirse con un reactivo Grignard de fórmula (c) o con un compuesto de organolitio para proporcionar los compuestos de fórmula (d). Los compuestos de fórmula (d) pueden luego reaccionar con hidrazina o una hidrazina sustituida en un disolvente tal como etanol, THF o dioxano para proporcionar los compuestos de fórmula (e) en un modo similar al descrito en la bibliografía (Fadda, A. A.; Amer, F. A.; Zaki, M. E. A.; Samir, K. H.; Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem. (1999), 155, 59). Los compuestos pueden purificarse por recristalización o cromatografía ultrarrápida y pueden aislarse como sales o como bases libres.

Por otra parte, los compuestos de la presente invención pueden prepararse como se describe en el Esquema de reacción 8.

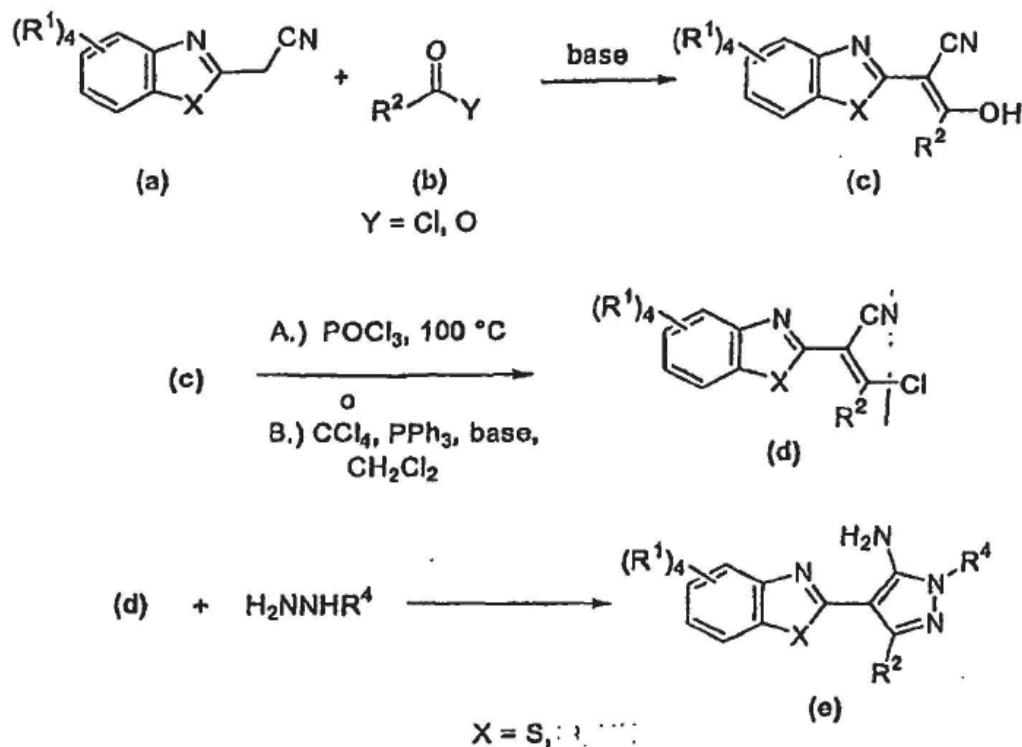
Esquema de reacción 8



En general, los compuestos de fórmula (c) pueden prepararse a partir de acetonitrilos sustituidos de fórmula (a) mediante la reacción con un ortoéster sustituido de fórmula (b) en un medio tal como anhídrido acético, como se describe en la bibliografía (Bontems, R. J.; Anderson, J. D.; Smee, D. F.; Jin, A.; Alaghamandan, H. A. J. Med. Chem. (1990), 8, 2174). Los compuestos de fórmula (c) pueden luego hacerse reaccionar con hidrazina o una hidrazina sustituida en un disolvente tal como etanol, THF o dioxano para proporcionar los compuestos de fórmula (d). Los productos pueden purificarse por recristalización o cromatografía instantánea y pueden aislarse como una sal o una base libre.

Como alternativa, los compuestos de la presente invención se pueden preparar como se describe en el Esquema de reacción 9.

Esquema de reacción 9

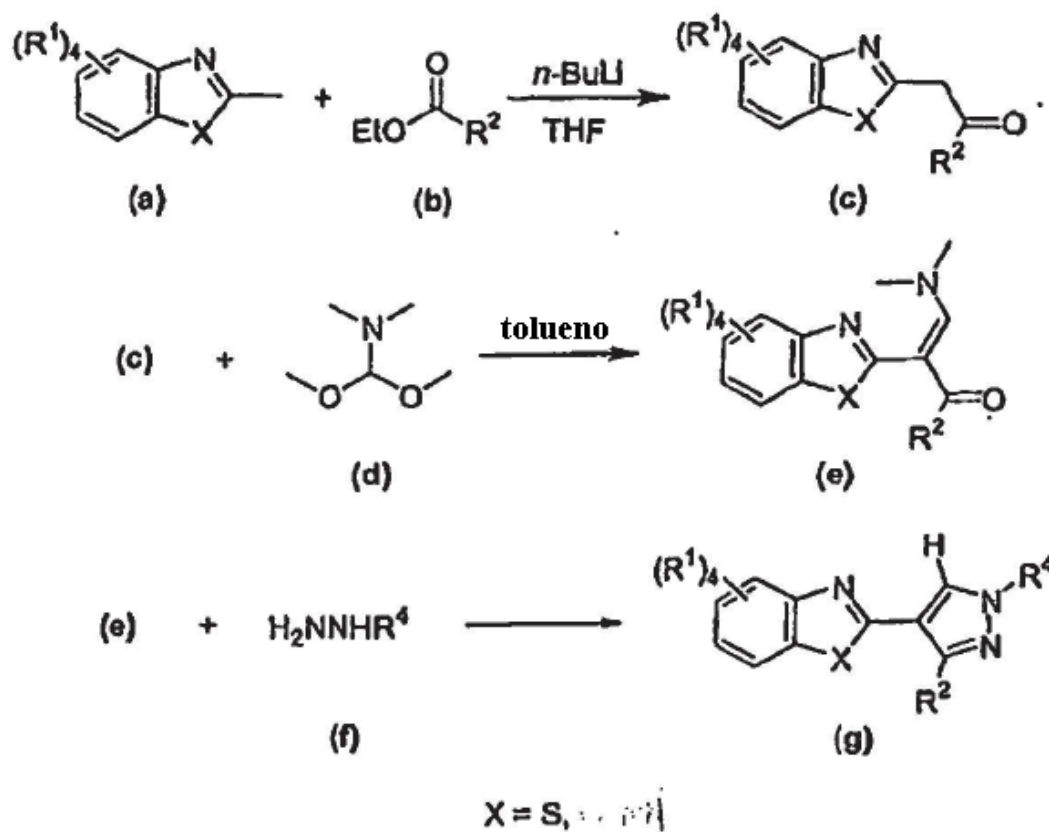


En general, un acetonitrilo de fórmula (a) puede hacerse reaccionar con un carbonilo activado de fórmula (b) en presencia de una base adecuada tal como trietilamina para proveer un compuesto de fórmula (c). Los compuestos de fórmula (c) pueden luego clorarse para dar los compuestos de fórmula (d) haciendo reaccionar el material en

oxicloruro de fósforo puro a 100 °C. Además, los compuestos de fórmula (d) pueden producirse por la reacción de los compuestos de fórmula (c) con trifenilfosfina, o bien pura o unida a una resina, y tetracloruro de carbono en presencia de una base adecuada tal como trietilamina. Los compuestos de fórmula (e) pueden luego prepararse a partir de los compuestos de fórmula (d) por reacción con hidrazina o una hidrazina sustituida en un disolvente tal como etanol, THF o dioxano.

En forma alternativa, los compuestos de la presente invención pueden prepararse como se describe en el Esquema de reacción 10.

Esquema de reacción 10



- En general, los compuestos de fórmula (c) se pueden preparar haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (a) apropiado con una base tal como $n\text{-BuLi}$ y tratando el anión resultante con un éster de fórmula (b) en un disolvente aprótico adecuado tal como THF (Fogagnolo, M.; Giovannini, P. P.; Guerrini, A.; Medici, A.; Pedrini, P.; Colombi, N. *Tetrahedron Asymmetry*, (1998) 9, 2317). El intermedio resultante se condensó con DMF dimetil acetal e hidrazina, como su hidrato o su sal de ácidos, o una hidrazina apropiadamente sustituida en un disolvente tal como etanol, THF o dioxano para producir el producto deseado (como se describe para la preparación de 4-Benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamina en Dawood, K. M.; Kandeel, Z. E.; Farag, A. M. *J. Chem. Res. Synop.* (1998), 4, 208).

La preparación de compuestos específicos de la invención se describe en más detalle en los Ejemplos.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Los compuestos de la presente invención pueden incorporarse a una diversidad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Como tal, la administración de los compuestos se puede lograr en diversas formas, incluyendo la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratecal, etc. El agente activo puede ser sistémico después de la administración o puede localizarse por el uso de administración intramural, o por el uso de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de implantación.

En formas de dosificación farmacéuticas, los compuestos pueden administrarse en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Pueden también usarse en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son puramente ilustrativos y no limitativos en modo alguno.

- 5 Para preparaciones orales, los compuestos pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para elaborar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes tampón, agentes humectantes, conservantes y saporíferos.

- 10 Los compuestos pueden formularse en preparaciones para inyección, disolviendo, suspendiendo o emulsionando en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos sintéticos y alifáticos; ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los compuestos se pueden utilizar en formulación en aerosol para administrar por inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

- 20 Asimismo, los compuestos se pueden preparar en supositorios, mezclando con una diversidad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por la vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietilenglicoles, que se funden a temperatura ambiente, e incluso se solidifican a temperatura ambiente.

- 25 Pueden proveerse formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal, tales como jarabes, elixires y suspensiones, donde cada unidad de dosificación, por ejemplo, una cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención. De modo similar, las formas de dosificación unitarias para administración por inyección o intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición como una disolución en agua estéril, disolución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 Se conocen en la técnica los implantes para formulaciones de liberación sostenida. Los implantes se formulan como microesferas, láminas, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el hospedante. El implante que contiene los compuestos inhibidores se dispone próximo al sitio del tumor, de modo que la concentración local de agente activo aumenta en relación con el resto del cuerpo.

- 35 La expresión "forma de dosificación unitaria", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculados en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y del efecto a lograr, y de la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el hospedante.

- 40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes o diluyentes están fácilmente disponibles al público. A su vez, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste de pH y agentes tampón, agentes de ajuste de tonicidad, estabilizantes, humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

- 45 El uso combinado de los compuestos inhibidores provistos y otros agentes citotóxicos tiene las ventajas de que las dosis requeridas para fármacos individuales es inferior, y el efecto de complementariedad de los distintos fármacos. Dependiendo del paciente y del cuadro que se esté tratando, y de la ruta de administración, los compuestos inhibidores pueden administrarse en dosis de 0,1 µg a 10 mg/kg de peso corporal por día. El intervalo es amplio, ya que en general la eficacia de un efecto terapéutico para diferentes mamíferos varía ampliamente con dosis típicamente de 20, 30 o incluso 40 veces más pequeñas (por peso corporal unitario) en el hombre que en la rata. De manera similar, el modo de administración puede tener un gran efecto sobre la dosis. Por consiguiente, por ejemplo, las dosis orales en la rata pueden ser diez veces la dosis de inyección. Se pueden utilizar dosis superiores para rutas focalizadas de administración.

- 50 Una dosis típica puede ser una disolución adecuada para administración intravenosa, un comprimido tomado entre dos y seis veces al día, o una cápsula de liberación en una sola vez, o un comprimido tomado una vez al día que contiene un contenido proporcionalmente mayor de ingrediente activo, etc. El efecto de liberación en tiempo puede obtenerse por materiales en cápsulas que se disuelven a diferentes valores de pH, por cápsulas que liberan lentamente por presión osmótica, o por otros medios conocidos de liberación controlada.

Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar como una función del compuesto específico, la intensidad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos colaterales. Algunos de los compuestos específicos son más potentes que otros. Las dosis preferidas para un compuesto determinado pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la técnica mediante una diversidad de medios.

5 Un medio preferido consiste en medir la potencia fisiológica de un compuesto determinado.

Para uso en los métodos de la invención, los compuestos pueden formularse con otros agentes farmacéuticamente activos, particularmente otros agentes antimetastásicos, antitumorales o antiangiogénicos. Los compuestos angiostáticos de interés incluyen angiostatina, endostatina, péptidos carboxi terminales de colágeno alfa (X V), etc. Los agentes citotóxicos y citostáticos de interés incluyen adriamicina, alquerán, Ara-C, BICNU, busulfán, CNNU,

10 cisplatino, citoxán, daunorrubicina, DTIC, 5-FU, hidrea, ifosfamida, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, velbán, vincristina, vinblastina, VP-16, carboplatino, fludarabina, gemcitabina, idarrubicina, irinotecán, leustatina, navelbina, taxol, taxotere, topotecán, etc.

MÉTODOS DE USO

Los compuestos de la presente invención se proveen para administración a un paciente que padece trastornos hiperproliferativos, p. ej., para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la angiogénesis, disminuir la inflamación asociada con un trastorno linfoproliferativo, inhibir el rechazo de injertos o el daño neurológico debido a reparación de tejido, etc. Los presentes compuestos son útiles para fines profilácticos o terapéuticos. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" hace referencia tanto a la prevención de la enfermedad como al tratamiento de afecciones pre-existentes. La prevención de la proliferación se logra por administración al paciente de los

20 compuestos de la presente invención antes del desarrollo de la enfermedad manifiesta, p. ej., para prevenir el recrecimiento de tumores, prevenir metástasis, disminuir la restenosis asociada con cirugía cardiovascular, etc. Por otra parte, los compuestos se utilizan para tratar una enfermedad en curso, estabilizando o mejorando los síntomas clínicos del paciente.

El hospedante, o el paciente, puede consistir en cualquier especie mamífera, p. ej., primates, particularmente seres humanos, roedores que incluyen ratones, ratas y hámsteres; conejos, equinos, bovinos, caninos, felinos; etc. Los modelos animales son de interés para investigaciones experimentales, ofreciendo un modelo para el tratamiento de enfermedades humanas.

La susceptibilidad de una célula particular al tratamiento con los compuestos de la invención se puede determinar por ensayos *in vitro*. Típicamente, un cultivo de la célula se combina con un compuesto de la invención a concentraciones variables por un periodo de tiempo suficiente para permitir que los agentes activos induzcan la muerte celular o inhiban la migración, usualmente entre aproximadamente una hora y una semana. Para ensayos *in vitro*, se pueden utilizar las células cultivadas de una muestra de biopsia. Luego se cuentan las células viables que se dejan después del tratamiento.

La dosis típicamente variará dependiendo del compuesto específico utilizado, el trastorno específico, el estado del paciente, etc. Típicamente, una dosis terapéutica será suficiente para disminuir en forma sustancial la población de células indeseables en el tejido diana, mientras se mantiene la viabilidad del paciente. El tratamiento en general continuará hasta que haya una reducción sustancial, p. ej., por lo menos aproximadamente 50% de reducción en la carga celular, y podrá continuar hasta que prácticamente no se detecten células indeseables en el organismo.

Los compuestos también son útiles en la inhibición específica de la vía de señalización mediada por proteína cinasas. Las proteína cinasas están implicadas en las vías de señalización para dichas actividades celulares importantes como las respuestas a señales extracelulares y puntos de control del ciclo celular. La inhibición de proteína cinasas específicas proporciona un medio para intervenir en estas vías de señalización, por ejemplo para bloquear el efecto de una señal extracelular, para liberar una célula del punto de control del ciclo celular, etc. Los defectos en la actividad de las proteína cinasas se asocian con una diversidad de patologías o afecciones clínicas, donde existe un defecto en la señalización mediada por proteína cinasas. Dichas afecciones incluyen aquellas asociadas con defectos en la regulación del ciclo celular o en respuesta a señales extracelulares, p. ej., hiperglucemia y diabetes de tipo I y de tipo II, trastornos inmunológicos, p. ej., enfermedades autoinmunitarias y de inmunodeficiencia; trastornos hiperproliferativos, que pueden incluir psoriasis, artritis, inflamación, angiogénesis, endometriosis, cicatrización, cáncer, etc.

Los compuestos de la presente invención son activos para inhibir proteína cinasas purificadas, es decir, existe una reducción en la fosforilación de un sustrato específico en presencia del compuesto. Una proteína cinasa de interés particular es la cinasa unida a integrina (ILK). La ILK es una serina treonina cinasa. Se puede acceder al DNA y la secuencia de aminoácidos pronosticada en Genbank, núm. U40282, o como se ha publicado en Hannigan et al. Nature (1996) 379:91-96. La ILK regula la actividad extracelular de la integrina (interacciones ECM) de adentro de la célula mediante su interacción directa con la subunidad de integrina, interfiriendo con la actividad de ILK, permite el direccionamiento específico de la función de la integrina, a la vez que deja intactas otras vías de señalización esenciales. El aumento en los niveles de la actividad de ILK celular obstaculiza el requerimiento normal de adhesión a la membrana extracelular en la regulación del crecimiento celular. Por lo tanto, al inhibir la actividad de ILK se puede inhibir el crecimiento celular independiente del anclaje.

También se sabe que muchos tipos de células sufren apoptosis si no se mantienen los contactos apropiados con las proteínas de la matriz extracelular (anoikis). La inducción de apoptosis mediante los compuestos de la invención en dichas células predice una asociación con la vía de señalización de la ILK.

Los compuestos de la presente invención se unen a las proteína cinasas con gran afinidad y encuentran utilidad como reactivos de afinidad para el aislamiento y/o la purificación de dichas cinasas. La cromatografía de afinidad se usa como método para separar y purificar proteína cinasas y fosfatasas usando la afinidad bioquímica de la enzima para inhibidores que actúan sobre ella. Los compuestos se acoplan a una matriz o gel. Preferiblemente, se utiliza una microesfera o matriz como soporte. Dichos soportes se conocen en la técnica y se comercializan. El soporte acoplado al inhibidor se emplea para separar una enzima que se une al inhibidor a partir de una mezcla compleja, p. ej., un lisado celular, que puede opcionalmente purificarse en forma parcial. La mezcla de la muestra se contacta con el soporte acoplado al inhibidor bajo condiciones que minimizan la unión no específica. Los métodos conocidos en la técnica incluyen columnas, geles, capilares, etc. Los compuestos no unidos se lavan y quedan libres de la resina, y las proteínas unidas se eluyen luego en un tampón adecuado.

Los compuestos de la invención pueden también ser útiles como reactivos para estudiar la transducción de señales o cualquiera de los trastornos clínicos mencionados en la presente memoria

Trastornos hiperproliferativos de interés

Existen muchos trastornos asociados con una desregulación de la proliferación celular. Las afecciones de interés incluyen, aunque sin limitarse a ello, las siguientes.

Los compuestos de la invención se aplican al tratamiento de una diversidad de afecciones en las que hay proliferación y/o migración de células de músculo liso, y/o células inflamatorias hacia la capa íntima de un vaso, produciendo un flujo sanguíneo restringido a través de ese vaso, es decir, lesiones oclusivas neoíntimas. Las afecciones vasculares oclusivas de interés incluyen aterosclerosis, enfermedad vascular coronaria de injerto después de un trasplante, estenosis de injerto venoso, estenosis de injerto protésico peri-anastomótico, restenosis después de angioplastia o colocación de stent, y similares.

Las enfermedades en las que hay hiperproliferación y remodelación de tejido o reparación de tejido reproductivo, p. ej., carcinoma uterino, testicular y ovárico, endometriosis, carcinoma escamoso y epitelial glandular del cuello del útero, etc. se reducen en el número de células por administración de los compuestos de la invención

Las células tumorales se caracterizan por crecimiento descontrolado, invasión a los tejidos circundantes y diseminación metastásica a sitios distantes. El crecimiento y la expansión requieren una capacidad no solo de proliferar, sino también de modular negativamente la muerte celular (apoptosis) y activar la angiogénesis para producir una neovascularización tumoral. La angiogénesis puede inhibirse afectando la capacidad celular de interactuar con el entorno extracelular y de migrar, que es una función específica de la integrina, o regulando la apoptosis de las células endoteliales. Las integrinas funcionan en las interacciones adhesivas de una célula a otra y de una célula a la matriz extracelular (ECM) y transducen señales desde una ECM hacia el interior de la célula y viceversa. Dado que estas propiedades implican el involucramiento de la integrina en la migración, invasión e intra y extravasación de las células, y la interacción de las plaquetas, es obvia la función de las integrinas en el desarrollo y la metástasis de tumores.

Los tumores de interés para tratamiento incluyen carcinomas, p. ej., carcinoma de colon, duodenal, de próstata, mama, melanoma, ductal, hepático, pancreático, renal, endometrial, de estómago, de la mucosa oral displásica, poliposis, cáncer oral invasivo, carcinoma celular de células no pequeñas, carcinoma transicional y urinario de células escamosas, etc.; tumores malignos neurológicos, p. ej., neuroblastoma, gliomas, etc.; tumores malignos hematológicos, p. ej., leucemia aguda infantil, linfomas no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, células T cutáneas malignas, micosis fungoides, linfoma cutáneo de células T no MF, papulosis linfomatoide, hiperplasia linfoide cutánea rica en células T, pénfigo bulloso, lupus eritematoso discoide, liquen plano, etc.; y similares.

Algunos tipos de cáncer de particular interés incluyen cáncer de mama, principalmente los subtipos de adenocarcinoma. El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) es el tipo más frecuente de cáncer de mama no invasivo. En DCIS, las células malignas no han producido metástasis en las paredes de los conductos hacia el tejido graso de la mama. El carcinoma ductal infiltrante (o invasivo) (IDC) ha producido metástasis en la pared del conducto y ha invadido el tejido graso de la mama. El carcinoma lobular infiltrante (o invasivo) (ILC) es similar al IDC, en el sentido que tiene el potencial de producir metástasis en otras partes del cuerpo. Aproximadamente 10% a 15% de los cánceres de mama invasivos son carcinomas lobulares invasivos.

Es también de interés el carcinoma de pulmón de células no pequeñas. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) está conformado por tres subtipos generales de cáncer de pulmón. El carcinoma epidermoide (también llamado carcinoma de células escamosas) usualmente comienza en uno de los bronquios más grandes y se desarrolla de manera relativamente lenta. El tamaño de estos tumores puede oscilar de muy pequeño a bastante grande. El adenocarcinoma comienza a crecer prácticamente fuera de la superficie del pulmón y puede variar tanto en tamaño como en velocidad de crecimiento. Algunos adenocarcinomas de crecimiento lento se describen como cáncer de células alveolares. El carcinoma de células grandes comienza cerca de la superficie del pulmón, se

desarrolla rápidamente, y por lo general ya está bastante desarrollado cuando se diagnostica. Otras formas menos frecuentes de cáncer de pulmón son carcinoide, cilindroma, mucoepidermoide y mesotelioma maligno.

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos. Si bien la mayoría de los melanomas surgen en la piel, pueden también presentarse en las superficies mucosas o en otros sitios hacia los cuales migran las células de la cresta neural. El melanoma ocurre predominantemente en adultos, y más de la mitad de los casos se presentan en áreas aparentemente normales de la piel. El pronóstico se ve afectado por factores clínicos e histológicos y por la ubicación anatómica de la lesión. El espesor y/o el nivel de invasión del melanoma, el índice mitótico, el tumor que infiltra los linfocitos y la ulceración o hemorragia en el sitio primario afectan el pronóstico. La estadificación clínica se basa en si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales o a sitios distantes. Para la enfermedad clínicamente limitada al sitio primario, cuanto mayores sean el espesor y la profundidad de la invasión local del melanoma, mayor será la probabilidad de metástasis en los ganglios linfáticos y peor será el pronóstico. El melanoma puede propagarse por extensión local (a través del sistema linfático) y/o por rutas hemáticas a sitios distantes. Cualquier órgano puede estar comprometido por metástasis, pero los pulmones y el hígado son sitios frecuentes.

Otras enfermedades hiperproliferativas de interés se asocian con la hiperproliferación epidérmica, remodelación y reparación de tejido. Por ejemplo, la inflamación crónica de la piel de psoriasis se asocia con queratinocitos epidérmicos hiperplásicos, como también con células mononucleares infiltrantes que incluyen células T de memoria CD4+, neutrófilos y macrófagos.

La proliferación de células inmunitarias se asocia con una serie de trastornos autoinmunitarios y linfoproliferativos. Las enfermedades de interés incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide y diabetes mellitus insulino dependiente. Los datos indican que las anomalías en la apoptosis desempeñan una parte en la patogenia del lupus eritematoso sistémico (SLE). Otros cuadros linfoproliferativos incluyen el trastorno heredado de apoptosis de linfocitos, que es un síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, como también una serie de leucemias y linfomas. Los síntomas de alergias a agentes ambientales y alimentos, como también la enfermedad inflamatoria de los intestinos, pueden también aliviarse con los compuestos de la invención.

En un aspecto de la invención, los compuestos pirazolilbenzotiazol descritos en la presente memoria se pueden usar para inhibir la cinasa unida a integrina (ILK) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y afecciones autoinmunitarias tales como psoriasis en las que el sistema inmunitario contribuye directamente a la patogenia de la enfermedad. La cinasa unida a integrina (ILK) es una serina/treonina cinasa de 59 kDa que se asocia con las porciones de extremo citoplásmico de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, las moléculas que median la adhesión de distintas células a otras células o a diversos componentes de la matriz extracelular. Además, la ILK se asocia e interactúa con una serie de proteínas intracelulares. La actividad enzimática de la ILK es modulada por la interacción de las células que expresan ILK con el agrupamiento de fibronectina, integrina del componente de la matriz extracelular (ECM), como también una diversidad de factores de crecimiento. La actividad de la ILK se asocia con una serie de eventos de señalización en dirección 3'. Tras la adhesión a ECM, las integrinas y un grupo selectivo de proteínas citoesqueléticas y de señalización se incorporan a los sitios de contacto de la matriz celular donde sirven para unir el esqueleto de actina al ECM. Estos enlaces funcionan para mediar la comunicación entre los compartimientos intracelulares y extracelulares.

Por ende, en un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones terapéuticas y compuestos para el tratamiento de trastornos inflamatorios que incluyen enfermedades autoinmunitarias que usan compuestos que inhiben la actividad de la ILK. Dichos trastornos y enfermedades incluyen, aunque sin limitarse a ello, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, dermatitis atópica, asma y alergia. Las células diana susceptibles al tratamiento incluyen células implicadas en instigar reacciones autoinmunitarias como también aquellas que sufren o responden a los efectos del ataque autoinmunitario o eventos inflamatorios.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos de pirazolilbenzotiazol que funcionan como inhibidores de ILK pueden formularse en una diversidad de composiciones. Los excipientes adecuados para uso con inhibidores de ILK incluyen agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, Cremaphor™, etanol y similares. Estas composiciones pueden comprender otros componentes tales como agentes y excipientes de administración convencionales que incluyen agentes de isotonzación, reguladores de pH, disolventes, solubilizantes, tintes, agentes de gelificación, espesantes, tampones y sus combinaciones. Para apaciguar enfermedades inflamatorias/autoinmunitarias tales como psoriasis, los inhibidores de ILK se administran por medios apropiados que incluyen, aunque sin limitarse a ello, las rutas oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular o tópica. La administración local, tal como tópica, de un inhibidor de ILK provee altas concentraciones en el sitio de tratamiento a la vez que reduce la probabilidad de efectos no específicos u otros no deseados que podrían asociarse con la administración sistémica de dichos compuestos. Para la administración local de compuestos de pirazolilbenzotiazol para psoriasis y otras afecciones cutáneas autoinmunitarias o inflamatorias, los compuestos se pueden administrar en excipientes que contienen concentraciones de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/ml directamente aplicados a la piel. Si se requiere la administración sistémica, se administra un intervalo de dosis de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente menos de 10 mg/kg. El compuesto de pirazolilbenzotiazol puede administrarse hasta 3 veces por día. La administración oral puede realizarse en comprimidos, cápsulas, suspensiones líquidas o disoluciones.

Si bien la psoriasis no es potencialmente mortal, el estigma social y la reducción de la calidad de vida asociada con la enfermedad son cuestiones profundas para estos pacientes y sus familiares. Las terapias anti-psoriasis consolidadas han sido agrupadas en tipos supresores y de remisión. Las terapias supresoras (p. ej., ciclosporina, calcitriol tópico, metotrexato, retinoides), producen el aclaramiento de las placas, aunque estos medicamentos no se asocian con una normalización completa de los marcadores farmacodinámicos de la piel o grandes reducciones de la cantidad de células T en las placas. La fototerapia con luz ultravioleta (UV) B (280-320 nm) sola o combinada con derivados de carbón y alquitrán y fotoquimioterapia con 8-metoxipsoralen combinado con luz UV A (320-400 nm) (PUV A) se clasifican como terapias anti-psoriasis del tipo con remisión. La luz UV B y PUV A se administran típicamente en sesiones de tratamiento múltiples, con frecuencia varias veces por semana, hasta lograr el aclaramiento de la placa. La presente invención provee compuestos de pirazolilbenzotiazol que pueden administrarse en combinación con terapias antipsoriasis consolidadas.

Trastornos renales

Los compuestos de pirazolilbenzotiazol descritos en la presente memoria se pueden utilizar para modular la cinasa unida a integrina (ILK) para el tratamiento de nefropatías. Por lo tanto, se describen composiciones y métodos terapéuticos para tratar nefropatías, y específicamente composiciones y métodos terapéuticos para modular, y especialmente inhibir, la actividad de ILK como para apaciguar las nefropatías glomerulares que pueden producir proteinuria, o estados caracterizados por daño tubular o túbulo-intersticial. Los compuestos de pirazolilbenzotiazol preferidos pueden identificarse estudiando la actividad biológica en un ensayo funcional basado en ILK, p. ej., actividad de la cinasa ILK *in vitro* o *in vivo*.

De acuerdo con las terapias actuales, el avance crónico de la nefropatía puede demorarse por 6-12 meses usando inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), pero no existe otro tratamiento satisfactorio en este momento, aparte de la diálisis y en último caso el trasplante del órgano. Según la presente invención, los compuestos de pirazolilbenzotiazol pueden administrarse en un momento apropiado, antes, simultáneamente o después de una segunda terapia para tratar la nefropatía, si esa segunda terapia incluye, aunque sin limitarse a ello, la administración de un inhibidor de ACE, o su sal farmacéuticamente aceptable, y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un mamífero que lo necesita. Los inhibidores de ACE incluyen, aunque sin limitarse a ello, captopril, benazepril, enalapril, fosinopril, lisinopril, quinapril, ramipril, imidapril, perindopril, erbumina y trandolapril. Los bloqueantes de los receptores de ACE pueden también utilizarse en lugar de, o además de, los inhibidores de ACE, y éstos incluyen losartan, irbesartan, candesartan, cilexetil y valsartan.

Por lo tanto, se describe un método para tratar a un paciente que padece disfunción renal, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto o una composición de pirazolilbenzotiazol, que incluye un compuesto de pirazolilbenzotiazol como se describe en la presente memoria. El compuesto se administra por vía oral, o el compuesto se administra por vía intravenosa, o el compuesto se administra por vía intraperitoneal. El compuesto se puede administrar por vía intraluminal en el riñón o alrededor del riñón. El paciente también puede tratarse con un inhibidor de ACE.

Se describe un método para reducir los niveles de proteína en la orina, que comprende administrar a ese paciente una cantidad eficaz de un compuesto de pirazolilbenzotiazol, o una composición que comprende un compuesto de pirazolilbenzotiazol como se describe en este documento. En diversas realizaciones, el compuesto se administra por vía oral o intravenosa o intraperitoneal. El compuesto se puede administrar por vía intraluminal en el riñón o alrededor del riñón. El paciente puede también tratarse con un inhibidor de ACE.

Trastornos oculares

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de pirazolilbenzotiazoles como se describe en la presente memoria, en el tratamiento de diversas enfermedades oculares con patología subyacente de neovascularización de cornea, iris, retina o coroides. Los presentes métodos se usan para fines profilácticos o terapéuticos con el objetivo de tratar enfermedades oculares para prevenir, reducir o revertir la pérdida de agudeza visual como así también la pérdida de visión secundaria a neovascularización de cornea, iris, retina o coroides. El término "tratar" se emplea para referirse tanto a la prevención de la enfermedad como al tratamiento de afecciones pre-existentes. Si bien es conveniente el tratamiento durante las etapas tempranas, los síntomas adversos de la enfermedad pueden aliviarse parcialmente con el tratamiento durante las etapas tardías.

En un aspecto, los compuestos de pirazolilbenzotiazol que modulan la actividad de la cinasa unida a integrina (ILK) se administran sistémica o localmente para tratar enfermedades oftálmicas con una patología subyacente característica de neovascularización ocular. Dicho tratamiento se usa solo como monoterapia o combinado con una segunda terapia como auxiliar para prevenir, reducir o revertir la pérdida de agudeza visual, como también la pérdida de visión secundaria a neovascularización de cornea, iris, retina o coroides.

Por ejemplo, en un aspecto, la invención se refiere a un compuesto para prevenir, reducir o revertir la neovascularización ocular en el ojo de un animal que presenta una lesión neovascular, que comprende las etapas de identificar dicha lesión en el ojo del animal, administrar al animal una cantidad de un compuesto de pirazolilbenzotiazol, como se describe en la presente memoria, suficiente para permitir que dicho compuesto se

localice en dicha lesión. Los compuestos para uso en métodos que utilizan la administración local que provee una concentración localizada prolongada, que pueden emplear implantes de liberación sostenida, disoluciones viscosas u otra formulación típica, son de particular interés. Un compuesto de pirazolilbenzotiazol puede administrarse solo como monoterapia, o en combinación con una segunda terapia, por ejemplo en un momento apropiado, antes, simultáneamente o después, en relación con una segunda terapia que incluye, aunque sin limitarse a ello, terapia de Visudyne™, fotocoagulación o termoterapia transpupilar como tratamiento auxiliar para la neovascularización ocular.

Algunos ejemplos de trastornos oculares que pueden tratarse mediante diversas realizaciones de la presente invención incluyen, sin limitación: enfermedades retinales (retinopatía diabética, glaucoma crónico, desprendimiento de retina, retinopatía de drepanocitos, degeneración macular asociada con la edad (AMD) debido a neovascularización subretinal); rubeosis del iris; enfermedades inflamatorias; uveítis crónica; neoplasias (ratinoblastoma, pseudoglioma); iridociclitis heterocrómica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularización de cornea (inflamatoria, trasplante, hipoplasia del desarrollo del iris); neovascularización que le sigue a vitrectomía y lensectomía combinadas; enfermedades vasculares (isquemia retinal, insuficiencia vascular coroidea, trombosis coroidea, isquemia de la arteria carótida); neovascularización del nervio óptico; y neovascularización debida a penetración en el ojo o lesión ocular contusiva.

En la práctica del uso de un compuesto de pirazolilbenzotiazol en enfermedades oftálmicas con una patología subyacente característica de neovascularización ocular, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de pirazolilbenzotiazol a un sujeto afectado con una enfermedad o trastorno relacionado con neovascularización, o con un tejido que ha sido neovascularizado. El inhibidor puede administrarse de acuerdo con el método de la invención o bien solo o en combinación con otras terapias conocidas para neovascularización. Cuando se co-administra con una o más de otras terapias, el compuesto de pirazolilbenzotiazol puede administrarse o bien simultáneamente con el otro tratamiento(s), o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico de cabecera decidirá la secuencia de administración apropiada, que puede ser antes o después de una segunda terapia.

Las terapias secundarias de interés incluyen terapia fotodinámica, por ejemplo terapia de verteporfina (VISUDYNE™), véase, por ejemplo, Madreperla (2001) Arch Ophthalmol. 119(11):1606-1610; Harding (2001) Eye 15(Pt 3):407-12; Sharma (2001) Can Fam Physician 47:955, 963. Fotocoagulación o termoterapia transpupilar, véase, p. ej., Rogers et al. (2001) Curr Opin Ophthalmol 12(3): 212-5; Ardjomand et al. (2001) Ophthalmologica 215(3):241-4; Mainster et al. (2000) Ophthalmic Surg Lasers 31(5):359-73. Otras terapias incluyen, sin limitación, aquellas expuestas en la patente estadounidense 6.297.228, "Use of angiostatic steroids in photodynamic therapy", patente estadounidense 6.271.233 "Method for treating ocular neovascular diseases"; patente estadounidense 6.248.734 "Use of photodynamic therapy for prevention of secondary cataracts"; patente estadounidense RE37.180 "Photochemotherapeutical obstruction of newly-formed blood vessels"; patente estadounidense 6.225.303 "Use of green porphyrins to treat neovascutature in the eye"; patente estadounidense 6.217.895 "Method for treating and/or preventing retinal diseases with sustained release corticosteroids"; patente estadounidense 6.214.819 "Method for treating ocular neovascular diseases", y similares.

Algunas enfermedades oculares llevan al tratamiento agudo, mientras que otras requieren terapias a más largo plazo. La retinopatía proliferativa puede alcanzar un umbral en una cuestión de días, como se observa en ROP, algunos casos de retinopatía diabética y glaucoma neovascular. Los bebés prematuros conllevan riesgo de neovascularización alrededor de lo que sería la semana 35 de gestación, durante algunas semanas después del nacimiento, y seguirán en riesgo durante un periodo de tiempo breve hasta que la retina se haya vascularizado. La retinopatía diabética puede ser aguda pero puede también estar latente en la fase proliferativa por un tiempo considerablemente más prolongado. Existen modelos animales adecuados para determinación de la dosis apropiada, aunque la eficacia de un efecto terapéutico varía en gran medida en los distintos animales, por ejemplo, las dosis típicamente son 20, 30 o incluso 40 veces más pequeñas (por unidad de peso corporal) en el hombre que en la rata. De manera similar, el modo de administración puede tener un efecto más prologado sobre la dosis. Se ha establecido un modelo murino de neovascularización retinal inducida por oxígeno que ocurre en 100% de los animales tratados y es cuantificable (Smith et al. (1994) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci 35:101-111). La bioactividad puede determinarse por métodos que incluyen el ensayo de permeabilidad del recipiente de Miles (Miles y Miles, J. Physiol. (Lond.) (1952) 118:228), que mide la permeabilidad del recipiente, y la mitogenicidad de las células endoteliales, que mide el crecimiento celular.

Para aplicación local, se administra un intervalo de aproximadamente 0,05 a 0,2 o aproximadamente 0,5 mg/ml de un compuesto de pirazolilbenzotiazol en una formulación apropiada o bien por vía intraocular (intra-vítrea, subretinal, de la cámara intra-anterior, intra-escleral), periocular o tópica en la cornea. Para aplicación sistémica, se administra un intervalo de 0,05 a 100 mg/kg peso corporal, preferiblemente menos de aproximadamente 10 mg/kg para tratar la enfermedad ocular. Para administración intra- o peri-ocular, se administra un compuesto de pirazolilbenzotiazol en una formulación inyectable o bien por inyección intraocular en las concentraciones anteriormente descritas y a una frecuencia de una vez cada 2-6 meses, o por implantación intraocular de un dispositivo o una formulación específica de un inhibidor de ILK que permite la liberación sostenida del inhibidor de ILK durante un periodo de tiempo. Para aplicación cornea, un inhibidor de ILK en una formulación apropiada se aplica tópicamente a la cornea en una frecuencia de una vez cada 4-6 horas. Para aplicación sistémica, se administra un inhibidor de ILK en una formulación apropiada por vía oral 1-3 veces por día.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención provee un compuesto o composición para tratar la neovascularización ocular. Opcionalmente, el tratamiento reduce o revierte la pérdida de agudeza visual secundaria a neovascularización de cornea, iris, retina o coroides. El compuesto puede además utilizarse con una segunda terapia para neovascularización ocular, donde una segunda terapia adecuada se selecciona del grupo que consiste en terapia fotodinámica, fotocoagulación y termoterapia transpupilar. En el presente aspecto, la neovascularización ocular puede seleccionarse del grupo que consiste en retinopatía diabética, glaucoma crónico, desprendimiento de retina, retinopatía de drepanocitos, degeneración macular asociada con la edad (AMD) debida a neovascularización subretinal; rubeosis del iris; enfermedades inflamatorias; uveítis crónica; neoplasias; iridociclitis heterocrómica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularización de cornea; neovascularización que le sigue a una vitrectomía y lensectomía combinadas; isquemia retinal, insuficiencia vascular coroidea, trombosis coroidea, isquemia de la arteria carótida; neovascularización del nervio óptico; y neovascularización debida a penetración en el ojo o lesión ocular contusiva. En diversas realizaciones, el compuesto de pirazolilbenzotiazol se administra sistémicamente, o por vía intra-ocular o peri-ocular, o se administra tópicamente en la cornea, o se administra por inyección intra-ocular, o se administra por implantación intra-ocular.

Los siguientes ejemplos se exponen para ofrecer a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo preparar y utilizar la presente invención, y no tienen como fin limitar el alcance de lo que se considera la invención. Se ha hecho todo lo posible por asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, concentraciones, etc.) pero debe haber cierto margen para errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique algo distinto, las partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, temperatura es en grados centígrados; y presión es presión atmosférica o próxima a ésta. Los materiales de partida utilizados en los ejemplos pueden adquirirse de un proveedor químico tal como Aldrich y Lancaster, o pueden prepararse siguiendo los procedimientos de preparación descritos en la presente memoria:

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación 1: Síntesis de 2-Amino-4-fluorobencenotiol

A una disolución de 2-cloro-5-fluoronitrobenzoceno (1,81 g, 10,31 mmol) disuelto en 30 ml de agua desionizada a temperatura ambiente se le añadió monohidrato de sulfuro de sodio (9,90 g, 41,24 mmol) en una sola porción. La disolución resultante se calentó hasta reflujo y se agitó bajo nitrógeno durante 32 horas. La disolución amarilla ligera resultante se enfrió luego hasta temperatura ambiente y se lavó con 5 x 50 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó para proveer un aceite amarillo. El material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 10:1$ para dar 0,36 g (25%) del compuesto del título. MS (m/z, ES⁺): 144,0 (M+1, 100%); IR (KBr): 3430, 3340, 1615, 1573, 1482, 1281, 1248, 1172, 1124, 1044, 975, 840, 792 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, ppm, DMSO-d_6) δ : 6,89 (dt, 1H), 6,50 (dd, 1H), 6,21 (dt, 1H), 5,80 (br s, 2H).

Preparación 2: Síntesis de Tiazolo [5,4-b]piridin-2-ilamina

Una suspensión de 2-cloro-3-aminopiridina (3 g, 23 mmol) y tiocianato de amonio (3,5 g, 46,5 mol) en 23 ml de etanol se acidificó con HCl conc. hasta pH ~1 (~1,8 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 85 °C durante 3 días. En este punto, el disolvente se evaporó, y se eliminó el agua residual azeotrópicamente por la destilación de 2-propanol. El residuo amarillo se mezcló con 12 ml de hidróxido de amonio 7 M y 7 ml de cloroformo. Se aisló el sólido por filtración para dar 1,50 g (43%) del producto en forma de un polvo blanco. MS (m/z, ES⁺): 152 (M+1, 100%).

Preparación 3: Síntesis de 4-Fluorobenzotiazol-2-ilamina

A una suspensión de (2-fluorofenil)tiourea (1,7g, 10,0 mmol) en cloroformo (25ml) se le añadió una disolución de bromo (0,51 ml; 10,0 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 horas. El disolvente se evaporó, se añadió agua, y la mezcla se neutralizó con hidróxido de amonio. La precipitación blanca resultante se recogió por filtración y se secó para proveer 1,2 g (72%) del compuesto del título, que se usó en la etapa subsiguiente sin más purificación.

Preparación 4: Síntesis de 7-Cloro-4-metoxibenzotiazol-2-ilamina

El compuesto del título se preparó a partir de (5-cloro-2-metoxifenil)tiourea (2,17 g, 10,0 mmol) usando un procedimiento análogo a aquel descrito en la Preparación 3. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 2,1 g (98%).

Preparación 5: Síntesis de Ácido 4-amino-2-fluorobenzoico

A una disolución de ácido 2-fluoro-4-nitrobenzoico (1,0 g, 5,4 mmol) en 20 ml de una mezcla de ácido acético y metanol (1:1) se le añadió una cantidad catalítica de paladio sobre carbón (25 mg). La reacción se agitó en atmósfera de gas hidrógeno a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró a través de celite, y el

disolvente se eliminó por evaporación para dar 0,86 g (100%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema.

Preparación 6: Síntesis de 4-Amino-2-fluoro-N-metilbencenosulfonamida.

5 Una disolución de N-(3-fluorofenil)acetamida (20,0, 0,13 mol) en ácido clorosulfónico (150 ml) se calentó hasta 75 °C durante 1 hora. La disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió sobre hielo. La suspensión resultante se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron para dar 15,5 g (47%) de cloruro de 4-acetilamino-2-fluorobencenosulfonilo como una pasta. El material bruto se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

10 El cloruro de 4-acetilamino-2-fluorobencenosulfonilo anteriormente preparado (2 g, 7,9 mmol) se disolvió en diclorometano, y se añadió metilamina (9,9 ml de una disolución 2M disolución en THF, 19,9 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se evaporó luego a presión reducida, y el sólido resultante se suspendió en 50 ml de agua. El sólido se aisló por filtración para dar 1,55 g (79%) de N-(3-fluoro-4-metilsulfamoilfenil) acetamida, que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

15 La N-(3-fluoro-4-metilsulfamoilfenil)acetamida anteriormente preparada (1,55 g, 6,3 mmol) se suspendió en 40 ml de HCl 6M y se calentó a reflujo durante 1 hora. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió una disolución de NaOH para ajustar la mezcla a pH 5. El precipitado blanco resultante se aisló por filtración y se lavó con agua y se secó para dar 1,07 g (83%) del compuesto del título. MS (m/z, ES⁺): 205,0 (M+1, 100%); ¹H NMR (500 MHz, ppm, DMSO_{d6}): 7,35 (m, 1H), 7,12 (m, 1H), 6,40 (m, 2H), 6,23 (s, 2H), 2,40 (s, 3H).

Preparación 7: Síntesis de 4-Amino-N-metilbencenosulfonamida

20 A una disolución enfriada con hielo de cloruro de 4-nitrobencenosulfonilo (2,7 g, 12 mmol) y trietilamina (27 mmol) en 60 ml de THF seco se le añadió metilamina (8 ml de una disolución 2 M en THF, 16 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió salmuera y la disolución de reacción se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron para dar metilamida de ácido 4-nitrobencenosulfónico en forma de un aceite. El material bruto se usó en la reacción subsiguiente sin purificación adicional.

30 A una disolución de la 4-nitrobencenosulfonil metilamida bruta preparada anteriormente en 45 ml de etanol, se le añadió un 1 ml de una suspensión de Níquel Raney. Se añadió monohidrato de hidrazina (18 mmol) lentamente en varias porciones. Un cambio en el color de la disolución de amarillo a incoloro indicó que la reacción se había completado. La mezcla se agitó durante otra hora más. Los sólidos se eliminaron por filtración, y el disolvente se evaporó. El material bruto resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 10:1 para proporcionar 2,09 g (90% para las dos etapas) del compuesto del título en forma de un polvo anaranjado pálido.

Preparación 8: Síntesis de Ácido 2-aminobenzotiazol-7-carboxílico

35 Se agitó ácido 3-isotiocianatobenzoico (1,0 g, 5,6 mmol) en 40 ml de etanol a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras se burbujeaba gas de amoníaco a través de la disolución. El precipitado blanco resultante se aisló por filtración. El volumen del filtrado se redujo para inducir la precipitación de sólido blanco adicional que también se aisló por filtración. El rendimiento total del ácido 3-tioureidobenzoico fue 1,06 g (97%).

40 A una suspensión de ácido 3-tioureidobenzoico (1,06 g, 5,41 mmol) en cloroformo (25 ml) se le añadió una disolución de bromo (0,4 ml, 8,0 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 horas y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 60 horas. El disolvente se evaporó, se añadió agua, y los sólidos resultantes se aislaron por filtración. El producto bruto se lavó con agua y se secó para proveer 1,03 g (98%) del compuesto del título en forma de un sólido gris.

Preparación 9: Síntesis de amida de Ácido 2-cianometilbenzotiazol-6-sulfónico

45 1. A una suspensión de 4-amino-N-metilbencenosulfonamida (43 g, 250 mmol) en 400 ml de ácido acético se le añadió tiocianato de amonio (49 g, 650 mmol) en varias porciones. Después de que la mezcla había sido agitada a temperatura ambiente durante 30 min, se añadió gota a gota una disolución de bromo (13 ml, 250 mmol) en 160 ml de ácido acético. La reacción se agitó luego a temperatura ambiente durante 64 horas. Los sólidos resultantes se aislaron por filtración, se lavaron con disolución saturada de NaHCO₃ y agua, y se secó para proveer 60 g de material. El filtrado se evaporó a sequedad, el residuo se suspendió en disolución saturada de NaHCO₃ y se extrajo producto adicional en acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron para proveer 6,2 g adicionales de producto para dar un total de 66 g de amida de ácido 2-aminobenzotiazol-6-sulfónico.

55 2. Una disolución de amida de ácido 2-aminobenzotiazol-6-sulfónico (66 g, 287 mmol) y NaOH (90 g, 2,3 mol) en 400 ml de agua se sometió a reflujo en argón durante una noche. La disolución de reacción se enfrió en un baño de hielo y se acidificó hasta aproximadamente pH 3 por adición de HCl concentrado (~180 ml). El precipitado resultante se

aisló por filtración y se secó para dar 74 g de 4-amino-3-mercaptobencenosulfonamida en forma de un polvo blanco. MS (m/z, ES+): 205 (M+1, 100%).

3. Una suspensión de 4-amino-3-mercaptobencenosulfonamida (74 g, 208 mmol) y malononitrilo (25 g, 375 mmol) en 650 ml de etanol con 1,3 ml de HCl conc. se sometió a reflujo en argón durante una noche. Los sólidos pardos oscuros se aislaron por filtración y se lavaron con etanol y éter para dar aproximadamente 30 g del producto bruto. El volumen del filtrado se redujo por evaporación, y los sólidos que precipitaron se aislaron por filtración para dar 12 g adicionales de producto. El material bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con CH₂Cl₂: MeOH:amoníaco (60: 20: 1 ml) para proveer un total de 22,2 g (35% para las tres etapas) del compuesto del título en forma de un polvo anaranjado.

10 Preparación 10: Síntesis de (5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)acetonitrilo

El compuesto del título se preparó en dos etapas, comenzando por 6-fluoro-5-metoxianilina (1,41 g, 10 mmol) y tiocianato de amonio (1,83 g, 24 mmol) usando un procedimiento análogo a aquel descrito en la Preparación 9. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 240 mg (10% para las 3 etapas).

Preparación 11: Síntesis de (6-Metoxibenzotiazol-2-il)acetonitrilo

- 15 El compuesto del título se preparó en dos etapas, comenzando por 6-metoxibenzotiazol-2-ilamina (10 g, 55 mmol) usando un procedimiento análogo a aquel descrito en la Preparación 9. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 8,5 g (75% para las 2 etapas).

Preparación 12: Síntesis de 2-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo

- 20 A una disolución fría agitada de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)acetonitrilo, (1,48 g, 6,65 mmol), disulfuro de carbono (0,90 ml, 15 mmol) y yodometano (1,7 ml, 27 mmol) en dimetilsulfóxido anhidro (40 ml) se le añadió hidruro de sodio (540 mg de una suspensión al 60% en aceite mineral, 13,5 mmol) en porciones bajo una atmósfera inerte. La mezcla de reacción roja oscura se agitó a 5 °C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 2 horas antes de inactivarse con cloruro de amonio saturado acuoso (20 ml) y diluirse con agua destilada. El precipitado anaranjado resultante se aisló por filtración, se lavó con agua, se suspendió en isopropanol y se re-filtró.
- 25 El precipitado se secó luego al vacío para dar 1,61 g (74%) del compuesto del título en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES+): 328 (M+1, 100%).

Preparación 13: Síntesis de 2-(6-Metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo

- 30 El compuesto del título se preparó a partir de 2-(6-metoxibenzotiazol)-acetonitrilo (1,50 g, 7,34 mmol) usando un procedimiento análogo a aquel descrito en la Preparación 12. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 1,63 g (72%). MS (m/z, ES+): 309 (M+1, 60%), 465 (subproducto, 100%).

Preparación 14: Síntesis de 2-Benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo

El compuesto del título se preparó a partir de benzotiazol-2-ilacetonitrilo (1,74 g, 10 mmol) usando un procedimiento análogo a aquel descrito en la Preparación 12. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 1,25 g (45%). MS (m/z, ES+): 279 (M+1, 100%).m/z

35 Preparación 15: Síntesis de Benzoxazol-2-ilacetonitrilo

Compuesto preparado por este procedimiento en Sakamoto, M.; Nozaka, A.; Shimamoto, M.; Ozaki, H.; Suzuki, Y.; Yoshioka, S.; Nagano, M.; Okamura, K.; Date, T.; Tamura, O. J. Chem. Soc. Perk en Trans. (1995), 1759 y referencias allí citadas).

- 40 A una disolución de 2-aminofenol (5,0 g, 45,8 mmol) disuelta en 115 ml de etanol anhidro y 8 ml de ácido acético glaciado se le añadió malonitrilo (9,08 g, 140 mmol) a 100 °C. La disolución homogénea resultante se sometió a reflujo durante 24 horas, y el disolvente se eliminó a vacío para dar un aceite rojo/pardo. El aceite se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml) y los sólidos remanentes se eliminaron por filtración. El licor madre se lavó dos veces con una disolución saturada de bicarbonato sódico y dos veces con agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para proveer 5,2 g (71%) del producto en forma de un aceite amarillo. Este material se usó en la reacción subsiguiente sin purificación adicional.
- 45

Preparación 16: Síntesis de 2-Benzoxazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo (Augustin, M.; Doelling, W.; J. Prakt. Chem. (1982) 1, 3).

- 50 A una disolución de benzoxazol-2-ilacetonitrilo (2,07 g, 13,1 mmol) disuelta en 35 ml de DMSO a temperatura ambiente en atmósfera de argón se le añadió disulfuro de carbono (1,10 g, 14,4 mmol) seguido de yodometano (5,20 g, 36,7 mmol). Esta disolución se enfrió luego a 10 °C y se añadió hidruro de sodio (1,05 g, 60% en peso en aceite, 26,3 mmol) durante un periodo de varios minutos. La disolución se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La reacción se inactivó luego con disolución de cloruro de amonio y se extrajo con 5 x 50 ml de acetato de etilo. El acetato de etilo se lavó con disolución de salmuera (3 x 50 ml) y agua (3 x 30 ml). La fase

orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para dar un aceite rojo. El material bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 98:2$ para dar 1,96 g (57%) del producto deseado en forma de un aceite amarillo. MS (m/z, ES+): 236,68 (M+1, 100%).

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de los compuestos descritos en la presente invención.

5 Ejemplo comparativo 2

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3-ILAMINA

Una mezcla de 2-aminobencenotiol (100 mg, 0,8 mmol) y 3-aminopirazol-4-carbonitrilo (86 mg, 0,8 mmol) en 3 g de ácido polifosfórico se calentó a 200 °C durante 3 horas. La mezcla se vertió luego en agua con hielo y se neutralizó con disolución concentrada de hidróxido de amonio. El sólido amarillo resultante se aisló por filtración y se lavó con agua fría para dar el compuesto del título (70 mg, 40%). MS (m/z, ES+): 217 (M+1, 100%); ^1H NMR (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 7,97 (d, 3J = 7,8 Hz, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,84 (d, 3J = 8,0 Hz, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,29 (m, 1H), 6,3 (br s, 2H).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

15 4-(1H-Benzoimidazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (0,031 g) se preparó comenzando por 0,30 g (2,8 mmol) 1,2-fenildiamina y 0,30 g (2,8 mmol) 3-aminopirazol-4-carbonitrilo. MS (m/z, ES+): 200 (M+1, 100%). – Rendimiento = 6%.

4-(1H-Benzoimidazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (0,047 g) se preparó comenzando por 0,46 g (4,22 mmol) de 1,2-fenildiamina y 0,52 g (4,22 mmol) de 3,5-diaminopirazol-4-carbonitrilo. MS (m/z ES+): 215 (M+1, 100%). Rendimiento = 5%.

20 2-(1H-Pirazol-4-il)-benzotiazol: El compuesto del título (0,055 g) se preparó comenzando por 0,11 g (0,090 mmol) de 2-aminofenol y 0,10 g (0,90 mmol) de ácido 4-pirazolcarboxílico en 5 ml de etanol anhidro y 1 ml de ácido acético glaciado a reflujo durante 24 horas. MS (m/z, ES+): 202 (M+1, 100%); ^1H NMR (400 MHz, ppm, DMSO- d_6) 13,45 (br s, 1H), 8,32 (br s, 2H), 8,00 (dd, 2H), 7,43 (dt, 2H). Rendimiento = 34%.

Ejemplo 3

25 SÍNTESIS DE 4-(6-BROMOBENZOTIAZOL-2-IL)-5-METIL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

1. Una mezcla de 4-bromoanilina (1,72 g 10 mmol) y tiocianato de amonio (3,05 g, 40 mmol) en ácido acético (15 ml) se agitó durante aproximadamente 15 minutos hasta obtener una disolución homogénea. Se añadió luego una disolución de bromo (1,6 g, 10 mmol) en ácido acético (7 ml) a la mezcla resultante durante un periodo de 20 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado resultante se aisló por filtración y se secó en alto vacío para proporcionar el producto bruto que se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

2. Una suspensión de 6-bromobenzotiazol-2-ilamina (2,29 g, 10 mmol) preparada arriba en hidróxido sódico (40 ml de una disolución 6 M, 240 mmol) se sometió a reflujo en argón durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se acidificó entre pH 3 y 5 con HCl conc. El precipitado resultante se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó en alto vacío para dar el producto bruto que se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

3. Una mezcla de 2-amino-5-bromobencenotiol (1,29 g, 6,3 mmol) y malononitrilo (0,66 g, 10 mmol) en etanol (20 ml) se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió luego hasta temperatura ambiente, y el precipitado resultante se aisló por filtración para dar el producto bruto que se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

4. Una mezcla de (6-bromobenzotiazol-2-il)acetonitrilo (4,9 mmol) y ortoacetato de trimetilo (0,71 g, 5,88 mmol) en anhídrido acético (12 ml) se calentó a 100 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego hasta temperatura ambiente. El precipitado resultante se aisló por filtración para proveer el producto bruto que se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

45 5. Una disolución de 2-(6-bromobenzotiazol-2-il)-3-metoxibut-2-enenitrilo (0,96 g, 3,1 mmol) e hidrato de hidrazina (0,3 ml, 5,4 mmol) en metanol (30 ml) se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió luego hasta temperatura ambiente. El sólido resultante se aisló por filtración y se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar el producto del título. MS (m/z, ES+): 308,9 ($\text{Br}^{79}\text{M} + 1$, 100%), 310,9 ($\text{Br}^{81}\text{M} + 1$, 100%). Rendimiento = 5%.

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

50 Amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico: El compuesto del título (23 mg) se preparó en cinco pasos, comenzando por 3,4 g (20 mmol) de 4-aminobencenosulfonamida. MS (m/z, ES+): 310

- (M+1, 100%). ^1H NMR (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): 11,78 (br s, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,98 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 6,68 (br s, 2H), 7,37 (s, 2H), 2,41 (s, 3H).
- 5 4-(6-Metanosulfonilbenzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (46 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 1,0 g (4,4 mmol) de 2-amino-6-metanosulfonilbenzotiazol. MS (m/z, ES+): 309 (M+1, 100%).
- 4-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (32 mg) se preparó en dos etapas, comenzando por 140 mg (0,68 mmol) de (6-metoxibenzotiazol-2-il)acetonitrilo. MS (m/z, ES+): 261 (M+1, 100%).
- 4-(6-Fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (55 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 1,0 g (5,95 mmol) de 2-amino-6-fluorobenzotiazol. MS (m/z, ES+): 248 (M+1, 100%).
- 10 5-Metil-4-tiazolo[5,4-b]piridin-2-il-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (162 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 1,5 g (10 mmol) de tiazolo[5,4-b]piridin-2-ilamina. MS (m/z, ES+): 232 (M+1, 100%).
- 4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (42 mg) se preparó en dos etapas, comenzando por 174 mg (1,0 mmol) de benzotiazol-2-ilacetonitrilo. MS (m/z, ES+) 231 (M+1, 100%).
- 15 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina (474-98E): El compuesto del título (32 mg) se preparó en dos etapas, comenzando por 0,24 g (0,86 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)acetonitrilo. MS (m/z, ES+): 279,1 (M+1, 100%).
- Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico (574-3B): El compuesto del título (64 mg) se preparó en cinco etapas, a partir de 1,4 g (10 mmol) de 4-aminobenzamida. MS (m/z, ES+): 274,0 (M+1, 100%).
- 20 N-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]acetamida (574-8E): El compuesto del título (160 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por 1,5 g (10 mmol) de N-(4-aminofenil)acetamida. MS (m/z, ES+): 245,1 (M-42, 100%); MS (m/z, ES-): 243,2 (M-44, 100%); ^1H NMR (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 11,9 -11,6 (br s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,73 (d, 1H), 7,24 (d, 1H), 6,50 (br s, 1H), 5,78 (br s, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,38 (br s, 3H); IR (KBr): 3518, 3207, 1607 (vs), 1544, 1506, 1023, 963, 821 cm^{-1} .
- 25 4-(6-Clorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (598-38): El compuesto del título (396 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 1,0 g (5,4 mmol) de 6-cloro-2-aminobenzotiazol. Durante la etapa final, se añadieron 4 gotas de HCl conc mientras la disolución se sometía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 265,0 ($\text{Cl}^{35}\text{M}+1$, 100%), 267., ($\text{Cl}^{37}\text{M}+1$, 50%).
- 30 4-(4-Fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (598-45): El compuesto del título (325 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 1,22 g (7,3 mmol) de 4-fluorobenzotiazol-2-ilamina. Durante la etapa final, se añadieron 4 gotas de HCl conc. mientras la disolución se sometía a reflujo para formar el anillo de pirazol. El sólido se eliminó por filtración, y la disolución resultante se evaporó para proporcionar el compuesto del título. MS (m/z, ES+): 249,0 (M+1, 100%).
- 35 4-(5-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (598-66): El compuesto del título (621 mg) se preparó en tres etapas, comenzando por 1,0 g (4,4 mmol) de hidrocloreto de 2-amino-4-trifluorometilbencenotiol. Durante la etapa final, se añadieron 4 gotas de HCl conc mientras la disolución se sometía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 299,0 (M+1, 100%).
- 40 4-(7-Cloro-4-metoxibenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (598-58): El compuesto del título (176 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 2,1 g (9,8 mmol) de 7-cloro-4-metoxibenzotiazol-2-ilamina. Durante la etapa final, se añadió una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico mientras la disolución se sometía a reflujo para formar el anillo pirazol. MS (m/z, ES+): 295,0 ($\text{Cl}^{35}\text{M}+1$, 100%), 297,0 ($\text{Cl}^{37}\text{M}+1$, 50%).
- Ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico (574-26E1): El compuesto del título (1,58 g) se preparó en cinco etapas, comenzando por 16,5 g (100 mmol) de éster etílico de ácido 4-aminobenzoico. Durante la etapa final, se añadieron 4 gotas de HCl conc. mientras la disolución se sometía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 275 (M+1, 100%).
- 45 4-(6-Bromo-5-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina (574-28E): El compuesto del título (765 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando con 5,0 g (26,3 mmol) de 4-bromo-3-fluoroanilina. Durante la etapa final, se añadió una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico mientras la disolución se sometía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 327,0 ($\text{Br}^{79}\text{M}+1$, 100%), 329,0 ($\text{Br}^{81}\text{M}+1$, 100%).
- 50 (2,6-Dimetil-pirimidin-4-il)-amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (474-92B): El compuesto del título (93 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por sulfisomidina con la excepción de que en la etapa 2, se reemplazó KOH con sulfuro de sodio (5,0 g). MS (m/z, ES+): 416,0 (M+1, 100%).
- Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (503-55B): El compuesto del título (168 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando con 2,0 g (11 mmol) de 4-amino-N-metilbencenosulfonamida. MS

(m/z, ES+): 324,0 (M+1, 100%). ^1H NMR (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 11,80-12,15 (br, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,99-5,87 (br m, 2H), 7,79 (d, 1H), 7,74 (dd, 1H), 6,72 (br s, 2H), 2,43 (s, 3H), 2,42 (s, 3H).

Metilamida de ácido 2(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-sulfónico (574-37E): El compuesto del título (3 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando con 1,9 g (10 mmol) de 4-amino-2-fluoro-N-metilbencenosulfonamida. MS (m/z, ES+): 342,2 (M+1, 100%).

4-(5-Fluoro-6-metilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (610-89): El compuesto del título (24 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por 3-fluoro-4-metilanilina. MS (m/z, ES+): 263,04 (M+1, 100%).

5-Metil-4-(4,5,6-trifluorobenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina (598-75): El compuesto del título (520 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando con 3,0 g (20 mmol) de 2,3,4-trifluoroanilina. Durante la etapa final, se añadieron 4 gotas de HCl conc. mientras la disolución se mantenía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 285,0 (M+1, 100%).

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-7-carboxílico (598-85): El compuesto del título (33 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 1,1 g (5,6 mmol) de ácido 2-aminobenzotiazol-7-carboxílico. Se usó el exceso de ortoacetato de trimetilo (8,0 mmol) para convertir el grupo ácido al éster metílico. Durante la etapa final, se añadió una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico mientras la disolución se mantenía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 289,2 (M+1, 100%).

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-carboxílico (574-45F): El compuesto del título (50 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por 860 mg (5,5 mmol) de ácido 4-amino-2-fluorobenzoico. Se usó exceso de ortoacetato de trimetilo para convertir el grupo ácido en éster metílico durante la etapa 4. Durante la etapa final, se añadieron 4 gotas de HCl conc. mientras la disolución se mantenía a reflujo para formar el anillo de pirazol. MS (m/z, ES+): 307,0 (M+1, 100%).

4-(5-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (29 mg) se preparó en tres etapas, comenzando con 1,1 g (5,0 mmol) de hidrocloreto de 2-amino-4-trifluorometilbencenotiol. Se substituyó el ortoacetato de trimetilo con ortocarbonato de trietilo (1,2 equiv.). MS (m/z, ES+): 285 (M+1, 100%).

4-(6-Fluorobenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina (474-67B): El compuesto del título (37 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando por 2-amino-6-fluorobenzotiazol. Se substituyó ortoacetato de trimetilo con ortocarbonato de trietilo (1,2 equiv.). MS (m/z, ES+): 235,0 (M+1, 100%).

Amida de ácido 2-(3-amino-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-sulfónico (574-42B): El compuesto del título (58 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por 4-amino-2-fluoro-N-metilbencenosulfonamida. Se substituyó ortoacetato de trimetilo con ortocarbonato de trietilo (1,2 equiv.). MS (m/z, ES+): 314,0 (M+1, 100%); ^1H NMR (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12,16 (br s, 1H), 8,46 (d, 7,1 Hz, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,8-8,0 (m, 1H), 7,63 (s, 2H), 6,7-5,5 (2H).

4-(5-Fluoro-6-metilbenzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina (610-93): El compuesto del título (54 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por 3-fluoro-4-metilanilina. Se substituyó ortoacetato de trimetilo con ortocarbonato de trietilo (1,2 equiv.). MS (m/z, ES+): 249,05 (M+1, 100%).

Metilamida de ácido 2-(5-amino-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (599-77B2): El compuesto del título (107 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando por 4-amino-N-metilbencenosulfonamida. Se substituyó ortoacetato de trimetilo con N,N-Dimetilformamida acetal (1,2 equiv.). MS (m/z, ES+): 310,0 (M+1, 100%); ^1H NMR (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12,1 (br s, 1H), 8,43 (d, 1H), 8,0 (br s, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,78 (dd, 1H), 7,38 (q, 1H), 6,5 (br s, 1H), 5,9 (br s, 1H), 2,44 (d, 3H).

4-Benzotiazol-2-il-5-etil-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (75 mg) se preparó en dos etapas, comenzando por 174 mg (1,0 mmol) de benzotiazol-2-ilacetoniitrilo y 211 mg (1,2 mmol) de ortopropionato de trietilo. MS (m/z, ES+): 245 (M+1, 100%).

Ejemplo 4

SÍNTESIS DE METILAMIDA DE ÁCIDO 2-(5-AMINO-3-METIL-1H-PIRAZOL-4-IL)-BENZOTIAZOL-5-SULFÓNICO (574-12E)

1. A una disolución de cloruro de 4-cloro-3-nitrobencenosulfonilo (2,0 g, 7,8 mmol) en THF (10 ml) se le añadió exceso de metilamina (disolución 2M en THF). La disolución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió luego agua, y el producto se extrajo en cloroformo. Los extractos combinados se lavaron, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y evaporaron para proporcionar 2,3 g de la 4-cloro-N-metil-3-nitrobencenosulfonamida bruta en forma de un aceite. El material bruto se utilizó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional.

2. Se preparó una disolución etanólica de disulfuro de sodio disolviendo nonhidrato de sulfuro de sodio (2,0 g, 8,5 mmol) en etanol caliente (9 ml) y luego añadiendo azufre (0,27 g, 8,5 mmol). Esto se enfrió hasta temperatura

ambiente y se añadió gota a gota a una disolución de la 4-cloro-N-metil-3-nitrobenzenosulfonamida bruta anteriormente preparada (2,3 g) en etanol (15 ml). Después de completar la adición, el precipitado resultante se aisló por filtración y se lavó con etanol para proveer 1,5 g (79% para las dos etapas) de 4,4'-ditiobis(N-metil-3-nitrobenzenosulfonamida) en forma de un polvo amarillo. MS (m/z, ES⁻): 492,9 (M-1, 100%).

3. A una disolución de 4,4'-ditiobis(N-metil-3-nitrobenzenosulfonamida) (1,5 g, 3,1 mmol) en etanol (70 ml) se le añadió una disolución de dihidrato de cloruro de estaño (5,5 g) en ácido clorhídrico (10 ml de una disolución 2N). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante una noche y luego se añadió malononitrilo (660 mg, 10 mmol). La mezcla resultante se sometió a reflujo por 5 horas más, y luego se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua. El sólido se aisló por filtración y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 120 mg (8%) de metilamida de ácido 2-cianometilbenzotiazol-5-sulfónico.

4. Una mezcla de metilamida de ácido 2-cianometilbenzotiazol-5-sulfónico (120 mg, 0,45 mmol) y ortoacetato de metilo (270 mg, 2,2 mmol) en anhídrido acético (2 ml) se calentó a 100 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado resultante se aisló por filtración para proveer 120 mg (83%) de metilamida de ácido 2-(1-ciano-2-metoxipropenil)benzotiazol-5-sulfónico. El producto se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional. MS (m/z, ES⁺): 324 (M+1, 100%).

5. A una suspensión de metilamida de ácido 2-(1-ciano-2-metoxipropenil)benzotiazol-5-sulfónico (120 mg, 0,37 mmol) en 4 ml de metanol, se le añadió hidrato de hidrazina (20 µL). La mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas y luego se añadió 1 gota de ácido clorhídrico conc. a la mezcla de reacción. La mezcla se mantuvo a reflujo durante otros 5 min y luego se dejó enfriar. El volumen de disolvente se redujo a presión reducida y se formó un sólido. El sólido se aisló por filtración y se lavó con metanol y luego agua, y se secó para dar 51 mg (43%) del compuesto del título en forma de un polvo de color crema. MS (m/z, ES⁺): 324,0 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

Éster etílico de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-5-carboxílico (574-19): El compuesto del título (0,50 g) se preparó en cuatro etapas, comenzando con 5,0 g (22 mmol) de éster etílico de ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico. MS (m/z, ES⁺): 303 (M+1, 100%).

Ejemplo 5

SÍNTESIS DE 4-(5-FLUOROBENZOTIAZOL-2-IL)-5-METIL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

1. A una disolución de 4-fluoro-2-nitroanilina (1,6 g, 10 mmol) en ácido sulfúrico conc. (3 ml) y agua (3 ml), a 5 °C, se le añadió una disolución de nitrato de sodio (760 mg, 11 mmol) en 3 ml de agua. Después de agitar durante 40 minutos, se añadió una disolución de tiocianato de potasio (1,0 g, 10 mmol) en 2 ml de agua. La disolución luego se vertió en una suspensión en agitación vigorosa de tiocianato cuproso (1,8 g, 15 mmol) en 6 ml de agua a 5 °C. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas y se dejó reposar en el refrigerador durante una noche. El sólido resultante se aisló por filtración y se lavó con diclorometano caliente. Los extractos de diclorometano se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron para proporcionar 1,90 g (96%) de un sólido amarillo que se usó en la reacción subsiguiente sin purificación adicional. IR (disco KBr): 2158 (m) cm⁻¹.

2. A una suspensión del producto bruto anteriormente preparado (1,90 g) en etanol (10 ml) se le añadió una disolución de sulfuro de sodio en agua (30 ml). La mezcla de color rojo profundo resultante se calentó hasta reflujo durante 1 hora. La mezcla se enfrió, se acidificó hasta aproximadamente pH 5 y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron para proveer 2,1 g de 4-fluoro-2-nitrobenzenotiol bruto, que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional. MS (m/z, ES⁺): 174,0 (M+1, 100%).

3. A una disolución de 2,1 g del 4-fluoro-2-nitrobenzenotiol bruto anteriormente preparado en etanol se le añadió dihidrato de SnCl₂ (6,7 g, aprox. 3 equiv.). La mezcla se calentó hasta reflujo durante una noche. A esta mezcla se le añadió molanonitrilo (400 mg). Después de mantener a reflujo durante otras 5 horas, la mezcla de reacción se enfrió y filtró. El volumen de disolvente se redujo por evaporación, y se añadió agua para inducir la formación de un precipitado. El producto bruto (940 mg) se aisló por filtración y luego se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con hexanos:EtOAc = 1:1 para proveer 360 mg (19% para 3 etapas) de 5-fluorobenzotiazol-2-il)acetoniitrilo en forma de un sólido verdoso pálido. MS (m/z, ES⁺): 193 (M+1, 100%).

4. Una mezcla de 5-fluorobenzotiazol-2-il)acetoniitrilo (360 mg, 1,9 mmol) y ortoacetato de trimetilo (270 mg, 2,3 mmol) en anhídrido acético (2 ml) se calentó a 100 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se enfrió, y el precipitado resultante se aisló por filtración, se lavó con éter y se secó para proveer 330 mg (71%) de 2-(5-fluorobenzotiazol-2-il)-3-metoxibut-2-enonitrilo en forma de un sólido rojo. MS (m/z, ES⁺): 249 (M+1, 100%).

5. Una suspensión de 2-(5-fluorobenzotiazol-2-il)-3-metoxibut-2-enonitrilo (330 mg, 1,3 mmol) e hidrato de hidrazina (70 µL) en metanol (40 ml) se calentó a reflujo durante una noche. La disolución se enfrió luego a temperatura ambiente, y el sólido resultante se aisló por filtración. El material bruto se recrystalizó a partir de etanol para dar 260 mg (78%, 10% para cinco etapas) del compuesto del título. MS (m/z, ES⁺): 249,0 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

4-(5-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (574-7E): El compuesto del título (16 mg) se preparó en cinco etapas, comenzando con 1,6 g (7,6 mmol) de 4-metoxi-2-nitroanilina. MS (m/z, ES+): 261,0 (M+1, 100%).

Ejemplo 6

5 SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-METILSULFANIL-1H-PIRAZOL-3-ILAMINA

A una suspensión de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo (50 mg, 0,18 mmol) en etanol (2 ml) se le añadió hidrato de hidrazina (15 µL). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego y se añadió agua. El precipitado resultante se aisló por filtración para dar 21 mg (44%) del compuesto del título en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES+): 263 (M+1, 100%).

10 Ejemplo comparativo 7

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA

A una suspensión de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo (140 mg, 0,5 mmol) en etanol (5 ml) se le añadió una disolución de amoníaco (6 ml de una disolución 2 N en etanol, 12 mmol). La reacción se calentó a 70 °C durante 5 horas en un recipiente de reacción sellado. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió hidrato de hidrazina (60 µL, 1,7 mmol) y la reacción se calentó a reflujo durante 2 días. El disolvente se evaporó luego y el material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con CHCl₃:MeOH = 9:1 para proveer 0,027 g (23%) del compuesto del título en forma de un polvo rosa pálido. MS (m/z, ES+): 232 (M+1, 100%). ¹H NMR (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,85 (br s, 1H), 7,98 (d, 3J = 7,8 Hz, 1H), 7,78 (d, 3J = 8,0 Hz, 1H), 7,39 (dd, 3J = 7,8 Hz, 3J = 8,0 Hz, 1H), 7,23 (dd, 3J = 7,8 Hz, 3J = 8,0 Hz, 1H), 5,55 (br s, 4H).

20 Ejemplo comparativo 8

SÍNTESIS DE 4-BENZOXAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA

El compuesto del título (0,020 g) se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, comenzando con 1,90 g (7,3 mmol) de 2-benzoxazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo con las siguientes modificaciones: se emplearon 300 ml de una disolución saturada de amonio en etanol, y la reacción se mantuvo a reflujo durante 1 hora antes de la evaporación del disolvente y la purificación del material bruto resultante. Este intermedio se trató luego con hidrato de hidrazina para dar el producto. MS (m/z, ES+): 216,72 (M+1, 100%). Rendimiento = 1%.

Ejemplo comparativo 9

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-N⁵-BENCIL-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA

Una disolución de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo (200 mg, 0,73 mmol) y bencilamina (160 mg, 1,5 mmol) en 50 ml de etanol se calentó a reflujo durante 90 minutos. Se añadió luego hidrato de hidrazina (35 µL, 1,0 mmol) a la mezcla de reacción. La disolución se calentó a reflujo hasta que se completó la reacción según lo determinado por análisis TLC. La disolución de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, y se aisló el compuesto del título (124 mg) por filtración, se lavó con etanol y se secó en alto vacío. MS (m/z, ES+): 322 (M+1, 100%); ¹H NMR (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ µ 11,32 (brs, 1/3H), 10,89 (s, br, 2/3H), 7,98 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H), 7,82 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H), 7,41-7,28 (m, 6H), 7,22 (m, 1H), 6,15 (brs, 9/10H), 4,95 (br s, 1/10H), 4,48 (d, ³J = 4,7 Hz, 1H). Rendimiento = 53%.

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

4-Benzotiazol-2-il-5-pirrolidin-1-il-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (53 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 140 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 53 mg (0,75 mmol) de pirrolidina. MS (m/z, ES+): 286 (M+1, 100%). Rendimiento = 37%.

Se preparó 4-benzotiazol-2-il-N⁵-etil-1H-pirazol-3,5-diamina (48 mg) en dos etapas, comenzando con 139 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 0,059 ml de una disolución al 70% p/p (0,75 mmol) de etilamina en agua. MS (m/z, ES+): 260 (M+1, 100%). Rendimiento = 37%.

4-Benzotiazol-2-il-5-morfolin-4-il-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (46 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 139 mg (0,50 mmol) de

4-Benzotiazol-2-il-5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-pirazol-3-ilamina: El compuesto del título (7 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 139 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo y 75 mg (0,75 mmol) de 1-metilpiperazina. MS (m/z, ES+): 315 (M+1, 100%). Rendimiento = 4%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-(3,5-diclorofenil)-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (30 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo y 117 mg (0,72

mmol) de 3,5-diclorofenilamina. MS (m/z, ES+): 376 ($\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{M}+1$, 100%), 378 ($\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{35}\text{M}+1$, 70%). Rendimiento = 22%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-(3-trifluorometanosulfonil-fenil)-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (9 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo, 81 mg (0,72 mmol) de 3-trifluorometano-sulfonilfenilamina y 0,04 ml de trietilamina. MS (m/z, ES+): 440 (M+1, 100%). Rendimiento = 6%.

4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-N-tiazol-2-il-bencenosulfonamida: El compuesto del título (20 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 93 mg (0,36 mmol) de 4-amino-N-tiazol-2-il-bencenosulfonamida. MS (m/z, ES+): 470 (M+1, 100%). Rendimiento = 12%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-quinolin-6-il-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (91 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 103 mg (0,72 mmol) de 6-aminoquinolina. MS (m/z, ES+): 359 (M+1, 100%). Rendimiento = 70%.

4-Benzotiazol-2-il-N³-quinolin-5-il-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (33 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 103 mg (0,72 mmol) de 5-aminoquinolina. MS (m/z, ES+): 359 (M+1, 100%). Rendimiento = 25%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-3-il-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (69 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 68 mg (0,72 mmol) de 3-aminopiridina. MS (m/z, ES+): 309 (M+1, 100%). Rendimiento = 62%.

Trans-2-(6-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)ciclopentanol: El compuesto del título (69 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 139 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 75 mg (0,75 mmol) de trans-2-amino-ciclopentanol. MS (m/z, ES+): 316 (M+1, 100%). Rendimiento = 44%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-4-il-metil-1H-pirazol-3,5-diamina: El compuesto del título (32 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 83 mg (0,30 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 64 mg (0,60 mmol) de 4-(aminometil)piridina. MS (m/z, ES+): 323 (M+1, 100%). Rendimiento = 33%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-3-il-metil-1H-pirazol-3,5-diamina (474-42B): El compuesto del título (33 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 83 mg (0,30 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 64 mg (0,60 mmol) de 3-(aminometil)piridina. MS (m/z, ES+): 323,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 34%.

4-Benzotiazol-2-il-N⁵-(2-morfolin-4-ilet)-1H-pirazol-3,5-diamina (474-42C): El compuesto del título (40 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 83 mg (0,30 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 78 mg (0,60 mmol) de 2-morfolin-4-ilet. MS (m/z, ES+): 345,2 (M+1, 100%). Rendimiento = 43%.

4-Benzotiazol-2-il-N³-(3-imidazol-1-ilpropil)-1H-pirazol-3,5-diamina (590-13-2): El compuesto del título (69 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 280 mg (1,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 260 mg (2,1 mmol) de histamina. MS (m/z, ES+): 340,1 (M+1, 65%), 272 (M-67, 100%). Rendimiento = 43%.

4-Benzotiazol-2-il-N³-(3-dimetilaminopropil)-1H-pirazol-3,5-diamina (590-14): El compuesto del título (130 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 140 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 82 mg (0,80 mmol) de N,N-dimetilaminopropilamina. MS (m/z, ES+): 317,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 80%.

4-Benzotiazol-2-il-N³-(2-pirrolidin-1-ilet)-1H-pirazol-3,5-diamina (590-18): El compuesto del título (126 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 140 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 62 mg (0,55 mmol) de 1-(2-aminoetil)pirrolidina. MS (m/z, ES+): 329,1 (M+1, 100%), 258,1 (M-C₄H₈N, 40%). Rendimiento = 88%.

4-Benzotiazol-2-il-N³-(2-metoxietil)-1H-pirazol-3,5-diamina (590-27): El compuesto del título (10 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 30 mg (0,40 mmol) de 2-metoxietilamina. MS (m/z, ES+): 290,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 10%.

3-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)propan-1-ol (590-28): El compuesto del título (83 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y 30 mg (0,40 mmol) de 3-propanolamina. MS (m/z, ES+): 290,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 80%.

4-[(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-metil]bencenosulfonamida (590-29): El compuesto del título (35 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,37 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo, 93 mg (0,42 mmol) de hidrato de hidrócloruro de 4-(aminometil)bencenosulfonamida y 100 mg (1,0 mmol) de trietilamina. MS (m/z, ES+): 401,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 24%.

N-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etil]acetamida (590-33): El compuesto del título (93 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 140 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis(metilsulfanil)acrilonitrilo y

- 93 mg (0,55 mmol) de N-acetiletilenodiamina. MS (m/z, ES⁺): 317,1 (M+1, 99%), 299,1 (M-17, 100%). Rendimiento = 59%.
- 5 4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)butan-1-ol (590-44): El compuesto del título (54 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 40 mg (0,45 mmol) de 4-amino-1-butanol. MS (m/z, ES⁺): 304,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 50%.
- 4-Benzotiazol-2-il-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina (590-58): El compuesto del título (50 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 75 mg (0,30 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 28 mg (0,36 mmol) de piperazina. MS (m/z, ES⁺): 301,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 55%.
- 10 4-Benzotiazol-2-il-N³-piperidin-4-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina (610-38E): El compuesto del título (14 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 47 mg (0,41 mmol) de 4-aminometilpiperidina. MS (m/z, ES⁺): 329,2 (M+1, 25%); 244,1 (M-84, 45%), 232,1 (M-96, 100%). Rendimiento = 12%.
- 15 Ácido 4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)butírico (523-29-B): El compuesto del título (50 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 530 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo, 250 mg (2,3 mmol) de ácido 4-aminobutírico y 0,6 ml de trietilamina. MS (m/z, ES⁺): 318,1 (M+1, 100%), 300,1 (M-H₂O, 95%); ¹H NMR (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): 8,11,5 (br s, 2H), 7,8 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,4 (d, 1H), 7,2 (d, 1H), 6,0 (brs, 1H), 5,5 (br s, 2H), 3,2 (m, 2H), 2,3 (t, 2H), 1,8 (m, 2H). Rendimiento = 8%.
- 20 4-Benzotiazol-2-il-N³-[2-(1H-imidazol-4-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina (523-31C): El compuesto del título (310 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 530 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo, 500 mg (4,5 mmol) de histamina y 0,6 ml de trietilamina. MS (m/z, ES⁺): 326,09 (M+1, 100%). Rendimiento = 48%.
- 2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etanol (523-34A): El compuesto del título (140 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 530 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo, 500 mg (8,0 mmol) de monoetanolamina y 0,5 ml de trietilamina. MS (m/z, ES⁺): 276,02 (100%, M+1). Rendimiento = 25%.
- 25 4-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etil]-fenol (523-36): El compuesto del título (210 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 530 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo, 0,60 g (4,4 mmol) de 4-(2-aminoetil)-fenol y 0,6 ml de trietilamina. MS (m/z, ES⁺): 352,05 (M+1, 100%). Rendimiento = 30%.
- 30 4-Benzotiazol-2-il-N³-(3-metilbutil)-1H-pirazol-3,5-diamina (523-27A): El compuesto del título (150 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 530 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo, 220 mg (3,0 mmol) de N,N-dimetilaminoetilendiamina y 0,6 ml de trietilamina. MS (m/z, ES⁺): 303,2 (M+1, 100%). Rendimiento = 25%.
- 4-Benzotiazol-2-il-N³-[2-(1H-indol-3-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina (590-37): El compuesto del título (45 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,36 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 62 mg (0,39 mmol) de triptamina. MS (m/z, ES⁺): 375,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 49%.
- 35 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-N³-[2-(3H-imidazol-4-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina (597-33A): El compuesto del título (35 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 80 mg (0,25 mmol) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 30 mg (0,27 mmol) de histamina. MS (m/z, ES⁺): 374,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 35%.
- 40 N-{2-[5-Amino-4-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-1H-pirazol-3-ilamino]-etil}acetamida (597-35): El compuesto del título (200 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 350 mg (1,1 mmol) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 140 µL, (1,3 mmol) de N-acetiletilenodiamina. MS (m/z, ES⁺): 365,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 51%.
- 45 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol)-5-piperizin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina (597-36): El compuesto del título (20 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 120 mg (0,37 mmol) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 40 mg (0,46 mmol) de piperizina. MS (m/z, ES⁺): 349,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 16%.
- N³-(2-Dimetilaminoetil)-4-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-1H-pirazol-3,5-diamina (597-40A): El compuesto del título (35 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,31 mmol) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 40 µL (0,36 mmol) de N,N-dimetiletilenodiamina. MS (m/z, ES⁺): 351,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 33%.
- 50 N³-(3-Dimetilaminopropil)-4-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-1H-pirazol-3,5-diamina (597-40B): El compuesto del título (40 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,31 mmol) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 46 µL (0,37 mmol) de 3-(dimetilamino)propilamina. MS (m/z, ES⁺): 365,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 35%.

3-[5-Amino-4-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamino]-propanol (597-45): El compuesto del título (72 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,31 mmol) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 30 µL (0,39 mmol) de 3-aminopropanol. MS (m/z, ES+): 338,3 (M+1, 100%). Rendimiento = 70%.

- 5 N³-[2-(3H-imidazol-4-il)-etil]-4-(6-metoxibenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina (597-42): El compuesto del título (72 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,32 mmol) de 2-(6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 36 mg (0,32 mmol) de histamina. MS (m/z, ES+): 356,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 28%.

- 10 4-(6-Metoxibenzotiazol)-5-piperizin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina (597-43): El compuesto del título (39 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 100 mg (0,32 mmol) de 2-(6-metoxibenzotiazol)-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 28 mg (0,33 mmol) de piperizina. MS (m/z, ES+): 331,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 36%.

Ejemplo comparativo 10

SÍNTESIS DE N³-(4-AMINO-FENIL)-4-BENZOTIAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA (590-24)

- 15 1. Una mezcla de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanil-acrilonitrilo (140 mg, 0,50 mmol) y 4'-acetilaminoanilina (90 mg, 0,60 mmol) en etanol (5 ml) se sometió a reflujo durante 3 horas. Se formó un sólido amarillo tras enfriar la mezcla de reacción. El precipitado resultante se aisló por filtración y se lavó con etanol para proporcionar 150 mg (78%) de N-[4-(2-benzotiazol-2-il-2-ciano-1-metilsulfanilvinilamino)fenil]acetamida. MS (m/z, ES+): 381,1 (M+1, 100%).

- 20 2. El producto de la reacción anterior (150 mg, 0,39 mmol) e hidrato de hidrazina (50 mg, 1,0 mmol) en etanol (5 ml) se calentaron a reflujo durante una noche. Tras la evaporación de aproximadamente la mitad del disolvente se formó un sólido. El sólido se aisló por filtración y se lavó con etanol para proveer 33 mg (23%) de N-[4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)fenil]acetamida. MS (m/z, ES+): 365,1 (M+1, 100%). El licor madre se concentró para proveer 110 mg adicionales del producto bruto en forma de un sólido rojo.

- 25 3. El producto bruto aislado anteriormente (110 mg, 0,3 mmol) se mantuvo a reflujo en una mezcla de etanol (10 ml) y HCl concentrado (5 ml) durante 1 hora. Se formó un sólido amarillo tras enfriar. El sólido se aisló por filtración y se lavó con etanol. La sal de hidrocloreto resultante (51 mg) se disolvió en agua (10 ml) y se ajustó hasta pH neutro por adición de disolución de NaOH diluida. El producto se extrajo en acetato de etilo, los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron para dar 26 mg (27%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES+): 323,1 (M+1, 100%).

- 30 Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 10.

N³-(2-Aminoetil)-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina (590-46): El compuesto del título (43 mg) se preparó en tres etapas, comenzando con 140 mg (0,50 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo y 65 mg (0,55 mmol) de N-acetiletilenodiamina. MS (m/z, ES+): 275,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 54%.

Ejemplo comparativo 11

- 35 4-BENZOTIAZOL-2-IL-N²-(2-ETILAMINOETIL)-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA (590-73)

1. Una mezcla de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanilacrilonitrilo (200 mg, 0,74 mmol) y N-acetiletilenodiamina (83 mg, 0,81 mmol) en etanol (10 ml) se sometió a reflujo durante 90 min. A esta disolución se le añadió hidrato de hidrazina (61 mg, 1,2 mmol), y la mezcla resultante se mantuvo a reflujo durante una noche. Se formaron sólidos tras enfriar. Los cristales resultantes se filtraron y lavaron con etanol para dar 150 mg (66%) de N-[2-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)etil]acetamida. MS (ES+): 317,1 (M+1, 100%).

- 45 2. N-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)etil]acetamida (80 mg, 0,25 mmol) e hidruro de aluminio y litio (92 mg) se sometieron a reflujo en THF anhidro (10 ml) durante 3 horas. La mezcla resultante se vertió en disolución saturada de cloruro de amonio (50 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron para dar 54 mg de producto bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 5:1 con 0,5% NH₃. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 36 mg (48%). MS (m/z, ES+): 303,1 (M+1, 100%).

Ejemplo 12

- 50 SÍNTESIS DE (2-HIDROXIETIL)-AMIDA DE ÁCIDO 2-(5-AMINO-3-METIL-1H-PIRAZOL-4-IL)-BENZOTIAZOL-6-SULFÓNICO (474-86D)

1. El material de partida 4-benzotiazol-2-il-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (500 mg, 2,2 mmol) se añadió lentamente a ácido clorosulfónico puro (2,5 ml) que había sido enfriado en un baño de hielo. La disolución se calentó a 150 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se vertió luego en hielo, y los sólidos resultantes se aislaron por filtración.

Los sólidos se secaron para proveer 770 mg del producto bruto como una mezcla 3:1 de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-6-sulfónico y cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-4-sulfonilo. El producto bruto se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

- 5 2. El producto bruto (130 mg, 0,39 mmol) de la preparación de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-6-sulfonilo se suspendió en cloroformo. Se añadieron luego trietilamina (0,1 ml) y 2-aminoetanol (26 mg, 0,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó, y el producto se purificó usando TLC preparativa, eluyendo con EtOAc:hexanos:MeOH = 6/4/0,3 para dar 22 mg (16%) del producto en forma de un polvo de color crema. MS (m/z, ES+): 354 (M+1, 90p%); ¹H NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 12,25-11,75 (br s, 1H, intercambiable), 8,47 (s, 1H), 7,99 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,59 (br s, 1H, SO₂NH, intercambiable), 7-5,5 (br s, 2H, intercambiable), 4,66 (t, J = 5,6 Hz, 1H, OH, intercambiable), 3,34 (m, J = 6,2 Hz, 2H), 2,80 (br s, 2H), 2,41 (s, 3H).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 12.

- 15 5-Metil-4-[6-(4-metilpiperazina-1-sulfonil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina (474-86F): el compuesto del título (30 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (128 mg, 0,39 mmol), 4-metil piperazina (39 mg, 0,43 mmol) y trietilamina (0,1 ml). MS (m/z, ES+): 393,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 20%.

- 20 (2-Metoxietil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-8): el compuesto del título (33 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (75 mg, 0,23 mmol), 2-metoxietilamina (39 mg, 0,43 mmol) y la base unida a resina de poliestireno N-3-(morfolino) propil poliestireno sulfonamida (PS-NMM) (0,24 g, 0,45 mmol) en 4 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 368,5 (M+1, 100%); ¹H NMR (500 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,8-12,1 (br s, 1H), 8,5 (s, 1H), 7,99 (br d, 1H), 7,83 (d, 1H), 7,73 (t, 1H), 5,9-6,7 (br s, 2H), 3,30 (t, 2H), 3,15 (s, 3H), 2,94 (dt, 2H), 2,41 (br s, 3H). Rendimiento = 46%.

- 25 4-Fluoro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-9): el compuesto del título (8 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (75 mg, 0,23 mmol), 4-fluorobencilamina (29 µL, 0,25 mmol) y PS-NMM (0,22 g, 0,45 mmol) en 4 ml de cloroformo. MS (m/z, ES+): 418,3 (M+1, 100%). Rendimiento = 9%.

- 30 (2-Tiofen-2-iletel)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-10): el compuesto del título (8 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (75 mg, 0,23 mmol), 2-tiofen-2-iletilamina (29 µL, 0,25 mmol) y PS-NMM (0,22 g, 0,45 mmol) en 4 ml de cloroformo. MS (m/z, ES+): 420,4 (M+1, 100); ¹H NMR (500 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,8-12,2 (br s, 1H), 8,5 (s, 1H), 8,0 (d, 1H), 7,8 (m, 2H), 7,32 (d, 1H), 6,93 (dd, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,0 (br s, 2H), 3,03 (q, 2H), 2,92 (t, 2H), 2,43 (br s, 3H). Rendimiento = 8%.

- 35 4-Clorobencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-11B): el compuesto del título (21 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), 4-clorobencilamina (74 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 434,4 (Cl³⁵ M+1, 100%), 436,4 (Cl³⁷ M+1, 40%). Rendimiento = 16%.

- 40 4-Metoxibencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-12B): el compuesto del título (15 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), 4-metoxibencilamina (79 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 430,5 (M+1, 100%). Rendimiento = 11%.

- Bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-13B): el compuesto del título (16 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), bencilamina (66 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 400,5 (M+1, 100%). Rendimiento = 13%.

- 45 Fenetilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-14B): el compuesto del título (9 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), fenetilamina (76 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 414,5 (M+1, 100%). Rendimiento = 7%.

- 50 [2-(4-Aminofenil)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-15B): el compuesto del título (25 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), fenetilamina (80 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 429,5 (M+1, 100%). Rendimiento = 19%.

- 55 (2-Morfolin-4-iletel)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-16): el compuesto del título (56 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), 2-morfolin-4-iletilamina (80 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 423,5 (M+1, 100%). Rendimiento = 43%.

- (2,2,2-Trifluoroetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-17B): el compuesto del título (11 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), 2,2,2-trifluoroetilamina (48 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 392,4 (M+1, 100%). Rendimiento = 9%.
- 5 Ciclopropilmetilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-18B): el compuesto del título (27 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), C-ciclopropilmetilamina (53 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 364,5 (M+1, 100%). Rendimiento = 21%.
- 10 [2-(3H-Imidazol-4-il)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-19B): el compuesto del título (8 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), 2-(3H-imidazol-4-il)-etilamina (68 mg, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 404,3 (M+1, 100%). Rendimiento = 6%.
- 15 4-Aminobencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-20): el compuesto del título (15 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), 4-aminometilfenilamina (69 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 415,4 (M+1, 100%). Rendimiento = 12%.
- 20 (Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-21): el compuesto del título (13 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), C-piridin-4-ilmetilamina (62 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 401,3 (M+1, 100%). Rendimiento = 11%.
- (3-Dimetilamino-propil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-22C): el compuesto del título (2 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), N¹,N¹-dimetilpropano-1,3-diamina (77 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 395,3 (M+1, 100%). Rendimiento = 2%.
- 25 Amida (hidrazido acética) de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-23A): el compuesto del título (13 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), hidrazida de ácido acético (45 mg, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 367,3 (M+1, 100%). Rendimiento = 12%.
- 30 (2-Dimetilamino-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-24D): el compuesto del título (11 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), N¹,N¹-dimetiletano-1,2-diamina (67 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 381,4 (M+1, 50%). Rendimiento = 9%.
- 35 N-{2-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilamino]-etil}-acetamida (551-25B): el compuesto del título (52 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), N-(2-aminoetil)-acetamida (58 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 395,6 (M+1, 100%). Rendimiento = 43%.
- 40 (Fenilhidrazino) amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (551-26B): el compuesto del título (32 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo bruto (100 mg, 0,30 mmol), fenilhidrazina (66 µL, 0,60 mmol) y PS-NMM (0,320 g, 0,60 mmol) en 5 ml de metanol. MS (m/z, ES+): 401,4 (M+1, 100%). Rendimiento = 26%.
- 45 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico (574-14): El compuesto del título (30 mg) se preparó en dos etapas, a partir de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-sulfónico bruto, que había derivado de la clorosulfonación de 90 mg de 4-(5-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamino, y una disolución de exceso de amoníaco disuelto en etanol. MS (m/z, ES+): 328,0 (M+1,100%). Rendimiento= 25%.
- 50 (2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-sulfónico (574-22A) y (2-hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-4-sulfónico (574-22AA): Los compuestos del título se prepararon en dos etapas, a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-sulfonilo bruto, que había derivado de la clorosulfonación de 50 mg de 4-(5-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina, 183 mg (0,30 mmol) de etanolamina y trietilamina (0,50 ml) en cloroformo. El material bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CHCl₃:MeOH = 9:1 para dar 12 mg (21%) de (2-hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-sulfónico. MS (m/z, ES+): 372,0 (M+1,100%). Se aisló (2-hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-4-sulfónico con un rendimiento de 1 mg (2%). MS (m/z, ES+): 372,0 (M+1,100%).
- 55 (Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico (574-22B): El compuesto del título (15 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-

6-sulfonilo bruto, que había derivado de la clorosulfonación de 90 mg de 4-(5-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina, 32 mg (0,30 mmol) de C-piridin-4-ilmetilamina y trietilamina (0,50 ml) en cloroformo. MS (m/z, ES+): 419,1 (M+1, 100%), 210,0 (100%). Rendimiento = 24%.

- 5 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-4-fluorobenzotiazol-6-sulfónico (598-49): El compuesto del título (280 mg) se preparó a partir de cloruro de 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-4-fluorobenzotiazol-7-sulfonilo bruto, que había derivado de la clorosulfonación de 320 mg de 4-(4-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y una disolución de exceso de amoníaco disuelta en etanol. MS (m/z, ES+): 328,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 72%.

Ejemplo 13

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-FENIL-1H-PIRAZOL-3-ILAMINA

- 10 A una disolución de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo (278 mg, 1 mmol) en THF anhidro (40 ml) se le añadió bromuro de fenilmagnesio (1 mmol) que se preparó a partir de bromobenceno (152 mg, 1 mmol) y magnesio (25 mg, 1 mmol) en 10 ml de THF anhidro. La mezcla se agitó temperatura ambiente durante 60 minutos y luego a 50 °C durante 60 minutos. La mezcla resultante se vertió en una disolución saturada de cloruro de amonio. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó, se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó.
- 15 El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con hexanos:EtOAc = 1:0 - 4:1 para proveer 50 mg (16%) del compuesto deseado. MS (m/z, ES+): 309 (M+1, 100%).

- La mezcla del intermedio preparado anteriormente (50 mg, 0,16 mmol) e hidrato de hidrazina (20 mg, 0,4 mmol) se sometió a reflujo en etanol durante 6 horas. El disolvente se evaporó, y el residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 1:0 - 9:1 para dar un sólido amarillo. El sólido se agitó en éter dietílico y se eliminó un material insoluble por filtración. La fase etérea se concentró para dar 25 mg (53%) del compuesto del título en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES+): 293 (M+1, 100%).
- 20

Ejemplo 14

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-CICLOPROPIL-1H-PIRAZOL-3-ILAMINA

- 25 Se preparó 4-benzotiazol-2-il-5-ciclopropil-1H-pirazol-3-ilamina (23 mg) usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 13, comenzando con 556 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo. Se añadieron bromuro de ciclopropilmagnesio, que se preparó a partir de bromuro de ciclopropilo (484 mg, 4 mmol) y magnesio (100 mg, 4 mmol) en 8 ml de THF anhidro hasta que el material de partida se había consumido según lo determinado por TLC. El compuesto del título se aisló con un rendimiento de 5%. MS (m/z, ES+): 257 (M+1, 100%).

Ejemplo comparativo 15

- 30 SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-PIRIDIN-3-IL-1H-PIRAZOL-3-ILAMINA

1. Se preparó una suspensión amarilla de 3-piridinil litio en THF de acuerdo con la bibliografía (Cama, L. D.; Wildonger, K. J.; Guthikonda, R.; Ratcliffe, R. W.; Christensen, B. G. Tetrahedron (1983), 39, 2531) añadiendo n-BuLi (0,25 ml de una disolución 2 M en ciclohexano, 0,5 mmol) a una disolución de 3-bromopiridina (87 mg, 0,5 mmol) en éter anhidro (3 ml) a -78 °C. A esta suspensión se le añadió rápidamente 2-benzotiazol-2-il-3,3-bismetilsulfanilacrilonitrilo (140 mg, 0,5 mmol) en THF anhidro (5 ml) bajo argón. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 1 hora, y luego se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó a esa temperatura durante 2 horas. Tras completar la reacción, la mezcla se vertió en una disolución saturada acuosa de NH₄Cl. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó. El material bruto se purificó luego por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 1:0-19:1 para dar 100 mg (65%) del producto deseado en forma de un aceite pardo. MS (m/z, ES+): 310 (M+1, 25%), 263 (M-46, 100%).
- 35
- 40

2. La mezcla del intermedio anteriormente preparado (100 mg, 0,32 mmol) e hidrato de hidrazina (25 mg, 0,5 mmol) se calentó a 70 °C en EtOH (10 ml) durante 4 horas. La mezcla se vertió en una disolución saturada acuosa de NH₄Cl. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. El aceite pardo resultante se purificó por TLC preparativa dos veces, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 1:10 para proporcionar 21 mg (22%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES+): 294 (M+1, 100%).
- 45

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 15.

- 4-Benzotiazol-2-il-5-piridin-4-il-2H-pirazol-3-ilamina (549-68B): El compuesto del título (90 mg) se preparó en dos etapas, comenzando por 560 mg (2,0 mmol) de 2-benzotiazol-2-il-3,3-bis-metilsulfanil-acrilonitrilo y 390 mg (2,0 mmol) hidroccloruro de 4-bromopiridina. MS (m/z, ES+): 294,08 (M+1, 100%). Rendimiento = 15%.
- 50

Ejemplo 16

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-(4-NITROFENIL)-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

1. A una disolución de benzotiazol-2-acetonitrilo (1,74 g, 10 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml) se le añadieron trietilamina (1,95 g, 11 mmol) y cloruro de 4-nitrobenzoilo (1,88g, 10 mmol) en diclorometano anhidro (20 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A la suspensión resultante se le añadieron metanol (0,5 ml) y ácido acético glacial (0,5 ml). El sólido amarillo resultante se aisló por filtración y se secó para dar 1,93 g (60%) de 2-benzotiazol-2-il-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)-acrilonitrilo. MS (m/z, ES+): 324,0 (M+1, 100%).

2. El 2-benzotiazol-2-il-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)-acrilonitrilo (500 mg, 1,55 mmol) anteriormente preparado se suspendió en POCl₃ (12 ml). La suspensión se calentó a 100 °C durante 4 horas y luego se vertió en agua con hielo (25 ml). El pH de la fase acuosa se ajustó hasta neutro. Los sólidos se aislaron por filtración y se secaron para dar 505 mg (95%) de 2-benzotiazol-2-il-3-cloro-3-(4-nitrofenil)-acrilonitrilo. MS (m/z, ES+): 341,92 (Cl³⁵M+1, 100%), 343,92 (Cl³⁷M+1, 45%).

3. El 2-benzotiazol-2-il-3-cloro-3-(4-nitrofenil)-acrilonitrilo (500 mg, 1,46 mmol) anteriormente preparado e hidrato de hidrazina (150 mg, 3 mmol) se mantuvieron a reflujo en etanol (15 ml) durante 6 horas. El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 para dar 182 mg (37%) del compuesto del título en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES+): 338,04 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 16.

4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-piridin-4-il-2H-pirazol-3-ilamina (597-34): El compuesto del título (260 mg) se preparó en tres etapas, comenzando con 700 mg (3,15 mmol) de (5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-acetonitrilo, 1,10 g (6,20 mmol) de hidrocloreto de isonicotinilcloruro, 1,7 ml (12,2 mmol) de trietilamina y una cantidad catalítica de DMAP. MS (m/z, ES+): 342,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 20%.

Amida de ácido 2-(5-amino-3-piridin-4-il-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico (590-62): El compuesto del título (5 mg) se preparó en tres etapas, comenzando con 102 mg (0,40 mmol) de amida de ácido 2-cianometilbenzotiazol-6-sulfónico, 70 mg (0,40 mmol) de hidrocloreto de isonicotinilcloruro y 228 ml (1,6 mmol) de trietilamina. MS (m/z, ES+): 373,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 3%.

Ejemplo 17

SÍNTESIS DE 5-(4-AMINOFENIL)-4-BENZOTIAZOL-2-IL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA (549-82)

Se añadió una disolución acuosa de Ni Raney (1 ml) a una suspensión de 4-benzotiazol-2-il-5-(4-nitrofenil)-2H-pirazol-3-ilamina (115 mg, 0,34 mmol) en etanol (20 ml). A la disolución vigorosamente agitada se le añadió gota a gota hidrato de hidrazina en 3 porciones (3 x 50 mg, 3 mmol en total), y la mezcla resultante se agitó luego durante 2 horas. Los sólidos se eliminaron por filtración, y el licor madre se evaporó para dar el material bruto. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 para dar 26 mg (25%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES+): 308,1 (M+1, 100%).

Ejemplo comparativo 18

SÍNTESIS DE N-[4-(5-AMINO-4-BENZOTIAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3-IL)-FENIL]-HIDROXILAMINA (590-6)

A una disolución de 4-benzotiazol-2-il-5-(4-nitrofenil)-2H-pirazol-3-ilamina (218 mg, 0,65 mmol) en DMF (4 ml) y 95% etanol (4 ml) a temperatura ambiente se le añadió, con agitación rápida, una suspensión de polvo de zinc (200 mg) en cloruro de amonio acuoso (0,15 g en 2 ml de agua). La mezcla resultante se agitó luego durante 2 horas. El zinc residual se eliminó por filtración, y el licor madre se vertió en agua (100 ml). Se eliminó un sólido amarillo por filtración. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 75 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron. El material bruto resultante se filtró por TLC preparativa, eluyendo con 10:1 CH₂Cl₂:MeOH = 10:1 para dar 7 mg (4%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES+): 324,1 (M+1, 100%).

Ejemplo comparativo 19

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-FURAN-2-IL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA (549-92)

1. A una disolución de benzotiazol-2-acetonitrilo (700 mg, 4 mmol) en diclorometano anhidro (25 ml) se le añadieron trietilamina (1,2 g, 11,9 mmol) y cloruro de 2-furoilo (522 mg, 4 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió luego diclorometano (100 ml). La fase orgánica se lavó con disolución de HCl acuoso al 1%, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó. El material bruto resultante se lavó con metanol y se secó para proporcionar 590 mg (55%) de éster 2-benzotiazol-2-il-2-ciano-1-furan-2-il-vinílico de ácido furan-2-carboxílico en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES+): 363,01 (M+1, 100%).

2. Una mezcla de éster 2-benzotiazol-2-il-2-ciano-1-furan-2-il-vinílico de ácido furan-2-carboxílico (660 mg, 1,82 mmol) y KOH (108 mg, 1,93 mmol) en etanol (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche a 50 °C durante 2 horas. La suspensión resultante se vertió en agua (200 ml), y la disolución se ajustó hasta pH 7, usando

disolución de HCl al 5%. Los sólidos se aislaron por filtración, se lavaron con agua y se secaron al aire para proveer 474 mg (97%) de 2-benzotiazol-2-il-3-furan-2-il-3-hidroxi acrilonitrilo bruto, que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional. MS (m/z, ES+): 268,98 (M+1, 100%).

3. Se suspendió 2-benzotiazol-2-il-3-furan-2-il-3-hidroxiacrilonitrilo (474 mg, 1,77 mmol) en POCl₃ (5 ml). La suspensión se agitó primero a 50 °C durante 1 hora, luego se mantuvo a reflujo durante 30 min hasta que el sólido se había disuelto completamente. La disolución de color pardo resultante se vertió sobre hielo triturado (200 ml). Los sólidos resultantes se aislaron por filtración, se lavaron con agua hasta que el pH del agua de lavado se tornó neutro y se secaron al aire para proporcionar 477 mg (94%) de 2-benzotiazol-2-il-3-cloro-3-furan-2-ilacrilonitrilo. MS (m/z, ES+): 287,0 (Cl³⁵M+1, 100%), 289,0 (Cl³⁷M+1, 45%).

4. El 2-benzotiazol-2-il-3-cloro-3-furan-2-ilacrilonitrilo (480 mg, 1,7 mmol) preparado anteriormente e hidrato de hidrazina (100 mg, 2 mmol) se mantuvieron a reflujo en metanol (15 ml) durante 3 horas. El disolvente se evaporó luego, y el residuo se cromatografió en columna ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 para dar 130 mg de material. Esto se purificó adicionalmente por TLC preparativa, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 para dar 23 mg (5%) del compuesto del título. MS (m/z, ES+): 283,0 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 19.

4-Benzotiazol-2-il-5-tiofen-2-il-2H-pirazol-3-ilamina (590-42): El compuesto del título (30 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando con 870 mg (5 mmol) de benzotiazol-2-acetonitrilo y 1,6 g (11 mmol) de cloruro de 2-tiofenocarbonilo. MS (m/z, ES+): 299,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 19%.

Ejemplo comparativo 20

SÍNTESIS DE 4-(5-FLUORO-6-METOXIBENZOTIAZOL-2-IL)-5-FURAN-2-IL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA (549-60)

1. Se agitó una disolución de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo (150 mg, 0,675 mmol), cloruro de 2-furoilo (135 µL, 1,37 mmol) y trietilamina (235 µL, 1,69 mmol) en diclorometano anhidro a temperatura ambiente durante aproximadamente tres horas, formando una disolución de color pardo oscuro. El producto bruto, éster 2-ciano-2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-1-furan-2-il-vinílico de ácido furan-2-carboxílico, se identificó por espectrometría de masas. MS (m/z, ES+): 410,97 (M+1, 80%), 520,98 (100%).

2. A la mezcla de reacción anterior se le añadió una cantidad catalítica de DMAP (~ 10 mg). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de completar la reacción, según lo indicado por el análisis TLC, se añadió una cantidad pequeña de HCl concentrado (~ 1 ml) al etanol precipitado. El producto se aisló luego por filtración y se lavó con metanol al 10% en diclorometano para proveer 175 mg (73%) de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-3-furan-2-il-3-hidroxiacrilonitrilo en forma de un sólido blanquecino. MS (m/z, ES+): 317 (M+1, 100%).

3. A una suspensión de 2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-3-furan-2-il-3-hidroxiacrilonitrilo (70 mg, 0,199 mmol) en diclorometano anhidro (3 ml) y tetracloruro de carbono (2 ml) se le añadió trifenilfosfina (175 mg, 0,667 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante tres horas, luego a temperatura ambiente durante una noche para dar una disolución de color pardo oscuro que contenía 3-cloro-2-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-3-furan-2-ilacrilonitrilo. Se añadieron luego monohidrato de hidrazina (30 µL, 0,62 mmol) y metanol (1 ml), y la disolución se mantuvo a reflujo durante 2 horas. En este punto, se añadió HCl conc. (0,7 ml) y la disolución se sometió a reflujo durante otra hora más. La mezcla se enfrió luego hasta temperatura ambiente y se neutralizó con hidróxido de amonio. El disolvente se evaporó y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 para proveer 15 mg (21%) del compuesto del título en forma de un sólido pardo. MS (m/z, ES+): 331,1 (M+1, 100%).

Ejemplo 21

SÍNTESIS DE 5-CICLOPROPIL-4-(5-FLUORO-6-METOXI-BENZOTIAZOL-2-IL)-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

(597-65)

A un recipiente de reacción de 10 ml que contenía (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il) acetonitrilo (100 mg, 0,45 mmol) en 4 ml de diclorometano anhidro se le añadieron cloruro de ciclopropano carbonilo (21 µL, 0,231 mmol), 1,35 equivalentes de trietilamina (85 µL) y una cantidad catalítica de DMAP (10 mg). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. En este punto, el disolvente se evaporó y se añadieron CCl₄ (4 ml), 2,5 equivalentes de trifenilfosfina unida a resina de poliestireno (725 mg, 1,55 mmol/g) y trietilamina (85 µL). Después de agitar a 65 °C durante un mínimo de 3 horas, la mezcla de reacción se concentró. Se añadieron luego etanol (4 ml) y monohidrato de hidrazina (40 µL, 1,8 equivalentes), y la mezcla se mantuvo a reflujo durante aproximadamente 6 horas. Se añadieron luego varias gotas de HCl concentrado para asegurar la ciclización completa del anillo pirazol. Después de completar la reacción, los sólidos se eliminaron por filtración, y la resina se lavó tres veces con metanol

al 10% en diclorometano. Después el filtrado se concentró y purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 50:1$ para proveer 40 mg (29%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES⁺): 305,1 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 21.

- 5 4-(6-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilamina (597-67A): El compuesto del título (48 mg) se preparó comenzando por 100 mg (0,45 mmol) de (6-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 58 μL (0,50 mmol) de cloruro de benzoílo. MS (m/z, ES⁺): 341,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 31%.
- 10 5-(2-Cloropiridin-3-il)-4-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina (597-67C): El compuesto del título (26 mg) se preparó comenzando con 100 mg (0,45 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 87 mg (0,50 mmol) de cloruro de 2-cloronicotinoílo. MS (m/z, ES⁺): 376,1 ($\text{Cl}^{35}\text{M}+1$, 100%), 378,1 ($\text{Cl}^{37}\text{M}+1$, 40%). Rendimiento = 15%.
- 15 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(4-fluorofenil)-2H-pirazol-3-ilamina (597-67D): El compuesto del título (26 mg) se preparó comenzando con 100 mg (0,45 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 59 μL (0,50 mmol) de cloruro de 4-fluorobenzoílo. MS (m/z, ES⁺): 359,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 28%.
- 20 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(3-fluorofenil)-2H-pirazol-3-ilamina (597-67E): El compuesto del título (37 mg) se preparó comenzando con 100 mg (0,45 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 59 μL (0,50 mmol) de cloruro de 3-fluorobenzoílo. MS (m/z, ES⁺): 359,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 22%.
- 25 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(4-metoxifenil)-2H-pirazol-3-ilamina (597-69A): El compuesto del título (32 mg) se preparó comenzando con 80 mg (0,36 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 68 mg (0,4 mmol) de cloruro de 4-metoxibenzoílo. MS (m/z, ES⁺): 371,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 24%.
- 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-isoxazol-6-il-2H-pirazol-3-ilamina (597-69F): El compuesto del título (5 mg) se preparó comenzando con 80 mg (0,36 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 38 μL (0,4 mmol) de cloruro de 5-isoxazolecarbonilo. MS (m/z, ES⁺): 332,0 (M+1, 100%), 318,0 (enol, 30%). Rendimiento = 11%.
- 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(3-nitrofenil)-2H-pirazol-3-ilamina (597-69B): El compuesto del título (24 mg) se preparó comenzando con 80 mg (0,36 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 74 mg (0,4 mmol) de cloruro de 3-nitrobenzoílo. MS (m/z, ES⁺): 386,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 17%.
- 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(4-fluorofenil)-2H-pirazol-3-ilamina (597-69D): El compuesto del título (26 mg) se preparó comenzando con 80 mg (0,36 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 47 μL (0,4 mmol) de cloruro de 4-fluorobenzoílo. MS (m/z, ES⁺): 359,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 20%.
- 30 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-tiofen-2-il-2H-pirazol-3-ilamina (597-69E): El compuesto del título (32 mg) se preparó comenzando con 80 mg (0,36 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 42 μL (0,4 mmol) de cloruro de 2-tiofenocarbonilo. MS (m/z, ES⁺): 347,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 25%.
- 35 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(5-mitrofurano-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina (597-69G): El compuesto del título (12 mg) se preparó comenzando con 80 mg (0,36 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 70 mg (0,4 mmol) de cloruro de 5-nitro-2-furoílo. MS (m/z, ES⁺): 376,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 9%.
- 4-(5-Fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-(2-fenilciclopropil)-2H-pirazol-3-ilamina (597-71 B): El compuesto del título (5 mg) se preparó comenzando con 100 mg (0,45 mmol) de (5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-acetonitrilo y 75 μL (0,48 mmol) de cloruro de trans-2-fenilciclopropilcarbonilo. MS (m/z, ES⁺): 381,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 4%.

Ejemplo 22

40 SÍNTESIS DE 3-(5-AMINO-4-BENZOTIAZOL-2-IL-2H-PIRAZOL-3-IL)-PROPAN-1-OL

1. A una disolución de benzotiazol-2-acetonitrilo (870 mg, 5 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml) se le añadió primero trietilamina (1,11 g, 11 mmol) y luego cloruro de 4-bromobutirilo (1,85 g, 10 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadieron más trietilamina (0,22 g) y cloruro de 4-bromobutirilo (0,48 g) y se siguió agitando durante otras 2 horas. La disolución de reacción se diluyó con diclorometano (100 ml). La fase orgánica se lavó con NaOH al 0,1%, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. El material bruto resultante se lavó con metanol y se secó para proporcionar 97 mg (6%) de benzotiazol-2-il-(dihidrofuran-2-ilidene)-acetonitrilo. MS (m/z, ES⁺): 343 (M+1, 100%).
- 45

2. El benzotiazol-2-il-(dihidrofuran-2-ilidene)-acetonitrilo (90 mg, 0,37 mmol) preparado anteriormente e hidrato de hidrazina (25 mg, 0,5 mmol) se mantuvieron a reflujo en etanol (15 ml) durante 10 horas. El disolvente se evaporó, y el residuo resultante se trituró con diclorometano. El sólido se aisló por filtración y se lavó luego con diclorometano y metanol para dar 60 mg (67%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES⁺): 275,1 (M+1, 100). ¹H NMR (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ (ppm), 11,5-12,2 (br s, 1H), 8,00 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,77 (t, 2H), 7,29 (t, 1H), 7,00-5,20 (br m, 2H), 4,55 (s, 1H), 3,52 (q, 2H), 2,83 (br s, 2H), 1,84 (q, 2H).
- 50

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 22.

4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-butan-1-ol: El compuesto del título (47 mg) se preparó comenzando con 522 mg (3 mmol) de benzotiazol-2-acetonitrilo y 538 mg (3,6 mmol) de cloruro de 5-bromopentanoilo. MS (m/z, ES+): 289,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 48%.

5 Ejemplo 23

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-(3-METILAMINO-PROPI)-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

1. A una disolución de H₂SO₄ concentrado (3 ml) y ácido bromhídrico (6 ml de 48%) se le añadió 3-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-il)-propan-1-ol (810 mg, 3,0 mmol). La mezcla resultante se mantuvo a reflujo durante 2 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua y se ajustó hasta pH 3-4, usando disolución al 5% de NaOH. El sólido pegajoso resultante se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó al aire para dar 815 mg (80%) de 4-benzotiazol-2-il-5-(3-bromopropil)-2H-pirazol-3-ilamina en forma de un sólido de color crema. El material bruto se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional. MS (m/z, ES+): 337,1 (Br⁷⁹M+1, 61%), 339,1 (Br⁸¹M+1, 59%), 257,2 (M-HBr, 100%).

2. Una mezcla de 4-benzotiazol-2-il-5-(3-bromopropil)-2H-pirazol-3-ilamina (130 mg, 0,39 mmol) y metilamina (5 ml de una disolución 2 M en THF, 10 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. El sólido resultante se aisló por filtración, se lavó con THF y luego con agua. El producto se secó al aire para proveer 38 mg (32%) del compuesto del título en forma de un sólido blanquecino. MS (m/z, ES+): 288,2 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 23.

5-(3-Aminopropil)-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamina (590-86A): El compuesto del título (12 mg) se preparó usando 130 mg (0,39 mmol) de 4-benzotiazol-2-il-5-(3-bromopropil)-2H-pirazol-3-ilamina, que derivó de 3-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-propan-1-ol, y una disolución saturada de gas de amoníaco en etanol. MS (m/z, ES+): 274,2 (M+1, 100%), 257,2 (M-NH₂, 70%).

4-Benzotiazol-2-il-5-(3-dimetilaminopropil)-2H-pirazol-3-ilamina (590-87A): El compuesto del título (100 mg) se preparó usando 200 mg (0,59 mmol) de 4-benzotiazol-2-il-5-(3-bromopropil)-2H-pirazol-3-ilamina, que derivó de 3-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-propan-1-ol, y 5 ml de una disolución 2 M de dimetilamina en THF (10 mmol). MS (m/z, ES+): 302,1 (M+1, 100%).

4-Benzotiazol-2-il-5-(4-metilaminobutil)-2H-pirazol-3-ilamina (590-94): El compuesto del título (30 mg) se preparó usando 185 mg (0,39 mmol) de 4-benzotiazol-2-il-5-(4-bromobutil)-2H-pirazol-3-ilamina, que derivó de 4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-butan-1-ol, y 5 ml de una disolución 2 M de metilamina en THF (10 mmol). MS (m/z, ES+): 302,4 (M+1, 100%).

4-Benzotiazol-2-il-5-(4-dimetilaminobutil)-2H-pirazol-3-ilamina (590-95): El compuesto del título (41 mg) se preparó usando 185 mg (0,39 mmol) de 4-benzotiazol-2-il-5-(4-bromobutil)-2H-pirazol-3-ilamina, que derivó de 4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-butan-1-ol, y 5 ml de una disolución 2 M de dimetilamina en THF (10 mmol). MS (m/z, ES+): 316,4 (M+1, 100%).

35 Ejemplo comparativo 24

SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-5-PIPERIDIN-4-IL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA (610-48)

1. A una disolución de benzotiazol-2-acetonitrilo (700 mg, 4 mmol), trietilamina (1,1 g, 10,9 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP, en 60 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente en argón se le añadió hidrocloreuro de 1-acetilpiperidina-4-carbonilcloruro (1,1 g, 4,46 mmol) en pequeñas porciones durante 2 horas. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 20:1 para proporcionar 880 mg (67%) de 3-(1-acetilpiperidin-4-il)-2-benzotiazol-2-il-3-hidroxiacrilonitrilo en forma de un sólido de color pardo ligero. MS (m/z, ES+): 328,1 (M+1, 100%).

2. A una disolución del 3-(1-acetilpiperidin-4-il)-2-benzotiazol-2-il-3-hidroxiacrilonitrilo anteriormente preparado (415 mg, 1,27 mmol), en diclorometano anhidro (20 ml) a temperatura ambiente bajo argón, se le añadieron trietilamina (193 mg, 1,9 mmol) y cloruro de tosilo (303 mg, 1,59 mmol) en pequeñas porciones. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano. La fase orgánica se lavó con HCl al 1%, NaOH al 0,5%, agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 20:1 para proveer 140 mg (23%) de éster 1-(1-acetilpiperidin-4-il)-2-benzotiazol-2-il-2-cianovinílico de ácido tolueno-4-sulfónico. MS (m/z, ES+): 482,1 (M+1, 100%).

3. Una mezcla del éster 1-(1-acetilpiperidin-4-il)-2-benzotiazol-2-il-2-cianovinílico del ácido tolueno-4-sulfónico anteriormente preparado (140 mg, 0,29 mmol) e hidrato de hidrazina (25 mg, 0,5 mmol) en metanol se sometió a

reflujo durante una noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 20:1$ para dar 54 mg (55%) de 1-[4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-piperidin-1-il]-etanona. MS (ES+): 342,1 (M+1, 100%).

4. Una disolución de la 1-[4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-piperidin-1-il]-etanona anteriormente preparada (54 mg, 0,158 mmol) en HCl 6N (10 ml) se sometió a reflujo durante 6 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla resultante se vertió sobre hielo triturado (20 ml), y la disolución se ajustó hasta pH neutro, usando una disolución al 10% de NaOH. La disolución resultante se saturó con NaCl y se extrajo con acetato de etilo (10 x 50 ml). Los extractos combinados se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 20:1$ con amoníaco al 1% para proveer 15 mg (32%) del compuesto del título. MS (m/z, ES+): 300,14 (M+1, 100%).

Ejemplo comparativo 25

2-(3-FENIL-1H-PIRAZOL-4-IL)BENZOTIAZOL

- 15 A una disolución de 2-metilbenzotiazol (149 mg, 1 mmol) en THF se le añadió n-BuLi (0,5 ml de una disolución 2M en ciclohexano, 1 mmol) a -70 °C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 1,5 horas, y después se añadió gota a gota benzoato de etilo (150 mg, 1 mmol). Después de agitar durante otra 1,5 hora, se añadió gota a gota una disolución saturada de NH_4Cl . La reacción se dejó luego calentar hasta 5 °C, y se obtuvo un precipitado que se aisló por filtración y se lavó con agua. El material bruto resultante se cristalizó a partir de metanol para dar el intermedio deseado.
- 20 Una disolución del intermedio anteriormente preparado (147 mg, 0,58 mmol) y DMF dimetil acetal (76 mg, 0,64 mmol), en 5 ml de tolueno, se agitó durante una noche a temperatura ambiente y después se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla se concentró al vacío, y el residuo se purificó por recristalización para proporcionar el producto deseado.
- 25 El intermedio anteriormente preparado (86 mg, 0,28 mmol) se disolvió en metanol (10 ml) y luego se trató con hidrato de hidrazina (30 mg, 0,6 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. En este punto, el disolvente se eliminó al vacío, y el residuo se purificó por recristalización para proporcionar 71 mg del compuesto del título. MS (m/z, ES+): 278 (M+1, 100%); ^1H NMR (400 MHz, ppm, CDCl_3): δ 13,57 (br s, 1H), 8,6 y 8,1 (br, 1H), 7,99 (d, 1H), 7,91 (d, 1H), 7,72-7,66 (m, 2H), 7,55-7,40 (m, 4H), 7,35 (dd, 1H). Rendimiento = 27%.

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 25.

- 30 2-[3-(4-Metoxifenil)-1H-pirazol-4-il]benzotiazol: El compuesto del título (457 mg) se preparó en tres etapas, comenzando con 1,49 g (10 mmol) de 2-metilbenzotiazol y 1,66 g (10 mmol) de 4-metoxibenzoato de metilo. MS (m/z, ES+): 308 (M+1, 100%). ^1H NMR (400 MHz, ppm, CDCl_3): δ 8,28 (s, 1H), 8,00 (d, 3J = 8,1 Hz, 1H), 7,75 (d, 3J = 8,0 Hz, 1H), 7,57 (d, 3J = 8,6 Hz, 2H), 7,44 (dd, 3J = 7,4 Hz, 3J = 8,1 Hz, 1H), 7,33 (dd, 3J = 7,4 Hz, 3J = 8,0 Hz, 1H), 7,00 (d, 3J = 8,6 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H). Rendimiento = 18%.
- 35 2-[3-(2-Metoxifenil)-1H-pirazol-4-il]benzotiazol: El compuesto del título (430 mg) se preparó en cuatro etapas, comenzando con 1,49 g (10 mmol) de 2-metilbenzotiazol y 1,66 g (10 mmol) de 2-metoxibenzoato de metilo. Después de la reacción con hidrazina, el producto de adición se disolvió en metanol y se calentó a reflujo con una cantidad catalítica de p-TSA (15 mg) durante 2 horas para proveer el compuesto del título. MS (m/z, ES+): 308 (M+1, 100%). Rendimiento = 14%.
- 40 2-(3-Metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol (515-84): El compuesto del título (970 mg) se preparó en tres etapas, comenzando con 2-metilbenzotiazol y acetato de etilo. MS (m/z, ES+): 216,04 (M+1, 100%).

Ejemplo comparativo 26

SÍNTESIS DE 4-(4-BENZOTIAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3-IL)FENOL

- 45 A una suspensión de 2-[3-(4-metoxifenil)-1H-pirazol-4-il]benzotiazol (100 mg, 0,33 mmol) se le añadió lentamente tribromoborano (3,3 ml de una disolución 1 M en CH_2Cl_2 , 3,3 mmol). La mezcla se agitó durante una noche. La reacción se inactivó luego con la adición de metanol. La mezcla se neutralizó con disolución de carbonato sódico y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se evaporaron. El material bruto se cristalizó a partir de acetato de etilo para dar 64 mg (66%) del compuesto del título en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES+): 294 (M+1, 100%). ^1H NMR (400 MHz, ppm, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,5 (br s, 1H), 9,80 (br s, 1H), 8,22 (br s, 1H), 7,98 (d, 3J = 8,1 Hz, 1H), 7,91 (d, 3J = 8,0 Hz, 1H), 7,47 (d, 3J = 8,6 Hz, 2H), 7,45 (dd, 3J = 7,4 Hz, 3J = 8,1 Hz, 1H), 7,34 (dd, 3J = 7,4 Hz, 3J = 8,0 Hz, 1H), 6,89 (d, 3J = 8,0 Hz, 2H).

Ejemplo comparativo 27

SÍNTESIS DE 2-(4-BENZOTIAZOL-2-IL-1H-PIRAZOL-3-IL)FENOL

Se preparó 2-(4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)fenol (82 mg) en analogía al procedimiento descrito en el Ejemplo 26, comenzando con 100 mg (0,33 mmol) de 2-[3-(2-metoxi-fenil)-1H-pirazol-4-il]benzotiazol. MS (m/z, ES⁺): 294 (M+1, 100%). Rendimiento = 85%.

Ejemplo comparativo 28

5 SÍNTESIS DE 4-BENZOTIAZOL-2-IL-2-METIL-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

Se calentó una disolución de benzotiazol-2-ilacetoneitrilo (522 mg, 3 mmol) y DMF dimetil acetal (394 mg, 3,3 mmol) en tolueno (6 ml) hasta reflujo durante 3 horas, y luego se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por recristalización a partir de 2-propanol para dar 350 mg (51%) del producto en forma de un sólido amarillo pálido.

10 Una mezcla del 2-benzotiazol-2-il-3-dimetilaminoacrilonitrilo anteriormente preparado (96 mg, 0,42 mmol) y trietilamina (0,3 ml) en EtOH (10 ml) se trató con sulfato de metilhidrazina (180 mg, 1,25 mmol), y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 2 días. La disolución se concentró al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos:EtOAc = 1:1) para proveer 47 mg (49%) del compuesto del título en forma de un polvo amarillo. MS (m/z, ES⁺): 231 (M+1, 100%).

15 Ejemplo 29

SÍNTESIS DE ÉSTER METÁLICO DE ÁCIDO 2-(3-AMINO-5-METIL-1H-PIRAZOL-4-IL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXÍLICO (574-26E2)

20 Una disolución de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico (1,52 g, 5,5 mmol) en 500 ml de metanol anhidro que contenía gas HCl se calentó a reflujo durante 5 horas. Se eliminó el exceso de metanol por destilación, y la disolución se neutralizó mediante la adición de carbonato sódico saturado. Los sólidos resultantes se aislaron por filtración para proporcionar 500 mg del compuesto del título en forma de un sólido amarillo. MS (m/z, ES⁺): 289,1 (M+1, 100%).

Ejemplo 30

25 SÍNTESIS DE AMIDA DE ÁCIDO 2-(3-AMINO-5-METIL-1H-PIRAZOL-4-IL)-4,5,6-TRIFLUOROBENZOTIAZOL-7-SULFÓNICO (598-79)

30 Se calentó 5-metil-4-(4,5,6-trifluorobenzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina (474 mg; 1,67 mmol) a 140-150 °C en ácido clorosulfónico (4 ml) durante 72 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se vertió sobre hielo, y el producto se extrajo en acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron. El residuo se disolvió en etanol, y se añadió una disolución de amoníaco en etanol (15 ml).

35 La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras se burbujeaba gas de amoníaco en la mezcla. El volumen de disolvente se redujo luego, se evaporó y se añadió agua. el precipitado beis resultante se separó por filtración a vacío para dar 490 mg (81%) del compuesto del título. MS (m/z, ES⁺): 313,0 (Cl³⁵M+1, 100%), 315,0 (Cl³⁷M+1, 50%); ¹H NMR (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,75 (br s, 1H), 7,80 (d, 1H, JHF = 11,4 Hz), 6,25 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 2,39 (s, 3H).

Ejemplo 31

SÍNTESIS DE 4-(7-CLORO-5-FLUORO-6-METOXIBENZOTIAZOL-2-IL)-5-METIL-1H-PIRAZOL-3-ILAMINA (598-80)

40 Se mezcló 4-(5-fluoro-6-metoxibenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (596 mg; 2,14 mmol) con 4 ml de cloruro de sulfurilo. La reacción se agitó a temperatura ambiente por varias horas, y luego la reacción se inactivó con adición de agua. El precipitado resultante se aisló por filtración para dar 417 mg (62%) del compuesto del título. MS (m/z, ES⁺): 364,2 (M+1, 100%).

Ejemplo 32

SÍNTESIS DE 2-(5-AMINO-3-METIL-1H-PIRAZOL-4-IL)-BENZOTIAZOL-5-OL (574-13)

45 A una suspensión de 4-(5-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (60 mg, 0,23 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml) a 4 °C se le añadió lentamente tribromoborano (2,3 ml de una disolución 1M en diclorometano, 2,3 mmol). La temperatura de reacción se mantuvo a 4 °C, y la disolución se agitó durante una noche. La mezcla se neutralizó luego con disolución de carbonato sódico. Los sólidos resultantes se aislaron por filtración y se purificaron por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con CHCl₃:MeOH = 9:1 para dar 10 mg (19%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES⁺): 247,1 (M+1, 100%).

Ejemplo 33

SÍNTESIS DE [2-(5-AMINO-3-METIL-1H-PIRAZOL-4-IL)-BENZOTIAZOL-5-IL]-METANOL (574-21)

A una disolución de éster etílico de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-carboxílico (30 mg) en THF (1 ml) se le añadió hidruro de aluminio y litio (4 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, momento en el cual se añadió nonahidrato de sulfato de sodio. La mezcla resultante se agitó durante 30 min. más. Los sólidos se eliminaron por filtración. El disolvente luego se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna rápida, eluyendo con CHCl_3 :MeOH = 9:1 para dar 21 mg (81%) del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES+): 261,1 (M+1, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 33.

[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-metanol (574-36A): El compuesto del título (340 mg) se preparó comenzando con 470 mg (1,63 mmol) de éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico. El producto final se purificó por recristalización a partir de una mezcla de etanol/agua. MS (m/z, ES+): 261,0 (M+1, 100%). Rendimiento = 80%.

[2-(3-Amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-il]-metanol (574-50A): El compuesto del título (30 mg) se preparó comenzando con 54 mg (0,18 mmol) de éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-carboxílico. El producto final se purificó por recristalización a partir de una mezcla de etanol/agua. MS (m/z, ES+): 279,1 (M+1, 100%). Rendimiento = 61%.

Ejemplo 34

SÍNTESIS DE 5-METIL-4-(6-PIRROLIDIN-1-ILMETIL-BENZOTIAZOL-2-IL)-2H-PIRAZOL-3-ILAMINA

(574-36C)

1. A una disolución de H_2SO_4 concentrado (0,3 ml) y ácido bromhídrico (0,6 ml, 48%) se le añadió [2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-metanol (52 mg, 0,2 mmol). La mezcla resultante se mantuvo a reflujo durante 2 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se vertió en agua con hielo, generando una disolución lechosa. La suspensión se neutralizó hasta pH 3-4 con disolución al 5% de NaOH. El sólido de color crema resultante se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó al aire para proporcionar 58 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina. El material bruto se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional.

2. A una suspensión de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (20 mg) en etanol (1 ml) se le añadió exceso de pirrolidina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se eliminó luego por evaporación, y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CHCl_3 : MeOH = 9:1 para dar 2,7 mg del compuesto del título en forma de un sólido de color crema. MS (m/z, ES+): 314,1 (M+1, 45%), 243,0 (M-C₄H₈N, 100%).

Los siguientes compuestos se prepararon en un modo análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 34.

5-Metil-4-(6-metilaminometilbenzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina (574-36E): El compuesto del título (1,6 mg) se preparó comenzando con 18 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y exceso de metilamina. MS (m/z, ES+): 274,1 (M+1, 100%), 243,1 (M-CH₃NH, 60%).

5-Metil-4-[6-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina (574-36D): El compuesto del título (9 mg) se preparó comenzando con 20 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y exceso de 1-metilpiperazina. MS (m/z, ES+): 343,1 (M+1, 20%), 244,1 (M-CH₃N(CH₂)₄N+1, 100%).

5-Metil-4-(6-morfolin-4-ilmetilbenzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina (574-38B): El compuesto del título (27 mg) se preparó comenzando con 40 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y exceso de morfolina. MS (m/z, ES+): 330,1 (M+1, 30%), 243 (M-O(CH₂)₄N, 100%).

4-(6-Dimetilaminometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina (574-38A): El compuesto del título (24 mg) se preparó comenzando con 40 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y exceso de dimetilamina. MS (m/z, ES+): 288,1 (M+1, 20%), 243,1 (M-(CH₃)₂N, 100%).

2-{[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil]-amino}-etanol (574-38C): El compuesto del título (10 mg) se preparó comenzando con 40 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y exceso de 2-aminoetanol. MS (m/z, ES+): 304,1 (M+1, 10%), 243,2 (M-HOCH₂CH₂NH, 100%).

3-{[2-(5-Amino-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil]-amino}-N-metilbencenosulfonamida (574-38F): El compuesto del título (9 mg) se preparó comenzando con 40 mg de 4-(6-bromometilbenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina y exceso de 3-amino-N-metilbencenosulfonamida. MS (m/z, ES+): 429,2 (M+1, 100%).

4-(6-Dimetilaminometil-5-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina (574-50C): El compuesto del título (28 mg) se preparó en dos etapas, comenzando con 30 mg (0,1 mmol) de [2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluorobenzotiazol-6-il]metanol. La reacción del bromuro se llevó a cabo con exceso de dimetilamina. MS (m/z, ES+): 306,1 (M+1, 43%), 261,1 (60%), 153,5 (100%).

5 Ejemplo comparativo 35

4-BENZOTIAZOL-2-IL-N⁵-(1H-IMIDAZOL-2-ILMETILENO)-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA (610-49)

Una mezcla de 4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina (50 mg, 0,22 mmol) y 2-imidazolcarbonilaldehído (22 mg, 0,22 mmol) en metanol (10 ml) se sometieron a reflujo durante una noche. El disolvente se evaporó, y el material bruto resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH = 20:1 para proveer 21 mg (31%) del compuesto del título. MS (m/z, ES+): 310,1 (M+1, 15%), 232,1 (M-77, 60%), 142,0 (M-167, 68%), 101,1 (100%).

Ejemplo comparativo 36

4-BENZOTIAZOL-2-IL-N⁵-(1H-IMIDAZOL-2-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3,5-DIAMINA (610-52)

Una mezcla de 4-benzotiazol-2-il-N⁵-(1H-imidazol-2-ilmetileno)-1H-pirazol-3,5-diamina (13 mg, 0,042 mmol) y NaBH₄ (10 mg) se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se evaporó luego, y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con un gradiente de CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂:MeOH = 4:1 para dar 12 mg (84%) del compuesto del título. MS (m/z, ES+): 312,1 (M+1, 80%), 232,1 (100%).

Ejemplo comparativo 37

SÍNTESIS DE AMIDA DE ÁCIDO 2-(1H-PIRAZOL-4-IL)-BENZOTIAZOL-6-SULFÓNICO (523-88-39)

Una disolución de 2-(1H-pirazol-4-il)benzotiazol (600 mg, 0,30 mmol), en ácido clorosulfónico puro, se calentó a 150 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se vertió luego sobre hielo, y el precipitado resultante se aisló por filtración para dar una mezcla de cloruro de 2-(1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilo y cloruro de 2-(1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-4-sulfonilo.

El material bruto anteriormente preparado se hizo reaccionar con hidróxido de amonio en etanol. El disolvente se evaporó y el material bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 37 mg del compuesto del título contaminados con aproximadamente 25% de amida de ácido 2-(1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-4-sulfónico según lo determinado por ¹H NMR. MS (m/z, ES+): 281,2 (M+1, 100%); ¹H NMR (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): 13,50 (br s, 1H), 8,7 (d, 1H), 8,8 (br s, 2H), 8,08 (d, 1H), 7,9 (dd, 1H), 7,42 (br s, 2H) (isómero principal).

Ejemplo comparativo 38

30 SÍNTESIS DE (4-BENZOTIAZOL-2-IL-2H-PIRAZOL-3-IL)-METILAMINA (523-32A)

Una disolución de 4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamina (1,1 g, 5,0 mmol) en 20 ml de ácido fórmico se calentó a 70 °C durante una noche. El ácido fórmico se evaporó a presión reducida y el material bruto resultante se recristalizó a partir de etanol para dar 1,1 g (90%) de N-(4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-formamida.

35 A la N-(4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-formamida anteriormente preparada (0,50 g, 2,0 mmol) en 50 ml de THF anhidro, a 0 °C, se le añadió 0,50 g de hidruro de aluminio y litio. La reacción se agitó durante 1 hora y después se inactivó mediante la adición de disolución saturada de cloruro de amonio. Los sólidos se eliminaron por filtración. Luego se evaporó el disolvente, y el producto bruto se purificó por recristalización a partir de acetona para dar 280 mg (61%) del compuesto del título. MS (m/z, ES+): 231,1 (M+1, 100%).

40 Para los siguientes ejemplos biológicos las condiciones son temperatura ambiente, a menos que se indique algo distinto.

Ejemplo 39

PERFIL DE ACTIVIDAD *IN VITRO* PARA CINASAS

Preparación y uso de enzimas

45 La diana ILK es una proteína recombinante de longitud total expresada en células de insectos H15 por infección de baculovirus. Se expresó la proteína ILK recombinante usando células de insectos cultivadas y un sistema de expresión de baculovirus. Se utilizaron técnicas estándar para manipulación de DNA a fin de producir baculovirus y moléculas de DNA recombinantes (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989, Molecular cloning, a laboratory manual, segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY; Crossen, R. y Gruenwald, S. 1998. Baculavirus expression Vector System Manual. 5ta Edición. (Pharmingen, San Diego, CA). El marco de lectura abierto de ILK (Hannigan et al., supra.), excluyendo la regiones no traducidas 5' y 3', se insertó en el vector de transferencia de

baculovirus pAcG 2T (Pharmingen) para producir una proteína de fusión GST bajo el control del promotor de polihedrina fuerte AcNPV. Este constructo de transferencia de ILK se co-transfectó luego con DNA Bacuio-Gold™ (Pharmingen) en células de insectos Sf9 (Invitrogen) y se produjo una preparación de alta titulación del baculovirus recombinante GST-ILK por ampliación en células Sf9. La expresión en escala de litros de la proteína recombinante GST-ILK se realizó en matraces de agitación de 1000 ml (Belico) por infección de células de insecto Hi5 (Invitrogen) desarrolladas en medio libre de suero Ex-Cell™ 400 (JRH Biosciences) a una multiplicidad de infección de aproximadamente 5. Las células se cosecharon tres días después de la infección y se lisaron en hielo, en tampón de lisis de ILK (ILB; imidazol 10 mM, pH 7,5, NaCl 50mM, 0,1% NP-40, 0,1% β-mercaptoetanol, PMSF 0,5 mM, benzamidina 1 mM) con triturador de tejido Dounce (Kontes). El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en ILB, usando el homogeneizador, y se centrifugó como anteriormente. Después se lavó el sedimento dos veces en tampón de extracción de ILK (IEB, imidazol 10 mM, pH7,5, NaCl 400mM, 1% NP-40, 0,1% β-mercaptoetanol, PMSF 0,5mM, benzamidina 1 mM). El sedimento luego se resuspendió en tampón DNase-ATP (DAB, imidazol 10 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 5 mM, 1% NP-40, 0,1% β-mercaptoetanol, PMSF 0,5mM, benzamidina 1 mM, 10 ug/ml DNase I, ATP 1 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 1 mM, 5 uM ácido β-metil aspártico, NaF 2 mM) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos, y el sedimento se resuspendió y se lavó una vez en tampón con alto contenido de sal (HSB, imidazol 10 mM, pH7,5, NaCl 400, EDTA 5mM, 0,1% β-mercaptoetanol, PMSF 0,5mM, benzamidina 1 mM). La suspensión se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos. Finalmente, el sedimento se resuspendió en tampón de conservación de ILK (ISB, imidazol 10 mM, pH7,5, EDTA 0,2mM, 0,1% β-mercaptoetanol, PMSF 0,5mM, 30% glicerol) y se conservó a -80 °C.

Se realizó el análisis bioquímico de la enzima activada en la preparación de la proteína ILK1 humana recombinante, usando el protocolo experimental señalado en la sección titulada "In Vitro Activity Profile For Kinases". Típicamente, se halló que las preparaciones de ILK1 exhiben actividad de proteína fosfotransferasa en presencia de 50 μM [γ-³²P]-ATP y 159 μM de sustrato de ILK1 (secuencia de aminoácidos: CKRRRLASLR-amida) durante una reacción de 15 minutos a temperatura ambiente.

Se ensayó la capacidad de los compuestos de inhibir la actividad de ILK en el siguiente ensayo. La potencia *in vitro* deseada de un inhibidor particular es tal que el compuesto es útil como agente terapéutico, es decir, en el intervalo nanomolar o micromolar. Véase la Tabla 1 a continuación.

A. Descripción del ensayo

Los compuestos de ensayo se liofilizaron y conservaron a -20 °C. Se prepararon disoluciones madre pesando los compuestos y disolviéndolos en sulfóxido de dimetilo (DMSO) hasta una concentración estándar, usualmente de 20 mM, y se conservaron a -20 °C. Los compuestos se diluyeron hasta una concentración del intermedio de partida de 250 μM en DMSO al 1%, luego se diluyeron en serie en una hilera de una placa de 96 pocillos, usando etapas de dilución en serie dobles. Se usó el DMSO al 100% diluido como control negativo.

Se introdujeron con pipeta robótica 5 μL de cada dilución de compuesto a placas de Costar™ serocluster, manteniendo el mismo esquema de placas. Todas las mezclas de ensayo consistieron en los siguientes volúmenes:

5 μL de compuesto diluido

10 μL de preparación de enzima diana

1 μL de sustrato

5 μL de ensayo ATP

Las mezclas de ensayo se incubaron luego 15 minutos a temperatura ambiente.

De cada mezcla de ensayo, 10 μL de mezcla de ensayo se dispusieron en placas opacas Millipore Multiscreen-PH™ y se lavaron dos veces durante 10 minutos en ácido fosfórico al 1%. Las placas se secaron a 40 °C durante 30 minutos, después se cuantificaron los complejos de sustrato-fosfato mediante recuento de centelleos. Estas placas Millipore tienen un formato de 96 pocillos con membranas de fosfocelulosa P81 inmovilizadas en los pocillos. Tanto la forma fosforilada como la no fosforilada del sustrato se unen a la membrana mientras se elimina ATP (fosfato no incorporado) mediante las etapas de lavado subsiguientes.

B. Cálculo de CI₅₀

La inhibición de ILK mediante los compuestos de ensayo se mide por recuento de centelleos de la incorporación de fosfato radiactivo a un sustrato específico que se inmoviliza en un papel de filtro al final del ensayo. Para ofrecer mediciones de inhibición significativas, los ensayos se realizan tanto en ausencia como en presencia de inhibidores específicos conocidos, y se compara la cantidad de radiactividad incorporada para proveer una medición inicial.

La "actividad inicial" es la cantidad de radiactividad incorporada en ausencia de un inhibidor diana. La cantidad de radiactividad incorporada en presencia de un inhibidor diana se denomina "actividad de la muestra", y el % de inhibición se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (\text{actividad de la muestra} / \text{actividad inicial} \times 100)$$

- 5 y por lo general se expresa junto con la concentración del compuesto. Al usar un intervalo de concentraciones del inhibidor diana, se estima el valor CI_{50} de un inhibidor (es decir, la concentración a la cual se reduce la actividad enzimática en 50%). Puede compararse el valor CI_{50} de diversos inhibidores contra una diana particular, donde un valor CI_{50} indica un inhibidor más potente.

- 10 La tabla siguiente incluye compuestos de la presente invención y compuestos que se incluye para fines comparativos solamente.

TABLA 1: Ensayo de inhibición de la enzima ILK *in vitro*

Nombre químico	Valor CI_{50} promedio (μM)
(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-[2-(1H-imidazol-4-il)-etil]-amina	0,2
(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-metil-amina	1,7
[2-(3-Amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-il]-metanol	0,1
(2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-il)-metanol	3,7
[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-metanol	0,9
2-(1H-Pirazol-4-il)-benzotiazol	1,6
Amida de ácido 2-(1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,5
Amida de ácido 2-(3-amino-1H-pirazol-4-il)-6-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	0,02
Amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-4,5,6-trifluoro-benzotiazol-7-sulfónico	0,07
Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-carboxílico	0,06
Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	0,04
Ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico	1,1
Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico	0,3
Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,07
(2,6-Dimetil-pirimidin-4-il)-amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-sulfónico	2,6
Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-7-carboxílico	0,7
2-(3-Metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol	0,9
2-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-fenol	4,6
2-(5-Amino-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilamina	0,5
Metilamida de ácido 2-(5-amino-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,06
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-4-fluorobenzotiazol-6-sulfónico	0,04
(2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-4-sulfónico	0,15
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	0,007
(2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-5-sulfónico	0,05

Nombre químico	Valor CI_{50} promedio (μM)
(Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	0,13
2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-ol	0,2
Metilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-sulfónico	1,9
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico	0,3
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,01
(2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,2
(2-Metoxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,6
4-Fluoro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	4,8
(2-Tiofen-2-il-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	1,7
4-Cloro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,9
4-Metoxi-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	1,0
Bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,8
Fenetil-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,8
[2-(4-Amino-fenil)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,2
(2-Morfolin-4-il-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	3,0
(2,2,2-Trifluoro-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,09
Ciclopropilmetil-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,7
(2-(3H-Imidazol-4-il)-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,2
4-Amino-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,6
(Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,04
(2-Dimetilamino-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,3
(3-Dimetilamino-propil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	3,2
(Hidrazido acético) amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,03
(Fenilhidrazino) amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,9
Amida de ácido 2-(5-amino-3-piridin-4-il-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	0,05
2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etanol	0,4
2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-ciclopentanol	3,5
2-[(2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil]-amino}-etanol	0,1

Nombre químico	Valor CI_{50} promedio (μM)
3-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-propan-1-ol	0,2
3-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-propan-1-ol	0,4
3-[5-Amino-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamino]-propan-1-ol	0,5
3-[(2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil)-amino]-bencenosulfonamida	0,8
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-6-etil-benceno-1,3-diol	1,9
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-benceno-1,3-diol	3,3
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-fenol	3,4
4-(4-fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	0,4
4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-butan-1-ol	1,0
4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-butan-1-ol	1,7
Ácido 4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-butírico	4,3
4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-N-tiazol-2-il-bencenosulfonamida	3,5
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(2-fluoro-fenil)-2H-pirazol-3-ilamina	4,0
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(2-fenil-ciclopropil)-2H-pirazol-3-ilamina	2,1
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(3-fluoro-fenil)-2H-pirazol-3-ilamina	2,3
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(3-nitro-fenil)-2H-pirazol-3-ilamina	0,9
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(4-fluoro-fenil)-2H-pirazol-3-ilamina	2,4
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(4-metoxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilamina	2,0
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(5-nitro-furan-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	0,3
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,04
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-isoxazol-5-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,1
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,06
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilamina	2,3
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-b-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,07
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-piridin-4-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,2
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-tiofen-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,7
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-N ³ -[2-(3H-imidazol-4-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina	0,2
4-(5-Fluoro-6-metil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	0,05
4-(5-Fluoro-6-metil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	0,3
4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	0,04
4-(5-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	3,7
4-(5-Trifluorometil-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	1,1
4-(6-Bromo-5-fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,2
4-(6-Bromo-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,4

Nombre químico	Valor CI ₅₀ promedio (µM)
4-(6-Clorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	0,3
4-(6-Dimetilaminometil-5-fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,6
4-(6-Dimetilaminometil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	0,2
4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	0,2
4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,4
4-(6-Metanosulfonil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	0,5
4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-methy1H-pirazol-3-ilamina	0,34
4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,2
4-(6-Nitro-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	3,4
4-(7-cloro-4-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	1,0
4-(7-Cloro-5-fluoro-6-metoxi-benzothieazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,4
4-[(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-metil]-bencenosulfonamida	2,9
4-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etil]-fenol	2,9
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamina	0,3
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	0,7
4-Benzotiazol-2-il-5-(3-dimetilamino-propil)-2H-pirazol-3-ilamina	0,2
4-Benzotiazol-2-il-6-(3-metilemino-propil)-2H-pirazol-3-ilamina	0,02
4-Benzotiazol-2-il-5-(4-dimetilamino-butil)-2H-pirazol-3-ilamina	0,4
4-Benzothiazol-2-il-5-(4-metilamino-butil)-2H-pirazol-3-ilamina	0,1
4-Benzotiazol-2-il-5-(4-nitro-fenil)-2H-pirazol-3-ilamina	4,0
4-Benzotiazol-2-il-5-ciclopropil-2H-pirazol-3-ilamina	0,6
4-Benzotiazol-2-il-5-etil-1H-pirazol-3-ilamina	0,8
4-Benzotiazol-2-il-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,1
4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	0,3
4-Benzotiazol-2-il-5-metilsulfanil-1H-pirazol-3-ilamina	1,1
4-Benzotiazol-2-il-5-fenil-1H-pirazol-3-ilamina	0,9
4-Benzotiazol-2-il-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,19
4-Benzotiazol-2-il-5-piperidin-4-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,06
4-Benzotiazol-2-il-5-piridin-3-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,6
4-Benzotiazol-2-il-5-piperidin-4-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,1
4-Benzotiazol-2-il-5-pirrolidin-1-il-1H-pirazol-3-ilamina	3,7
4-Benzotiazol-2-il-5-tiofen-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,9
4-Benzotiazol-2-il-N ³ -(1H-imidazol-2-ilmetil)-1H-pirazol-3,5-diamina	2,5
4-Benzotiazol-2-il-N ³ -(1H-imidazol-2-ilmetileno)-1H-pirazol-3,5-diamina	1,0

Nombre químico	Valor CI ₅₀ promedio (µM)
4-Benzotiazol-2-il-N ³ -(2-dimetilamino-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,5
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -(2-dimetilamino-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,15
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -(2-metoxi-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,7
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -(2-pirrolidin-1-il-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina	1,9
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -(3-dimetilamino-propil)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,3
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -(3-imidazol-1-il-propil)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,5
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -[2-(1H-indol-3-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina	3,3
4-Benzotiazol-2-il- N ³ -piperidin-4-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina	2,7
4-Benzotiazol-2-il-N ⁵ -(2-morfolin-4-il-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina	1,5
4-Benzotiazol-2-il- N ⁵ -etil-1H-pirazol-3,5-diamina	1,7
4-Benzotiazol-2-il- N ⁵ -piridin-3-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina	2,9
5-(2-Cloro-piridin-3-il)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	3,4
5-(3-Amino-propil)-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,01
5-(4-Amino-fenil)-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	0,1
5-Ciclopropil-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	1,0
5-Metil-4-(4,5,6-trifluoro-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	0,2
5-Metil-4-(5-trifluorometilbenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	2,8
5-Metil-4-(6-metilaminometil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	0,5
5-Metil-4-(6-morfolin-4-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	0,5
5-Metil-4-(6-pirrolidin-1-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	0,9
5-Metil-4-[6-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina	5,0
5-Metil-4-[6-(4-metil-piperazina-1-sulfonil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina	4,9
N-[2-(6-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-acetamida	0,4
N-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etil]-acetamida	1,1
N-[4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-fenil]-hidroxilamina	1,6
N-{2-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilamino]-etil}-acetamida	0,7
N-{2-[5-Amino-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamino]-etil}-acetamida	1,8
N3-(2-Amino-etil)-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	0,02
N3-(2-Dimetilamino-etil)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,3
N3-(3-Dimetilamino-propil)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,2
N3-(4-Amino-fenil)-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	6,0
N3-[2-(3H-Imidazol-4-il)-etil]-4-(6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina	0,6

Ejemplo 40

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Este procedimiento se usó para determinar los efectos que poseen los compuestos sobre diversas líneas celulares con respecto a la viabilidad celular. La viabilidad celular se cuantifica usando calceína AM y midiendo su conversión a un producto fluorescente (calceína) con un fluorímetro.

- 5 El principio de este ensayo se basa en la presencia de actividad de esterasa intracelular ubicua hallada en células hepáticas. Mediante la reacción enzimática de esterasa, la calceína permeable a las células, no fluorescente AM se convierte en calceína intensamente fluorescente. La calceína de tinte polianiónico es retenida dentro de las células hepáticas, produciendo una fluorescencia verde en las células del hígado. Se ha de destacar que la calceína AM es susceptible a hidrólisis cuando se expone a humedad. En consecuencia, se deben preparar disoluciones de trabajo
10 acuosas que contengan calceína AM inmediatamente antes del uso, y se deben usar dentro de aproximadamente un día.

Un kit disponible para este ensayo es el kit de Viabilidad/Citotoxicidad "LIVE/DEAD® (L-3224)" de Molecular Probes.

- 15 Las células se recogen de matraces de cultivo de tejido y se tripsinan, centrifugan, resuspenden y cuentan. Se sembraron células para obtener 80-90% confluencia (para células normales, 10.000 células/pocillo (8000 células/pocillo para células HUVEC)). Se prepara una concentración celular de 110.000 células/ml (88.000 células/pocillo para células HUVEC) ya que se usa un volumen de 90 µL por pocillo.

- 20 Usando un pipeteador de multidispensación de 8 canales, las células se sembraron en las hileras centrales de la placa (placa de fondo plano de 96 pocillos Nunclon™), dejando las hileras superiores e inferiores periféricas con el mismo volumen de medio solamente. Las placas se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante una noche por aproximadamente 24 horas.

- 25 Para los compuestos de ensayo, se prepararon los medios de cultivo (p. ej., RPMI + 10% FBS), disolución del compuesto 10X de la concentración deseada final de compuestos madre 20 mM. Se añaden 10 µL de esta disolución de compuesto 10X a los 90 µL de células ya presentes en las placas de 96 pocillos, y se emplea un compuesto citotóxico conocido de ensayos previos como control positivo. El control negativo es DMSO al 100% diluido hasta el mismo factor que los compuestos.

Las placas se incuban a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, y el medio se aspira después de que las placas se centrifugan a 2400 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se añaden 100 µL de 1X DPBS (sin CaCl₂, sin MgCl₂ (GibcoBRL, cat # 14190-144)) a cada pocillo.

- 30 La disolución de calceína AM se prepara añadiendo 50 µg de cristal de calceína AM (p. m. = 994,87g/mol, Molecular Probes, Eugene, OR) y DMSO anhidro (Sigma Aldrich) para elaborar una disolución madre 1 mM y diluirla hasta la concentración final deseada de 2X en 1X DPBS. Justo antes del ensayo, se añaden 100 µL a los 100 µL de DPBS en los pocillos, y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se leyeron y registraron los datos de fluorescencia en un fluorímetro (Fluoroskan Ascent® FL (excitación ~485nm, emisión ~527nm)).

Se promedian los valores para réplicas (usualmente seis), y se calcula el % de inhibición de la siguiente manera:

- 35 **% de inhibición = 100 - [(tratamiento AVG - control positivo AVG)/(control negativo AVG - control positivo AVG)*100]**

En líneas celulares HUVEC, HS27 y LL-86, la citotoxicidad de 62 compuestos representativos en la Tabla 1, a una concentración de 5 µM y 25 µM, osciló de cero por ciento a 20%. La mayoría de las mediciones fueron de menos de 10%.

Ejemplo 41

- 40 INVASIÓN CELULAR EN EXTRACTO DE MATRIZ EXTRACELULAR MATRIGEL™

Este procedimiento se utiliza para determinar el efecto del compuesto sobre la invasión de células tumorales a través de inserciones de Fluoroblok™ recubiertas con Matrigel™. La invasión permite que las células tumorales se propaguen a sitios distintos que el tumor primario. El siguiente ensayo usa este sistema para determinar los efectos del compuesto sobre la invasión de células antitumorales a través de la capa de matriz extracelular Matrigel™.

- 45 Las líneas celulares utilizadas son HT 1080 (ATCC, Cat# CCL-121), DU-145 (ATCC, Cat# HTB-81), PC3 (ATCC, Cat# CRL-1435) o B16F1 (ATCC, Cat# CRL-6323).

El sistema de ensayo de invasión (BD Bioscience's BioCoat™ FluoroBlok™ Invasion System que incluye cámaras de invasión BD BioCoat™ Matrigel™ con la membrana de bloqueo de fluorescencia FluoroBlok™ 24-Multiwell insert System™) se extrae del paquete conservado a -20 °C y se deja entibiar a temperatura ambiente. Se añade PBS al

interior de las inserciones, y se dejan rehidratar durante 2 horas a 37 °C. Luego se extrae el medio y se añaden 450 µL de suspensiones celulares de células tumorales (desarrolladas hasta 50-70% confluencia, tripsinizadas y resuspendidas en medio sin suero a 1×10^6 /ml) a la parte superior de la cámara. Los compuestos de ensayo se añaden a la parte superior de la cámara a 10X la concentración final deseada en volúmenes de 50 µL. El DMSO actúa como el control.

Luego se añaden 750 µL de medio que contiene 50% medio de crecimiento fresco con 10% FBS y 50% medio acondicionado con NIH 3T3 a cada uno de los pocillos del fondo. El sistema de invasión se incuba durante 24 a 48 horas a 37 °C, en una atmosfera de CO₂ al 5%.

Tras la incubación, la placa de inserción se transfiere a una segunda placa de 24 pocillos que contiene 0,5 ml de 5 µg/ml calceína AM en disolución salina tamponada con Hanks (HBSS), y las placas se incuban por 1 hora a 37 °C, 5% CO₂.

Los datos de fluorescencia que indican la invasión celular se leen en un a Fluoroskan Ascent™ FL (LabSystems) con la lectura de fondo a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/538 nm.

Los datos se expresan como unidades de fluorescencia (FU) a partir de la suma de las 25 áreas medias por 24 pocillos, o como el porcentaje de inhibición de la invasión mediante la siguiente fórmula: % de inhibición de invasión = 100 - FU de invasión celular tratada con compuesto/FU de invasión celular tratada con DMSO*100.

Se ensayaron 21 compuestos representativos de la Tabla 1 en este ensayo, y el porcentaje de inhibición osciló entre 20 y 80%. Los compuestos son por lo tanto útiles para prevenir metástasis en cáncer y remodelación de tejido.

Ejemplo 42

LAS RESPUESTAS INFLAMATORIAS SON MODULADAS EN PRESENCIA DE COMPUESTOS - Creación de un panel de ensayo de inflamación.

Los macrófagos son elementos importantes de inmunidad innata para infección y están entre el primer tipo de células en la respuesta inmunitaria en exponerse y activarse por agentes infecciosos. IFN-γ y LPS son activadores potentes de los macrófagos, preparándolos para una diversidad de efectos biológicos. IFN-γ, inicialmente segregado por células NK y T en respuesta a infección, convierte a los macrófagos de un estado en reposo a uno activado, preparándolos para la actividad antimicrobiana manifestada por mayor exterminación de patógenos intracelulares, y procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos. La acción de IFN-γ se sinergiza con el segundo mensajero de LPS, potenciando la estimulación de macrófagos a través de la activación de NF-κB, que produce el aumento transcripcional de una serie de genes implicados en la respuesta inmunitaria mediada por las células, incluyendo óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Los macrófagos activados son cualitativamente distintos de los macrófagos latentes. Estas diferencias se observan típicamente por un índice mayor de proliferación, aumento de la expresión de MHCII y producción de diversas moléculas bioactivas. Estos últimos efectos biológicos son mediados por la liberación de óxido nítrico (NO) y el aumento en la producción de citocinas inflamatorias (IL-6, TNF-α, IL-1). Se utilizaron macrófagos primarios derivados de células de Balb/c y RAW 264.7 (fondo Balb/c) para establecer modelos inflamatorios *in vitro* con lecturas rápidas y confiables.

Materiales y métodos

1. Reactivos.

El inhibidor iNOS NG -monometil-L-arginina (L-NMMA) y rIFN-γ de murino se adquirieron de Calbiochem (San Diego, CA). Se adquirieron LPS libre de proteínas, extraído de fenol/agua (de serotipo E. coli 0111:84 0127:B8), Zymosan A, dexametasona e hidrocortisona, sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilenodiamina, de Sigma (St. Louis, MO). El factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano (VEGF) se adquirió de R& D Systems (Mineápolis, MN). Los anticuerpos iNOS/NOS de tipo II antimurino se obtuvieron de Transduction Laboratories (Lexington, KY). Se adquirieron ratones BALB/c hembra de 6-12 semanas de vida de Harlan Inc. (Indianápolis, IN) y se mantuvieron en cumplimiento con las normas del Consejo Canadiense sobre Cuidado Animal (*Canadian Council on Animal Care*).

2. Aislamiento de macrófagos de ratón primarios.

Se aislaron macrófagos de exudado peritoneal por lavaje peritoneal con disolución salina fisiológica estéril, enfriada con hielo, 24 horas después de una inyección intraperitoneal a los ratones BALB/c de 0,5 ml de Zymosan A estéril (1 mg/0,5 ml 0,9% disolución salina). Las células se lavaron, se resuspendieron en RPMI 1640 enriquecido con D-glucosa 1 mM, piruvato sódico 1mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 5% FBS.

3. Determinación de inhibición de liberación de IL-12.

Se activan macrófagos primarios murinos después de la incubación con LPS en presencia de dosis subóptimas de IFN-γ. Tras la activación, los macrófagos participan activamente en el inicio de la inflamación, liberando moléculas bioactivas que amplían la respuesta inflamatoria inicial. Los macrófagos estimulados demuestran el aumento de la

expresión de receptores MHCII, el aumento de liberación de NO, y producen una serie de citocinas inflamatorias que incluyen IL-12, IL-6, TNF- α , MIP-1 α y MIP-1 β .

En síntesis, los niveles de IL-12 en los sobrenadantes de macrófagos estimulados se determinaron con el kit de ELISA OptEIA™ de PharMingen desarrollado usando un anticuerpo IL-12 anti-ratón y IL-12 estándar de ratón (PharMingen). Se recubrieron tiras de múltiples pocillos Maxisorp™ F16 (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con captura Ab de IL-12 anti-ratón (en la concentración recomendada) en NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,5, 100 μ L/pocillo durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3X con 0,05% Tween 20 en PBS (PBST) y se bloquearon durante 1 h con 200 ml/pocillo de 10% FCS en PBS (tampón de bloqueo y dilución). Las placas se lavaron 3X con PBST, y las muestras duplicadas (100 μ L/pocillo) o los estándares (100 μ L/pocillo) en tampón diluyente se incubaron durante 2h. Las placas se lavaron cinco veces con PBST y se incubaron con IL-12 anti-ratón biotinilado y conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (en las concentraciones recomendadas por el fabricante) durante 1 h. Las placas se lavaron 7X con PBST, y se añadieron 100 μ L de disolución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina a cada pocillo. Después de 15-30 minutos de incubación a temperatura ambiente, finalizó el desarrollo de color con la adición de 50 μ L de H₂SO₄ 2 N. Se leyó la absorbancia a 450 nm con una lectora de microplacas EL 312e. El límite de detección para IL-12 fue 15,6 pg/ml.

Para el análisis de la medición de interleucina-12 en sobrenadantes de cultivo celular, véanse, p. ej., Skeen M.J., Miller M.A., Shinnick T.M., et al. J Immunol. (1996) 156(3):1196-206. Los resultados para el estudio de IL-12 se indican en la Tabla 2 para compuestos representativos

4. Determinación de inhibición de liberación de TNF α :

El macrófago primario murino se activará después de la incubación con LPS en presencia de dosis subóptimas de IFN- γ . Tras la activación, los macrófagos participan activamente en el inicio de la inflamación, liberando moléculas bioactivas que amplían la respuesta inflamatoria inicial. Los macrófagos activados demuestran el aumento en la expresión de receptores MHC-II, el aumento de liberación de NO, y producen una serie de citocinas inflamatorias que incluyen TNF- α .

Los niveles de TNF- α en los sobrenadantes de macrófagos estimulados se determinaron con el kit de TNF- α OptEIA (PharMingen). El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente, aproximadamente 21 ° C, a menos que se indique algo distinto.

Los micropocillos (módulo F8 MaxiSorp™ Loose/Nunc-Immuno; Gibco/BRL) se recubrieron con 100 μ L/pocillo de anticuerpo de captura (en la concentración recomendada) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron con 100 μ L/pocillo de tampón de lavado (0,05% Tween-20 en 1 X PBS) y se bloquearon durante 1 hora con 200 μ L/pocillo de tampón diluyente de ensayo (10% FBS en PBS 1X). Después se extrajo la disolución, y las placas se lavaron 5X con tampón de lavado.

El análisis de TNF- α se inició añadiendo muestras duplicadas (100 μ L/pocillo) o estándares (100 μ L/pocillo) en tampón diluyente, que se incubaron durante 2 horas. La disolución se extrajo y las placas se lavaron 5X con tampón de lavado. Se añadió a cada pocillo reactivo enzimático (100 μ L) que contenía anticuerpo monoclonal de TNF- α de ratón biotinilado y conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante (en las concentraciones recomendadas por el fabricante). La placa se incubó por 1 hora, se extrajo la disolución, y las placas se lavaron 7X con tampón de lavado. Finalmente, se añadió disolución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (100 μ L) a cada pocillo, y la placa se incubó en la oscuridad durante 15 a 30 minutos. Finalizó el desarrollo del color con la adición de 50 μ L de H₂SO₄ 2 N. La densidad óptica se midió a 450 nm con una lectora de microplacas EL 312e. El límite de detección para TNF- α fue 15,6 Pg/ml.

Los datos se representan como un porcentaje de inhibición de TNF- α mediante la siguiente fórmula: % inhibición de TNF- α = 100-(tratamiento AVG/control AVG DMSO)*100.

Para el análisis de la medición del Factor de Necrosis Tumoral (sobrenadantes de cultivo de tejido de TNF- α , véanse, p. ej., Drew, P.D., y J. Chavis, "Inhibition of Microglial Cell Activation by Cortisol" Brain Research Bulletin. (2000) 52(5):391-396; Drew, P.D., y J. Chavis "Female Sex Steroids: Effects Upon Microglial Cell Activation" J. Neuroimmunology. (2000) 111 (1-2):77-85. Los compuestos representativos de la presente invención y los compuestos comparativos se ensayaron en este estudio, y los resultados se exponen en la Tabla 2.

5. Determinación de inhibición de liberación de IFN γ :

Los linfocitos T obtenidos de bazos de ratones son una muestra adecuada para estudiar las propiedades de activación de este tipo de células inmunológicamente importantes. Los linfocitos T son los principales reguladores de inflamación. Concanavalina A (ConA) es un activador eficaz de los linfocitos T, que permite que los linfocitos T proliferen y produzcan citocinas inflamatorias, tales como Interferón (IFN γ) y citocinas reguladoras, tales como interleucina 10 (IL-10).

Aislamiento de linfocitos T de bazos de ratones

Se extirparon los bazo de ratones Balb/c, se dispusieron en 3 ml de RPMI 1640 libre de suero (Gibco/BRL) y se conservaron en hielo hasta estar listos para usar. Los bazo se transfirieron a un tamiz que contenía 10 ml de RPMI-5 enfriado con hielo (1 X piruvato sódico y 5% FBS) y se trituraron moderadamente con un mortero. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 1500 rpm durante 6 minutos a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron añadiendo 2 ml de tampón de lisis durante 1 minuto, y la reacción finalizó rápidamente por adición de 10 ml de RPMI-5. El sobrenadante se desechó, y el sedimento se lavó dos veces más. Las células se resuspendieron en RPMI-5, y se combinaron las suspensiones celulares. Las células se contaron y se ajustó su concentración hasta $2,8 \times 10^6$ células/ml, usando RPMI-5.

Estimulación y tratamiento de esplenocitos

Los esplenocitos aislados ($180 \mu\text{L}$ de $2,8 \times 10^6$ células/ml) se añadieron a placas de 96 pocillos para una concentración final de 5×10^5 células/pocillo. La concentración de trabajo de ConA fue $2,5 \mu\text{L}/\text{ml}$. Una concentración de trabajo de 20X de Concanavalina A fue $50 \mu\text{L}/\text{ml}$, preparada usando RPMI-5. Los compuestos de ensayo, control vehículo negativo de dimetilsulfóxido (DMSO) y control positivo de estaurosporina se diluyeron veinte veces usando RPMI-5. Se combinaron $10 \mu\text{L}$ de cada uno de DMSO y estaurosporina con $180 \mu\text{L}$ de medio que contenía esplenocitos en los pocillos, y se añadieron inmediatamente $10 \mu\text{L}$ de $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ de ConA. Se añadió medio sin ConA a los pocillos control. Para ensayar los compuestos en esplenocitos no estimulados, se añadieron $10 \mu\text{L}$ de RPMI-5 a cada pocillo en lugar de disolución de ConA. Las placas se incubaron a 37 °C en 5% CO₂ en condiciones humidificadas durante una noche (18-24 horas) para INF- γ .

Inmunoensayos enzimáticos para INF- γ de ratón

Al completar la estimulación anteriormente descrita, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes ($100 \mu\text{L}$) de cada pocillo se transfirieron a placas nuevas para análisis de INF γ por ELISA.

Los niveles de INF γ en los sobrenadantes de linfocitos estimulados se determinaron con el kit de INF γ OptEIA™ (PharMingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos, indicados en la Tabla 2 anterior, se representan como un porcentaje de inhibición de INF γ mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de INF}_{\gamma} = 100 - (\text{tratamiento AVG} / \text{control AVG DMSO}) * 100.$$

6. Medición de citotoxicidad por tinción MTS

Se determinó cuantitativamente la viabilidad celular subsiguiente a la exposición del compuesto empleando un ensayo citotóxico que usó sal de tetrazolio soluble [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna] (MTS). La disolución de MTS se preparó fresca y bajo luz baja. El reactivo de acoplamiento de electrones metosulfato de fenazina (PMS) se añadió al momento del ensayo. Se añadieron $20 \mu\text{L}$ de disolución de MTS por $100 \mu\text{L}$ de medio de cultivo celular a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas para esplenocitos no estimulados y 18-24 para esplenocitos estimulados con ConA. La absorbancia se leyó a 490 nm de longitud de onda. Un kit disponible para este ensayo es "CellTiter 96® AQueous Kit (G5421)" de Promega.

Se promedian los valores para cuatro réplicas, y se calcula el % de inhibición de la siguiente manera: % supervivencia = $100 - [(\text{tratamiento AVG} - \text{control positivo AVG}) / (\text{control negativo AVG} - \text{control positivo AVG}) * 100]$. Los resultados se indican en la Tabla 2.

Para el análisis de la medición de INF γ en sobrenadantes de cultivo de tejido, véanse, p. ej., Uzonna, J., Kaushik, R., Gordon, J., y Tabel, H. J. Immuno. (1998), 169:5507-5515; Xi S., Cohen D., y Chen L. J. of Lipid Research. (1998), 39, 1677-1687. Información de producto, kit de viabilidad/citotoxicidad "LIVE/DEAD® (L-3224)" de Molecular Probes (revisado el 24 de enero de 2001).

7. Inhibición de liberación de MCP-1

La activación de células endoteliales por TNF- α de citocinas proinflamatorias conduce a la producción de varias quimiocinas. La liberación de estas quimiocinas cumple una función importante en el tráfico de leucocitos y la extravasación de leucocitos hacia el tejido durante la inflamación. MCP-1 e IL-8 están entre las quimiocinas liberadas tras la estimulación de células endoteliales humanas (HUVEC) por parte de TNF α , y contribuyen a la migración de monocitos hacia los sitios de inflamación. Las células no deberían propagarse más de 6 pasajes.

Se mantuvieron y desarrollaron células en matraces de cultivo de tejido (T75) en medio de crecimiento de células endoteliales (EGM, Clonetics) que contenían 5 complementos adicionales (EG M-5) en medio [factor de crecimiento endotelial recombinante humano (hEG F), hidrocortisona (HC), extracto de cerebro bovino (BBE), suero bovino fetal (FBS) y Gentamicina (G A)]. Se incubaron a 37 °C, 5% CO₂. Las células deberían propagarse a un máximo de 20 pasajes.

Las células se tripsinizaron (0,25%), se recogieron de los matraces de cultivo de tejido, se centrifugaron, se resuspendieron en EGM-5 y se contaron. La concentración de células se ajustó hasta $2,2 \times 10^4$ células/ml con medio EGM-5. Se sembraron las HUVEC a $180 \mu\text{L}$ de $2,2 \times 10^4$ células/ml en placas de 96 pocillos para una densidad de

siembra final de 4.000 células/pocillo. Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C, 5% CO₂ para permitir que las células se adhirieran y crecieran.

La concentración de trabajo de TNFα fue 1.000 pg/ml. Una concentración de trabajo de veinte veces de TNFα fue 20.000 pg/ml, preparada usando EGM-5. Los compuestos de ensayo, control vehículo negativo de DMSO y control positivo de estaurosporina se diluyeron 20X usando EGM-5. Se combinaron 10 µL de cada uno de los compuestos, DMSO y estaurosporina con 180 µl de medio que contenía células HUVEC. Inmediatamente después de la adición de los compuestos, se añadieron a los pocillos 10 µl de 50 µg/ml de TNFα. Se añadió medio sin TNFα a los pocillos control. Para ensayar los compuestos en células HUVEC no estimuladas, se añadieron 10 µl de EGM-5 a cada pocillo en lugar de disolución de TNFα. Las placas se incubaron a 37 °C en 5% CO₂ en condiciones humidificadas durante la noche (18-24 horas) para TNFα.

Al completar la estimulación, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes de cada pocillo se transfirieron a placas nuevas para análisis de MCP1 por ELISA.

Los niveles de TNFα en los sobrenadantes de linfocitos no estimulados se determinaron con el kit de MCP1 OptEIA™ (PharMingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densidad óptica se midió a 450 nm con una lectora de microplacas EL312e. El límite de detección para MCP1 fue 15,6 pg/ml.

Los datos se representan como un porcentaje de inhibición de MCP1 mediante la siguiente fórmula: % inhibición de MCP1 = 100-(tratamiento AVG/control AVG DMSO)*100. Los resultados se exponen en la Tabla 2.

Para análisis de la medición de MCP1 en sobrenadantes de cultivo de tejido, véanse, p. ej., Kalogeris T.J., Laroux F.S., Cockrell A. et al. Am J Physiol. 276 (4 Pt 1):C856-864; instrucciones provistas por el lote de MCP-1 humano OptEIA (PharMingen, Cat# 555179).

La medición de la citotoxicidad por tinción de MTS se realizó como anteriormente.

Se promedian los valores de las réplicas, y se calcula el % de inhibición de la siguiente manera:

$$\% \text{ supervivencia} = 100 - [(\text{tratamiento AVG} - \text{control positivo AVG}) / (\text{control negativo AVG} - \text{control positivo AVG}) * 100].$$

Los resultados se indican en la Tabla 2.

Tabla2: CI₅₀ de los compuestos en macrófagos y esplenocitos estimulados

Nombre químico	IFNγ en esplenocitos ConA 1° (µM)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNFα en macrófagos (µM)	IL-12 en macrófagos (µM)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (µM)
(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-[2-(1H-imidazol-4-il)-etil]-amina	8,4 uM	>25	11,76 uM	8,1 uM	14,5 uM	21,3 uM
[2-(3-Amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-il]-metanol	2,026	>25				
Amida de ácido 2-(1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	10,3 uM	>25				
Amida de ácido 2-(3-amino-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	2,126	>25				

Nombre químico	IFN γ en esplenocitos ConA 1° (μ M)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNF α en macrófagos (μ M)	IL-12 en macrófagos (μ m)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (μ M)
Amida de ácido 2-(3-amino-5- metil-1H-pirazol- 4-il)-4,5,6- trifluoro- benzotiazol-7- sulfónico	1,9 μ M	10,2 μ M				
Éster metílico de ácido de ácido 2- (3-amino-5-metil- 1H-pirazol-4-il)-5- fluoro- benzotiazol-6- carboxílico	1,03	>25				
Metilamida de ácido 2-(3-amino- 5-metil-1H- pirazol-4-il)-5- fluoro- benzotiazol-6- sulfónico	0,368 μ M	11,6 μ M				
Metilamida de ácido 2-(3-amino- 5-metil-1H- pirazol-4-il)- benzotiazol-6- sulfónico	0,8 μ M	23,0	1,5	1,6	6,4	4,2
2-(3-Metil-1H- pirazol-4-il)- benzotiazol	21,4 μ M	N	>25	12,4	>25	>25
Metilamida de ácido 2-(5-amino- 1H-pirazol-4-il)- benzotiazol-6- sulfónico	2,461	>25				
Amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-4- fluorobenzotiazol- 6-sulfónico	3,2 μ M	>25	6,6 μ M	11,7 μ M	>25	>25
(2-Hidroxi-etil)- amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-5-fluoro- benzotiazol-4- sulfónico	8,9 μ M	>25	5,204 μ M	12,4 μ M	>25	>25

ES 2 385 378 T3

Nombre químico	IFN γ en esplenocitos ConA 1° (μ M)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNF α en macrófagos (μ M)	IL-12 en macrófagos (μ m)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (μ M)
Amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-5-fluoro- benzotiazol-6- sulfónico	1 μ M	15,1 μ M	0,9 μ M	2,7 μ M	6,7 μ M	2,7 μ M
(2-Hidroxi-etil)- amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-5-fluoro- benzotiazol-6- sulfónico	3,4 μ M	\ 25	2,0 μ M	4,8 μ M	14,597 μ M	9,0 μ M
(Piridin-4-ilmetil)- amida de ácido 2-(6-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)5-fluoro- benzotiazol-6- sulfónico	3,3 μ M	14,8 μ M	4,4 μ M	6,9 μ M	23,4 μ M	11,7 μ M
2-(5-Amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 5-ol	11,2 μ M	>25	7,6 μ M	5,5 μ M	>25	N
Amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 6-carboxílico	4,7 μ M	>25	8,0 μ M	9,6 μ M	>25	16,2 μ M
(2-Metoxi-etil)- amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 6-sulfónico	6,9 μ M	N		10,6 μ M	>25	14,2 μ M
[2-(4-Amino- fenil)etil]-amida de ácido 2-(5- amino-3-metil- 1H-pirazol-4-il)- benzotiazol-6- sulfónico	5,4 μ M	>25	21,7 μ M	7,8 μ M	>25	14,5 μ M
(Piridin-4-ilmetil)- amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 6-sulfónico	1,5 μ M	3,8 μ M	3,3 μ M	2,1 μ M	9,7 μ M	6,3 μ M

Nombre químico	IFN γ en esplenocitos ConA 1° (μ M)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNF α en macrófagos (μ M)	IL-12 en macrófagos (μ M)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (μ M)
Amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 6-sulfónico	2,8 μ M	>25	3,9	3,4	7,0	12,4
(2,2,2-Trifluoro- etil)-amida de ácido 2-(5-amino- 3-metil-1H- pirazol-4-il)- benzotiazol-6- sulfónico	3,7 μ M	23,1 μ M	5,6 μ M	3,0 μ M	14,7 μ M	5,9 μ M
(2-Hidroxi-etil)- amida de ácido 2-(5-amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 6-sulfónico	3,5 μ M	>25	6,13 μ M	5,8 μ M	14,8 μ M	11,9 μ M
(2-Dimetilamino- etil)-amida de ácido 2-(5-amino- 3-metil-1H- pirazol-4-il)- benzotiazol-6- sulfónico	10,8 μ M	>25	7,9 μ M	5,1 μ M	>25	14,9 μ M
Amida de ácido 2-(5-amino-3- piridin-4-il-1H- pirazol-4-il)- benzotiazol-6- sulfónico	11,7 μ M	>25	13,2 μ M	17,7 μ M	>25	>25
2-[[2-(5-Amino-3- metil-1H-pirazol- 4-il)-benzotiazol- 6-ilmetil]-amino]- etanol	8,1 μ M	20,1 μ M				
3-(5-Amino-4- benzotiazol-2-il- 1H-pirazol-3-il)- propan-1-ol	10,3 μ M	N	>25	14,0 μ M	N	>25
3-(5-Amino-4- benzotiazol-2-il- 1H-pirazol-3- ilamino)-propan- 1-ol	9,4 μ M	>25	18,2 μ M	10,6 μ M	>25	17,3 μ M
4-(5-Fluoro-6- metoxi- benzotiazol-2-il)- 5-isoxazol-5-il- 2H-pirazol-3- ilamina	2,028	22,803				

Nombre químico	IFN γ en esplenocitos ConA 1° (μ M)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNF α en macrófagos (μ M)	IL-12 en macrófagos (μ M)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (μ M)
4-(5-Fluoro-6-metoxi - benzotiazol-2-il)- 5-metil-1H- pirazol-3-ilamina	1,9 μ M	24,5 μ M	10,9 μ M	5,2 μ M	>25	5,6 μ M
4-(5-Fluoro-6-metoxiy- benzotiazol-2-il)- 5-piperazin-1-il- 2H-pirazol-3-ilamina	6,1 μ M	17,5 μ M	14,7 μ M	23,4 μ M	>25	10,9 μ M
4-(5-Fluoro-6-metoxi- benzotiazol-2-il)- 5-piridin-4-il-2H- pirazol-3-ilamina	1,4 μ M	>25	>25	7,7 μ M	>25	>25
4-(5-Fluoro-6-metoxi- benzotiazol-2-il)- N3-[2-(3H- imidazol-4-il)- etil]-1H-pirazol- 3,5-diamina	16,6 μ M	>25				
4-(5-Fluoro-6-metil-benzotiazol- 2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	>25	>25				
4-(5-Fluoro-6-metil-benzotiazol- 2-il)-5-metil-2H- pirazol-3-ilamina	7,822	>25				
4-(5-Fluoro- benzotiazol-2-il)- 5-metil-2H- pirazol-3-ilamina	10,3 μ M	22,6 μ M	10,7 μ M	5,0 μ M	20,7 μ M	18,5 μ M
4-(6- Clorobenzotiazol- 2-il)-5-metil-2H- pirazol-3-ilamina	5,6 μ M	>25	>25	7,6 μ M	16,7 μ M	7,3 μ M
4-(6- Dimetilaminometi l-5-fluoro- banzotiazol-2-il)- 5-metil-1H- pirazol-3-ilamina	2,351	>25				

ES 2 385 378 T3

Nombre químico	IFNg en esplenocitos ConA 1° (µM)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNFα en macrófagos (µM)	IL-12 en macrófagos (µM)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (µM)
4-(6-Dimetilaminometil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	1,5 uM	19,1 uM				
4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	11,6 uM	N	>25	13,9 uM	>25	>25
4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	2,8 uM	>25	18,5	10,1	21,1	24,5
4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina	5,9 uM	20,5 uM				
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamina	12,6uM	N		7,6		
4-Benzotiazol-2-il-5-(3-dimetilamino-propil)-2H-pirazol-3-ilamina	13 uM	~ 25				
4-Benzotiazol-2-il-5-(3-metilamino-propil)-2H-pirazol-3-ilamina	9,1 uM	24,6 uM				14,8 uM
4-Benzotiazol-2-il-5-(4-dimetilamnino-butil)-2H-pirazol-3-ilamina	16,4 uM	23,6 uM				
4-Benzotiazol-2-il-5-(4-metilamino-butil)-2H-pirazol-3-ilamina	11,3 uM	~25				
4-Benzotiazol-2-il-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina	7,9 uM	22,112 uM	>25	16,1 uM	>25	16,2 uM

Nombre químico	IFN γ en esplenocitos ConA 1° (μ M)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNF α en macrófagos (μ M)	IL-12 en macrófagos (μ m)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (μ M)
4-Benzotiazol-2-il-5-piridin-4-il-2H-pirazol-3-ilamina	2,3 μ M	>25	5,1	\ 25	>25	18,5
4-Benzotiazol-2-il-N ³ -(3-dimetilamino-propil)-1H-pirazol-3,5-diamina	5,7 μ M	>25	N	13,2 μ M	>25	12,8 μ M
5-(3-Amino-propil)-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	7,0 μ M	22,8 μ M	13,2 μ M	17,3 μ M	18,9 μ M	10,8 μ M
5-(4-Amino-fenil)-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	1,0 μ M	21,5	4,3	2,3	21,3	17,7
5-Metil-4-(4,5,6-trifluoro-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	18,3 μ M	>25				
5-Metil-4-(6-metilaminometil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	,5 μ M	0,9 μ M				
3-Metil-4-(6-morfolin-4-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina	3,8 μ M	>25				
N-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-acetamida	9,9 μ M	>25	18,442 μ M	7,7 μ M	18,4 μ M	12,6 μ M
N3-(2-Amino-etil)-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	16,6 μ M	>25	23,9 μ m	N	>25	>25

Nombre químico	IFN γ en esplenocitos ConA 1° (μ M)	Supervivencia de esplenocitos ConA 1°	TNF α en macrófagos (μ M)	IL-12 en macrófagos (μ M)	Supervivencia de macrófagos	MCP1 en HUVEC (μ M)
N3-(2-Dimetilamino-etil)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina	11,0 μ M	>25	17,147 μ M	>25	>25	>25
N ³ -(3-Dimetilamino-propil)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina	10,2 μ M	-25				

7. Inhibición de óxido nítrico

Se aislaron macrófagos de exudado peritoneal por lavaje peritoneal con disolución salina fisiológica, estéril enfriada con hielo, 24 horas después de una inyección intraperitoneal a ratones BALB/c con 0,3 ml de zymosan A estéril (1 mg/0,5 ml 0,9% disolución salina). Las células se lavaron, se resuspendieron en RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina y 5% FBS. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 96 pocillos, y después de incubar durante 3 horas a 37 °C con 5% CO₂ (se dejó adherir los macrófagos), las células se estimularon con LPS (0,5 mg/ml) e IFN- γ (100 U/ml) en ausencia o presencia de los compuestos de ensayo. Todos los tratamientos se replicaron seis veces. Las células se incubaron durante 24 horas más, y se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular de cada pocillo para determinación de NO y citocinas. Las células restantes se tiñeron con cristal violeta para determinar el efecto del compuesto sobre la supervivencia de las células.

Para análisis de la estimulación de macrófagos peritoneales de ratón primarios para determinación de NO y citocinas véanse, p. ej., Calandra T., Spiegel L.A., Metz C.N., y Bucala R. Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95(19): 11383-8; Lu L., Bonham C.A., Chambers F.G, et al. J Immunol. (1996) 157(8):3577-86; Keil D.E., Luebke R.W., y Pruett S.B. Int J Immunopharmacol (1995) 17(3):157-66; y Skeen M.J., Miller M.A., Shinnick T.M., et al. J Immunol. (1996) 156(3): 1196-206.

En el ensayo de compuestos representativos, la liberación de IFN γ de esplenocitos se inhibió en comparación con los controles. Véase la Tabla 2, arriba.

Determinación de la inhibición de liberación de NO:

La producción de NO se determinó ensayando sobrenadantes de cultivo para NO₂⁻, un producto de reacción estable de NO con oxígeno molecular. En síntesis, se hicieron reaccionar 100 μ L de sobrenadante de cultivo con un volumen equivalente de reactivo de Griess a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se determinó la absorbancia a 550 nm. Todas las mediciones se realizaron seis veces. Se calculó la concentración de NO₂⁻ por comparación con una curva estándar preparada usando NaNO₂.

Para análisis de medición de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de tejido, véanse, p. ej., Amano F., y Noda T. "Improved detection of nitric oxide radical (NO) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent" FEBS Lett. (1995) 368(3): 425-8; Archer S. "Measurement of Nitric oxide in biological models" (1993) FASEBJ. 7:349-360, y Amin A.R. "Regulation of nitric oxide and prostaglandin E2 production by CSAIDS (SB203580) in murine macrophages and bovine chondrocytes stimulated with LPS" Inflamm Res. (1999) 48 (6):337-43.

La tabla siguiente incluye compuestos que son representativos de la presente invención y compuestos que se incluyen para fines comparativos solamente.

Tabla 3: Porcentaje de inhibición de óxido nítrico en macrófagos estimulados a 25 μ m para compuestos representativos

Nombre químico	% inhibición
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	100
2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-ciclopentanol	78,6
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-6-etil-benceno-1,3-diol	99,3
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-fenol	69,6
4-(6-Bromo-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	100
4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	61,5
4-(6-Metanosulfonil-benzotiazol-2-il)-metil-2H-pirazol-3-ilamina	52,9
4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	100
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	53,6
4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	96,4
4-Benzotiazol-2-il-5-metilsulfanil-1H-pirazol-3-ilamina	69,2
4-Benzotiazol-2-il-5-fenil-1H-pirazol-3-ilamina	76,7
4-Benzotiazol-2-il-5-pirrolidin-1-il-1H-pirazol-3-ilamina	52,6
4-Benzotiazol-2-il-N ⁵ -quinolin-6-il-1H-pirazol-3,5-diamina	66,1

Ejemplo 43

ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO*

- 5 Angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos de endotelio pre-existente, es un proceso crítico implicado en numerosos cuadros fisiológicos y patológicos. La ruptura de este proceso firmemente regulado ha estado implicada tanto en inflamación crónica como en el crecimiento de tumores sólidos. El ensayo de morfogénesis Matrigel™ es un modelo *in vitro* utilizado para imitar el proceso mediante el cual las células endoteliales forman capilares *in vivo*. Se dispusieron en placas células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) sobre matrigel, una mezcla compleja de componentes de membrana basal solubilizados, y se cultivaron en medio con poco suero con factores de crecimiento específicos y en presencia de compuesto de ensayo. Las células HUVEC cultivadas durante 24 horas en M199 con 0,5% FCS se dispusieron en placas a 6 x 10⁵ células/pocillo en placas de 12 pocillos pre-recubiertas con 300 μ L de Matrigel (10,7 mg/ml) en M199 con 0,5% FCS en presencia de VEGF (1 ng/ml), y en ausencia o presencia de los compuestos de ensayo. Después de 5 horas de incubación en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ a 37 °C, la organización tridimensional de las células (las estructuras de tipo capilar) se examinó usando un fotomicroscopio invertido. Las células se fijaron con cristal violeta (0,05% en 20% etanol) y se fotografiaron utilizando una cámara digital. El análisis cualitativo se logró comparando el patrón, el tamaño y la integridad de los vasos formados en los pocillos de ensayo con aquellos de los pocillos control VEGF. Se realizó el análisis cuantitativo sobre las imágenes recogidas usando el programa de software Image-Pro Plus. Véase la Tabla 4 para resultados con los compuestos seleccionados.

Para un mayor análisis con respecto al ensayo de angiogénesis *in vitro*, véanse, p. ej., Grant D.S., Lelkes P.I., Fukuda K., y Kleinman H.K. "Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro" *In Vitro Cell Dev Biol.* (1991) 27A(4):327-36; Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R., y Lawley T.J. "Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures" *J Cell Biol.* (1988) 107(4):1589-98; Passaniti A., Tailor R.M., Pill R., et al. "A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor" (1992) *Lab. Invest.* 67:519-528. Los primeros dos compuestos en la tabla siguiente se incluyen para fines comparativos solamente.

TABLA 4: Porcentaje de inhibición de angiogénesis

Nombre químico	% Inhibición
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	32
4-Benzotiazol-2-il-5-pirrolidin-1-il-1H-pirazol-3-ilamina	50
4-Benzotiazol-2-il-5-metilsulfanil-1H-pirazol-3-ilamina	84
4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	64

Ejemplo 44

ENSAYO DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

- 5 Se realizó un ensayo de migración de células tumorales en un modo similar al descrito en el Ejemplo 16, excepto que las placas utilizadas se construyeron con solamente una membrana porosa que dividía una cámara superior y una inferior sin la capa delgada adicional Matrigel™ en la parte superior de la membrana (placas BD Fluoroblock™). Se determinó el porcentaje de inhibición de migración en el mismo modo que se ilustró en el Ejemplo 16.

- 10 Véanse, p. ej., Crouch M.F. (2000) "An automated fluorescence based assay of neurite formation" J Neurosci Methods 104(1):87-91; y Repesh L.A. (1989) "A new In vitro assay for quantitating tumor cell invasion" Invasion Metastasis 9(3):192-208 para un análisis más sobre ensayos de invasión y migración.

Los compuestos 7, 8, 12, 15-20 son representativos de la presente invención, y el resto de los compuestos se ensayan para fines comparativos solamente. Estos compuestos se ensayaron, y los resultados se indican en la Tabla 5.

TABLA 5: Porcentaje de inhibición de migración en células PC3 a 25 µM de compuesto

Nombre del compuesto	% Inhibición
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-6-etil-benceno-1,3-diol	80,0
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-benceno-1,3-diol	44,8
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamina	26,3
4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina	27,9
4-Benzotiazol-2-il-N ⁵ -etil-1H-pirazol-3,5-diamina	61,5
4-Benzotiazol-2-il-5-pirrolidin-1-il-1H-pirazol-3-ilamina	47,4
4-Benzotiazol-2-il-5-metilsulfanil-1H-pirazol-3-ilamina	51,6
4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	41,7
4-(4-Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-fenol	50,9
2-(Benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-il)-fenol	17,1
4-(5-Trifluorometil-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina	56,1
4-Benzotiazol-2-il-5-etil-1H-pirazol-3-ilamina	54,2
4-Benzotiazol-2-il-N ⁵ -quinolin-6-il-1H-pirazol-3,5-diamina	81,0
2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-ciclopentanol	23,1
4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	79,4
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	16,7
4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina	45,3
Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	30,5
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	42,9

Nombre del compuesto	% Inhibición
(2-Hidroxi-etil)-amida de ácido -(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	38,9

Ejemplo 45

MODELO DE DERMATITIS DE CONTACTO IRRITANTE (ICD)

Se usaron ratones Baib/c (H2-d) hembra en este experimento (n = 8). Se indujo ICD con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), 4 µg/oreja (en 20 µL de acetona). Se usó dexametasona como control positivo (0,5 mg/kg) y se administró s.c. en un volumen de 50 ml antes de la irritación. El irritante se pintó en el lado dorsal del pabellón auditivo del oído derecho. Los compuestos de ensayo se administraron por gavaje oral en una dosis entre 50-300 mg/kg (10 ml/kg). Se midió el espesor de la oreja con un micrómetro de dial cargado por resorte antes de la irritación y 3, 6 y 24 horas después de pintar el irritante. La eficacia del efecto antiinflamatorio de los compuestos de ensayo se determinó por comparación del espesor de la oreja inflamada y la oreja control.

Ejemplo 46

MODELO DE PULMÓN ORTOTÓPICO

Se cosecharon células de carcinoma de células grandes de pulmón humano NCI-H460 por tripsinización y se ajustaron hasta una concentración final de 1×10^6 células/80 ml. A ratas macho atímicas (CR:NIH-RNU) se les implantaron por vía endobraquial 1×10^6 células tumorales, usando un catéter de Teflon™ de 2 pulgadas, calibre 20 que se pasó hacia el lóbulo caudal derecho mediante una pequeña incisión de traqueotomía.

Implantación de fragmentos de tumor. Las ratas que presentaban estos tumores se sacrificaron tres semanas después de la implantación, y se cosecharon sus tumores en RPMI 1640 frío. El tumor viable se cortó en piezas de 1-2 mm de diámetro con la técnica de "bisturíes cruzados". Se dispuso una porción de 50 mg en un catéter de Teflon™ de 2 pulgadas, calibre 16 y se implantó en ratas macho atímicas de 6 semanas de vida usando una técnica similar. Los animales se trataron con complemento de Augmentin™ a 0,35 mg/ml en agua durante 2 semanas.

Se preparó un compuesto de ensayo nuevo cada día, disolviéndolo en un recipiente aceptable a 10 mg/ml bajo condiciones estériles. Se obtuvo una inyección de cisplatino, 1 mg/ml, de la farmacia del hospital.

Hubo cuatro ramas en el estudio: control; compuesto de ensayo solo; cisplatino solo; combinación del compuesto de ensayo y cisplatino. Además, hubo dos grupos en el estudio: en el grupo I, todos los animales recibieron seguimiento hasta la muerte para determinar la longitud máxima de supervivencia, y en el grupo II, todos los animales fueron sacrificados simultáneamente de cada brazo de tratamiento ya que los animales control se tornaron intensamente caquéticos o murieron. Esto nos permite comparar directamente, en el mismo punto de tiempo, los efectos terapéuticos de cada brazo del estudio sobre los criterios de valoración relacionados con el tumor, como peso del tumor primario, relación tumor/peso corporal, peso y patrón metastásico del ganglio linfático del mediastino. También se examinaron las funciones renal y hepática de cada animal por bioquímica sérica para determinar posibles toxicidades.

Tanto el compuesto de ensayo (5 mg diarios) como el cisplatino (5 mg/kg semanales durante 3 semanas) se administraron por inyección intraperitoneal. El tratamiento continuó 7 días y 14 días post-implantación para el compuesto de ensayo y el cisplatino, respectivamente. Los animales fueron sacrificados cuando exhibieron signos de morbilidad significativa o muerte inminente. En la autopsia, se extirparon los bloques corazón-pulmón, riñón, cerebro y pared del tórax, se cortaron en serie, se tiñeron y se examinaron en un modo ciego por un patólogo.

El análisis estadístico de longitud de supervivencia, tumor primario, peso corporal y peso del ganglio linfático del mediastino se evaluaron usando ANOVA o prueba de la t de Student para datos independientes. La incidencia de metástasis se evaluó usando una tabla de contingencia con la prueba exacta de Fisher. Las diferencias de $P < 0,05$ se consideraron significativas.

Inmunohistoquímica. Se sembró la línea celular H-460 en portaobjetos de 8 cámaras (104 células/pocillo) y se trató con 25 µM del compuesto de ensayo después de alcanzar una confluencia de 60 a 80%. Las células se cosecharon 2, 4, 8 y 24 horas después del tratamiento y se incubaron durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios. Para expresión de Akt/PKB fosforilado se usó antifosfo-Akt/PKB (Ser-473), a una concentración de 2 µg/ml, seguida por incubación con el anticuerpo secundario, IgG de conejo biotinilada a una concentración de 7 µg/ml. Para expresión de GSK-3β fosforilado, se usó anti-fosfo-GSK-3β (Ser-9), a una concentración de 6 µg/ml, seguida por incubación con el mismo anticuerpo secundario. Se usó estreptavidinperoxidasa como sistema de detección. Se usó DAB como cromógeno, y la contratinción se realizó con hematoxilina. Se evaluaron los portaobjetos o bien como negativos o como positivos de acuerdo con la cantidad e intensidad de tinción. La reactividad de fosfo-Akt/PKB y fosfo-GSK-3β se cuantificó por análisis de imágenes computarizadas, usando un sistema Image-Pro™ y microscopía de luz convencional.

Ejemplo 47

LA EXPRESIÓN DE ILK ES ALTA EN PIEL PSORIÁSICA HUMANA, EN COMPARACIÓN CON PIEL NORMAL

El espesor de la capa epidérmica dentro de placas psoriásicas es mucho mayor que en la piel normal de personas sanas o que en la piel no comprometida de pacientes que experimentan psoriasis.

- 5 Para ensayar la expresión de ILK, se obtuvieron muestras de piel de un sujeto humano con piel sana y de pacientes que padecían psoriasis inmunitaria. Las preparaciones de piel se procesaron usando técnicas de fijación con formalina y embebido en parafina de rutina. Se realizaron los cortes y se trataron con metodología de recuperación de antígenos, luego se tiñeron con un anticuerpo policlonal anti-ILK de conejo (catálogo# 06-592, Upstate Biotechnology, Lake Placid NY). Los cortes luego se incubaron con anticuerpo policlonal anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa. Los portaobjetos se revelaron luego empleando técnicas convencionales.

- 10 En piel normal, se observó un bajo nivel de expresión de ILK en las capas supra-basales de los queratinocitos de la piel. Estas capas supra-basales de queratinocitos de la piel estaban prácticamente seguro sufriendo el proceso de diferenciación terminal. La intensidad de la tinción para ILK fue más intensa para queratinocitos próximos a la capa de queratina externa. Se observó poca o ninguna tinción de ILK en el endotelio vascular dérmico. En contraste, la tinción de ILK fue altamente intensa en queratinocitos hiperproliferativos dentro de las placas de pacientes con psoriasis. Dentro de la región dérmica de placas de pacientes con psoriasis, las células que comprenden la vasculatura se tiñeron fuertemente para ILK. Asimismo, algunas de las células inflamatorias presentes dentro de la región dérmica se tiñeron positivamente para ILK. En general, con contraste con la piel normal, la ILK se expresó en niveles muy superiores dentro de las regiones epidérmica y dérmica dentro de las placas de pacientes que padecen psoriasis.

Ejemplo 48

LA EXPRESIÓN DE ILK EN TEJIDO PSORIÁSICO SE CORRELACIONA CON LA INTENSIDAD DE LA ENFERMEDAD

- 25 Se evaluó la expresión de ILK dentro de piel psoriásica en una serie de muestras de biopsia de placa obtenidas de un paciente durante un periodo de 3 meses. La presencia y el patrón de expresión de ILK se evaluaron por análisis inmunohistológico. Todos los cortes se tiñeron al mismo tiempo. Para psoriasis, el estado de enfermedad puede medirse por el espesor relativo de la epidermis. Para la serie de muestras de biopsia evaluadas, los niveles de expresión de ILK fueron prácticamente paralelos al estado de enfermedad de psoriasis a nivel del tejido.

- 30 La primera muestra (panel A), se obtuvo en la evaluación inicial, mientras el paciente estaba cursando la enfermedad activa. La tinción para ILK fue intensa en los queratinocitos dentro de la placa diana. Dentro de la región dérmica de la placa, las células dentro de la vasculatura, como también las células que habían infiltrado la región, también se tiñeron fuertemente para ILK. La segunda muestra (panel B) se obtuvo un mes más tarde, en un momento en que la actividad de la enfermedad se había intensificado. La intensidad de la tinción de ILK con esta muestra fue mucho mayor que con la primera muestra. La tercera muestra se tomó aproximadamente 4 semanas después de la muestra B, en un momento durante el cual el paciente exhibía una mejoría en la enfermedad y una reducción del espesor epidérmico. Para esta muestra (panel C), hubo una reducción correspondiente en la intensidad de tinción para ILK, tanto en los queratinocitos epidérmicos como dentro de las células de la vasculatura dérmica. La muestra 4 se obtuvo 3 meses después de la muestra 1, en un momento en que el paciente experimentaba una exacerbación en la actividad de la enfermedad. El espesor epidérmico para la muestra 4 fue mayor que aquel de la muestra 3. En este momento, se observó un incremento en la actividad de tinción para ILK dentro de la vasculatura dérmica y el infiltrado celular, como también en los queratinocitos epidérmicos (panel D). Por lo tanto, los niveles de expresión de ILK dentro de la placa psoriásica variaron con la actividad de la enfermedad donde la alta expresión de ILK se correlacionó con los síntomas de la enfermedad activa.

Ejemplo 49

- 45 EL COMPUESTO ANTI-ILK INHIBE LA AFLUENCIA DE NEUTRÓFILOS HACIA EL SITIO DE INFLAMACIÓN

- La administración de ciertos agentes pro-inflamatorios, tales como zymosan, a la cavidad peritoneal de ratones, produce una rápida afluencia de neutrófilos hacia esta región. La migración de estas células hacia la cavidad peritoneal requiere la interacción coordinada de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular. Dicho sistema puede utilizarse para evaluar la acción de los compuestos con potencial de modificar la migración de las células en respuesta a estímulos pro-inflamatorios.

- 50 Cuando se administró zymosan a ratones, los números de neutrófilos en la cavidad peritoneal aumentaron aproximadamente 4 veces en 4 horas. No obstante, si un compuesto de la invención se administró por vía oral a 200 mg/kg al momento de la administración de zymosan, los números de células dentro de la cavidad peritoneal fueron equivalentes a aquellos de animales que habían recibido un disolvente control de disolución salina 4 horas antes.
- 55 Por lo tanto, un compuesto con actividad *in vitro* anti-ILK específica puede afectar la influencia de células hacia un tejido después de la administración de una fuerte señal pro-inflamatoria *in vivo*.

Para un análisis de modelos de inflamación aguda, incluyendo dermatitis de contacto irritante (ICD) y dermatitis de contacto alérgica (ACD), véanse, p. ej., Artik S., von Vultee C., Gleichmann E., Schwarz T., y Griem P. "Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states" J. Immunol. (1999) 163(3):1143-52; Becker D., Lempertz U., Enk A., Saloga J., y Knop J. "Contact sensitizers modulate mechanisms of receptor-mediated endocytosis but not fluid-phase endocytosis in murine epidermal Langerhans cells" Exp. Dermatol. (1995) 4(4 Pt 1):211-7; Griswold D.E., Martin L.D., Badger A.M., Breton J., y Chabot-Fletcher M. "Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of azaspranes" Inflamm. Res. (1998) 47(2):56-61; y Moreno J.J. "Effect of retinoids on dermal inflammation and on arachidonic acid mobilization and metabolism in murine 3T6 fibroblasts retinoids, arachidonate release and metabolism" Int. J Immunopharmacol. (1996) 18(8-9):459-65.

10 Ejemplo 50

DEMOSTRACIÓN DE INHIBICIÓN DE ILK COMO INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA EN NEFROPATÍAS

Modelo de podocito murino *in vitro*

1. Ensayo de supervivencia en podocitos

15 El tratamiento de células epiteliales viscerales glomerulares (podocitos) con altas concentraciones de puromicina aminonucleósido (PAN) causa efectos citotóxicos importantes. Una evaluación de la viabilidad celular subsiguiente a una exposición citotóxica puede juzgarse cualitativamente examinando los cambios en el fenotipo celular después de la tinción con cristal violeta, o puede determinarse cuantitativamente empleando un ensayo citotóxico que usa la sal de tetrazolio soluble [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna] (MTS). Dicho sistema puede emplearse para evaluar los efectos de supervivencia que tienen los compuestos de ILK sobre los podocitos después de la exposición a PAN u otros agentes citotóxicos.

La línea celular empleada para el modelo de podocito fue K5P5 murina. Las células se mantuvieron y desarrollaron en matraces de cultivo de tejido (T75) en medio RPMI 1640 + 10 % FBS enriquecido con 10 U/ml de IFNY, y se incubaron a 37 °C. 5% CO₂. Las células deben propagarse hasta un máximo de 20 pasajes.

25 Las células se tripsinizaron (0,25%), se recogieron de los matraces de cultivo de tejido, se centrifugaron, se resuspendieron y se contaron.

Se prepararon matraces recubiertos con colágeno, añadiendo 1 ml/25cm² de 100 µg/ml de Colágeno I (Biochrom) y se dejaron ligar durante 1 hora a 37 °C. Los matraces se lavaron luego dos veces con PBS para eliminar cualquier Colágeno I no ligado.

30 La diferenciación celular de podocitos se inició sembrando las células (1 X 10⁶) en los matraces recubiertos con Colágeno I (T150) en medio RPMI 1640 + 10% FBS sin IFNY. Los matraces se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 3 días.

Las células se tripsinizaron (0,25%), se recogieron de los matraces de cultivo de tejido, se centrifugaron, resuspendieron y contaron.

35 La diferenciación celular de podocitos continuó sembrando las células (7 X 10⁵) en matraces recubiertos con Colágeno I (T150) en medio RPMI 1640 + 10% FBS sin IFNY. Los matraces se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 4 días.

Las placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno se prepararon añadiendo 75 µl/pocillo de un Colágeno I de 100 µg/ml (Biochrom) y se dejaron ligar durante 1 hora a 37 °C. Los matraces se lavaron luego dos veces con PBS para eliminar cualquier Colágeno I no ligado.

40 Las células se tripsinizaron (0,25%), se recogieron de los matraces de cultivo de tejido, se centrifugaron, se resuspendieron y se contaron. La diferenciación celular de podocitos continuó sembrando las células (3,5 X 10³) en placas de 96 pocillos recubiertas con Colágeno I en medio 10% FBS RPMI 1640 sin IFNY. Los matraces se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 3 días.

45 En el día 10, el sobrenadante se extrajo de las placas de 96 pocillos y se reemplazó con 2% FBS RPMI 1640 durante una noche.

Para los compuestos de ensayo, se prepararon medios de cultivo celular (p. ej., RPMI 1640 + 2% FBS), disolución del compuesto 10X en la concentración final deseada a partir de compuestos madre 40 mM.

50 Se añaden 10 µl de esta disolución de compuesto 10X a los 80 µl de células ya presentes en las placas de 96 pocillos. Para células que se someten a tratamiento citotóxico, se añadió puromicina aminonucleósido (PAN, Sigma P7130) a una concentración 10X a 90 µl de las células. El control positivo es tratamiento de PAN sin compuesto. El control negativo es DMSO al 100% diluido hasta el mismo factor que los compuestos sin PAN.

Las placas se incuban a 37 °C, 5% CO₂, durante 48 a 72 horas, dependiendo de la concentración de PAN (es decir, las concentraciones inferiores de PAN requirieron un periodo de incubación más prolongado). El medio se aspira después de que las placas se centrifugan a 2400 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se añaden 100 µl de DPBS 1 X (sin CaCl₂, sin MgCl₂) a cada pocillo.

- 5 Se prepara MTS (Promega) bajo condiciones de luz baja, disolviendo 4,0 g de MTS en 1,81 de DPBS 1 X. La disolución se deja reposar durante 10 minutos y se ajusta el pH hasta 6,2. Se añade H₂O hasta 2L. Se añaden 100 ml de PMS (se disuelven 0,92 g de PMS en 1,01 de DPBS 1X) y se añaden lentamente 20 µl de MTS a cada pocillo y se incuban durante 4 horas a 37 °C. Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm con una lectora de microplacas.

- 10 Un kit disponible para realizar este ensayo es "CellTiter 96® AQueous (G5421)" de Promega.

Se promedian los valores de cuatro réplicas y se calcula el % de inhibición de la siguiente manera:

$$\% \text{ supervivencia} = 100 - \frac{(\text{tratamiento AVG} - \text{control positivo AVG})}{(\text{control negativo AVG} - \text{control positivo AVG})} \times 100$$

Los compuestos 1, 2, 3 y 5 de la Tabla 6 son representativos de la presente invención. El compuesto 4 se incluye para fines comparativos solamente.

- 15 La actividad cito-protectora de estos compuestos se indica en la Tabla 6. Varias de las mediciones de CI₅₀ oscilaron entre 2,5 y 12,5 µM, con dos de los compuestos alcanzando 80% de supervivencia de podocitos K5P5 en presencia de PAN (no se muestran los datos). Para evaluar más los efectos de los compuestos que se observaron con el ensayo de MTS, se analizaron los cambios en la morfología de las células. Las células se fotografiaron después de teñirse con cristal violeta. Los resultados demostraron que el incremento en la supervivencia celular observado en el
- 20 ensayo de MTS se correlaciona con la restauración del fenotipo normal de los podocitos. En consecuencia, el aumento de la dosis del compuesto produjo un incremento en el tamaño de la célula, la propagación de la célula (adhesión) y el número de células total (no se muestran los datos).

Tabla 6. % de supervivencia de una línea celular de podocitos K5P5 tratada con PAN (CI₅₀, µM)

Nombre químico	% Supervivencia
Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico	12,5
Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	30% @ 12,5
(2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico	30% @ 25
4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilamina	2,5
4-(6-Dimetilaminometil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina	12,5

2. Modelo de ratón transgénico

- 25 Se usan ratones transgénicos para la hormona del crecimiento bovina (GH) bajo un promotor de metalotioneína I (Wanke, R., et al. Pediatric Nephrol (1991) 5:513-521). El genotipo se puede confirmar por PCR genómica con cebadores específicos de GH bovina (Wanke, R., et al supra). Se pueden aislar glomérulos después de combinar los riñones de dos o más animales. Para el modelo animal, se induce nefritis sérica nefrotóxica acelerada (NTX) en hembras de 4 a 6 semanas de vida, como se describió previamente (Schadde, E., et al. Nephrol Dial Transplant (2000) 15:1046-1053; Neugarten, J., et al. J Am Soc Nephrol (1995) 5: 1903-1909). Cinco días después de la pre-
- 30 inmunización con IgG de conejo, se inyectan por vía intravenosa 400 µg de una fracción de IgG purificada con proteína A de un antisero GBM anti-murino de conejo nefrotóxico, mientras que los controles reciben vehículo solamente. Se sacrifican los ratones de cada grupo después de 0, 2 y 7 días, y se obtiene una fracción glomerular combinada de cada grupo para análisis de expresión. Se determina la albuminuria usando un sistema ELISA
- 35 específico de albúmina de ratón existente en el mercado (Exocell, Filadelfia, PE).

3. Medición de niveles de ILK de podocitos

- Para evaluar la eficacia del compuesto de pirazolibenzotiazol candidato *in vivo*, se puede emplear el siguiente método de extracción de podocitos. Se realiza RT-PCR de una sola célula como se describe en Schroppel, B., et al. Kidney Int (1998) 53:119-124. Los glomérulos recién disecados de ratones CD-1 se transfieren a un aparato de pinzamiento zonal de membrana. Se cosechan selectivamente podocitos individuales por aspiración de las células en una micropipeta. Se realiza transcripción inversa y RT-PCR esencialmente como se describió anteriormente, pero
- 40

usando 50 en lugar de 30 ciclos. El medio de perfusión aspirado próximo a un glomérulo se procesa en paralelo y sirve como control negativo. La identidad del producto ILK RT-PCR de una sola célula se verifica por digestión de restricción. Se cuantifica el RNA de podocitos individuales usando tecnología RT-PCR en tiempo real publicada (Held, C.A., et al. Genome Res (1996) 6: 986-994). Para determinación del número de copias de ILK por cDNA de podocitos individuales, se emplea una curva estándar de diluciones en serie de cDNA de plásmido de ILK con números de copias conocidos. Las copias de ILK por cDNA de podocitos se calculan usando el valor Ct menos el factor de dilución y la curva estándar ($y = -1,6227\ln(x) + 39$ con $R^2 = 0,9935$) generada a partir de reacciones de amplificación duplicadas de diluciones del doble de log entre 100.000 y 10 copias plasmídicas de ILK.

4. Modelo de proteinuria inducida por adriamicina

- 10 Este modelo, que produce esclerosis glomerular focal (FGS), se describe en Wang, Y., et al. Kidney Int (2000) 58:1797-1804. Se aplican inyecciones intravenosas a grupos de ratones BALB/c en el día 0 con una sola dosis de Adriamicina (ADR, hidroclicloruro de doxorubicina, Pharmacia & Upjohn) a 10-11 mg/kg, o vehículo control. Se analizan entre seis y ocho animales de cada grupo.

GRUPO	TRATAMIENTO
Grupo control negativo	Vehículo intravenoso en el día 0, vehículo diariamente desde el día 0
Grupo control positivo	ADR intravenoso en el día 0, vehículo diariamente desde el día 0
Grupo de ensayo	ADR intravenoso en el día 0, varias dosis de inhibidor de ILK desde el día 0

- 15 Se administran compuestos de pirazolilbenzotiazol por vía oral, intraperitoneal o por bomba de infusión subcutánea, en dosis diarias que oscilan entre 0,01- 200 mg/kg, comenzando en el día 0. Se administran controles vehículo en volúmenes equivalentes por las mismas vías.

- 20 Las lecturas experimentales incluyen peso corporal semanal, volumen de orina, proteína urinaria, albúmina y creatinina del suero, e histopatología terminal. Los ratones del control negativo no demuestran cambios significativos en las lecturas experimentales. El grupo de control positivo demuestra cambios significativos asociados con nefropatía de progreso rápido (FGS) usando lecturas experimentales, a saber, proteinuria, hipoalbuminemia, hipercreatininemia y lesión renal progresiva por histología. En los grupos experimentales tratados con varias dosis del compuesto de pirazolilbenzotiazol, las reducciones en los parámetros medidos de nefropatía progresiva se demuestran comparados con el grupo control positivo, indicando que la administración de compuestos de pirazolilbenzotiazol produce un beneficio terapéutico en este modelo de esclerosis glomerular focal progresiva aguda.

5. Modelo de obstrucción uretral unilateral en murinos

- 30 Este modelo produce la transdiferenciación epitelial – mesenquimatosa en fibrosis renal y se describe en Vielhauer V., et al. J Am Soc Nephrol (2001) 12: 1173-1187. En resumen, se obtienen ratones C57BU6 hembra endogámicos, que pesan aproximadamente 20-26 g, y se mantienen bajo un ciclo de luz y oscuridad de aproximadamente 12 horas. Disponen de alimento y agua a voluntad. Bajo anestesia general, se realiza una ligadura uretral unilateral que resulta en UUO, ligando el uréter distal izquierdo con una sutura 2/0 Mersilene™ a través de una incisión abdominal en la línea media inferior. Los riñones contralaterales no obstruidos sirven como controles.

Plan experimental para modelo UUO

GRUPO (8-10 ratones)	PRE-TRATAMIENTO	TRATAMIENTO
Grupo control negativo	Ratones del grupo quirúrgico de referencia	Reciben vehículo solamente durante 10 días
Grupo control positivo	Ratones con un riñón obstruido	Reciben vehículo solamente durante 10 días
Grupo de ensayo	Ratones con un riñón obstruido	Reciben varias dosis de inhibidor de ILK durante 10 días

- 35 Los compuestos de ensayo se administran por vía oral, intraperitoneal o por bomba de infusión subcutánea, en dosis diarias que oscilan entre 0,01 y 200 mg/kg. Los controles de vehículo se administran en volúmenes equivalentes por las mismas vías. Las lecturas experimentales incluyeron los puntajes de fibrosis histológica, urea en suero, niveles de colágeno y expresión de ILK mRNA. El análisis de los niveles de ILK mRNA también se realiza en células infiltrantes (macrófagos y células T) después de la clasificación celular en fibrosis renal en el modelo UUO. Los

ratones del control negativo (grupo quirúrgico de referencia) no demuestran cambios significativos en las lecturas experimentales. El grupo control de UUO demuestra cambios significativos asociados con fibrosis renal en el riñón ligado usando las lecturas experimentales. También se observa en estos animales un incremento en la inducción de ILK mRNA. En los grupos experimentales tratados con varias dosis del compuesto de pirazolilbenzotiazol, los riñones no ligados se usan como controles internos, y los riñones no ligados no demuestran cambios significativos asociados con fibrosis renal túbulo-intersticial usando lecturas experimentales, no obstante, los riñones dañados demuestran reducciones en los parámetros medidos de fibrosis renal comparados con el grupo control de UUO. Este resultado indica que la administración de los compuestos de pirazolilbenzotiazol produce un beneficio terapéutico en este modelo de fibrosis renal túbulo -intersticial.

Ejemplo 51

TRATAMIENTO DE AMD MEDIANTE EL USO UN INHIBIDOR DE ILK COMO AUXILIAR A LA TERAPIA DE VISUDYNE™

El efecto terapéutico de un compuesto de pirazolilbenzotiazol en AMD se evalúa usando agudeza visual como respuesta clínica primaria. Los pacientes con lesiones de CNV subfóvea causadas por AMD se examinan en presencia de lesiones que satisfacen los criterios de inclusión. Los criterios de inclusión se definen como la presencia de lesiones que miden 5400 µm o menos en la mayor dimensión lineal con signos de CNV clásica y la agudeza visual mejor corregida de aproximadamente 20/40 a 20/200 basada en un examen de agudeza visual y angiográfico con fluoresceína. Aquellos determinados como calificados para el tratamiento de AMD son asignados aleatoriamente a 4 grupos. Los Grupos A, B, y C se tratan como terapia de Visudyne™ estándar con una terapia auxiliar que usa un inhibidor de ILK. Los pacientes del Grupo D son tratados con terapia de Visudyne™ estándar combinada con un placebo del inhibidor de ILK.

Para la terapia de Visudyne™ estándar, se administran a los pacientes 30 ml de Visudyne™ (0,15 mg por kilogramo de peso corporal). La administración es por infusión intravenosa durante un periodo de 10 minutos. Quince minutos después del final de la infusión, se aplica la luz láser durante 83 segundos a la lesión de CNV a través de una lente de contacto de fondo de aumento conocida para dar como resultado una exposición a la luz de 50 J/cm². Una zona circular de aproximadamente 6000 micrómetros que abarca el área de la lesión se expone a la luz láser.

Para la terapia auxiliar, los pacientes de los grupos A, B y C reciben una administración oral diaria de un inhibidor de ILK en dosis de 5, 10, 20 mg por kilogramo de peso corporal, respectivamente. El tratamiento auxiliar comienza tres días después de que el paciente recibió la terapia de Visudyne™ estándar y continúa por un periodo de un mes.

Como seguimiento, los pacientes son examinados cada tres meses. En cada visita de seguimiento programada regularmente, se realiza la medición de la agudeza visual mejor corregida, medición del umbral de contraste, examen oftalmoscópico, fotografía de fondo estereoscópico y angiografía con fluoresceína.

Ejemplo 52

TRATAMIENTO DE RETINOPATÍA DIABÉTICA USANDO UN INHIBIDOR DE ILK

El Efecto terapéutico de un compuesto de pirazolilbenzotiazol en retinopatía diabética proliferativa se evalúa usando la agudeza visual como la respuesta clínica primaria. Los pacientes con retinopatía diabética proliferativa y agudeza visual de 20/100 o mejor en cada ojo se incluyen en la evaluación clínica. Los pacientes son asignados aleatoriamente a 3 grupos de tratamiento y a un grupo 1. Los Grupos A, B y C son tratados con una administración oral diaria del compuesto de pirazolilbenzotiazol en dosis de 5, 10, 20 mg por kilogramo de peso corporal. Los pacientes del Grupo D reciben placebo. El tratamiento abarca un periodo of 24 meses.

Como seguimiento, los pacientes son examinados cada 4 meses. En cada visita de seguimiento programada regularmente, se efectúan la medición de la agudeza visual mejor corregida, medición umbral de contraste, examen oftalmoscópico indirecto, fotografía de fondo estereoscópico, angiografía con fluoresceína y examen en lámpara de hendidura usando lentes de 78 o 90 dioptrías.

Ejemplo 53

EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE ILK EN TEJIDO VASCULAR OCULAR

Este ejemplo indica la relevancia de ILK como diana terapéutica para enfermedades con patología subyacente de neovascularización ocular.

Muestras de ojo de babuinos post mortem se someten a análisis inmunohistológico para la expresión de ILK en vasculatura ocular. Tejidos recién obtenidos se congelan instantáneamente sumergiéndolos en un recipiente Dewar con nitrógeno líquido. Se prepararon cortes de 5-10 micrómetros y se fijaron en acetona fría (-20 C). Se realizó el análisis inmunohistológico usando un anticuerpo anti-ILK de conejo Upstate Biotechnology Institute, NY. Cat# 06-550) y el kit Zymed Histostatin™ Plus (Zymed, Cat.# 85-9743).

Se detectó expresión abundante de ILK en endotelio corioideo y retinal en muestras oculares de babuinos post mortem. Bajo condiciones similares, no se detectó ningún nivel significativo de expresión de ILK en células epiteliales pigmentadas retinales. Además, no se observó ninguna expresión significativa de ILK en neuronas y fotorreceptores.

5 Ejemplo 54

TRATAMIENTO DE NEOVASCULARIZACIÓN CORNEA CON UN INHIBIDOR DE ILK

El siguiente modelo proporciona un ensayo *in vivo* cuantificable que se puede usar para evaluar la actividad anti-angiogénica de un compuesto de pirazolilbenzotiazol. Se induce neovascularización corneal por un procedimiento conocido como cauterización con nitrato de plata. El procedimiento implica aplicaciones tópicas de nitrato de plata en la cornea, tocando suavemente la conjuntiva/limbo por un segundo y luego tocando la cornea central de un ratón anestesiado por 8 segundos con un aplicador de nitrato de plata (Graham-Field, NY, Artículo # 1590, 75% nitrato de plata, 25% nitrato de potasio), inmediatamente después, el ojo se aclara con 10 ml de disolución salina seguida de aplicación tópica de ungüento oftálmico Gentak™ (0,3%, sulfato de gentamicina) en el ojo para prevenir infecciones bacterianas.

Se registra y evalúa la neovascularización corneal examinando y fotografiando la cornea diariamente, usando un microscopio de disección estéreo conectado a una videocámara a color y un ordenador. La angiogénesis se evalúa en base al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos dentro de la cornea avascular previa, usando un sistema de puntuación (puntuación de 0-4) que califica de ninguna vascularización hasta neovascularización muy severa en la cornea. A su vez, tras completar el experimento (día 5-7), se cuantifica la neovascularización de la cornea usando un análisis de imágenes asistido por ordenador (Image Pro Plus, Media Cybernetics, ML) de los vasos sanguíneos teñidos con tinte en preparaciones microscópicas corneales enteras post mortem. Se tiñe la vasculatura corneal con una inyección iv de FITC-dextrano de alto peso molecular aplicada a ratones anestesiados antes de la eutanasia.

Los animales reciben una administración intra-peritoneal diaria de compuesto de pirazolilbenzotiazol en dosis de 5, 25 o 50 mg/kg comenzando el día 2 después del procedimiento de cauterización con nitrato de plata hasta 24 h antes del final del experimento. La neovascularización corneal de los animales tratados con el inhibidor de ILK se compara con aquella de los animales tratados con vehículo.

Ejemplo 55

TRATAMIENTO DE NEOVASCULARIZACIÓN COROIDEA CON UN INHIBIDOR DE ILK USANDO UN MODELO DE CNV EN MONO

El siguiente modelo provee un ensayo *in vivo* que se puede usar para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos de pirazolilbenzotiazol para el tratamiento de CNV. Se induce CNV por haces de láser de argón verde que se disponen en las máculas de monos cynomolgus usando una modificación del modelo de Ryan. El haz de láser con tamaño de 50 µm de diámetro se induce por exposición a luz láser de 350-450 pM a 514 nm durante 0,1 segundo usando un láser de argón (Coherent Argon Dye Laser # 920, Coherent Medical Laser, Polo Alto, CA).

Se monitorea la CNV por examen semanal con fotografía de fondo y angiografía con fluoresceína. Al final del experimento (2-3 meses después de la inducción de CNV), los ojos se enuclean bajo anestesia profunda y se fijan en fijador Kanovsky modificado. Se realiza la bisección 20 min después de la fijación. Los tejidos se embeben luego, y se generan cortes para análisis histológico e inmunohistológico usando anticuerpos contra marcadores específicos de la vasculatura, incluyendo CD-31 y VE-Cadherin. El grado de neovascularización se cuantifica usando un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador con Image Pro Plus (Media Cybernetics, ML).

Los animales reciben administración oral diaria de un compuesto de pirazolilbenzotiazol en dosis de 10, 50 o 100 mg/kg para comenzar después del inicio de la CNV (2-3 semanas después del tratamiento con láser). Como control, un grupo de monos recibe tratamiento oral diario con vehículo solamente. Se compara la CNV en animales tratados con el inhibidor de ILK frente a la de aquellos animales tratados con vehículo para datos angiográficos e inmunohistológicos de CNV.

Ejemplo 56

TRATAMIENTO DE NEOVASCULARIZACIÓN RETINAL CON UN INHIBIDOR DE ILK USANDO UN MODELO DE RATÓN DE RETINOPATÍA INDUCIDA POR ISQUEMIA

El siguiente modelo proporciona un ensayo *in vivo* que se puede emplear para evaluar el potencial terapéutico de compuestos de pirazolilbenzotiazol para el tratamiento de retinopatía. Éste es un modelo de ratón de retinopatía en prematuridad. La retinopatía en ratones es inducida en ratones neonatales. Se expone a los ratones con sus hembras lactantes a 75% oxígeno/25% nitrógeno desde el día posnatal 7 hasta el día 12, luego se vuelven a exponer a aire ambiente.

En el día 17, se pesa a todos los cachorros, se les practica la eutanasia y se perfunden con 1 ml de fijador (4% paraformaldehído/8% sacarosa/tampón de fosfato sódico, pH 7,2) a través del ventrículo izquierdo del corazón. Se enuclean los ojos y se disponen en fijador. Los tejidos fijados se embeben en parafina, y se realizan cortes de 4 µm. Se realiza el procedimiento de inmunohistología para evaluar el grado de neovascularización retinal usando anticuerpos contra marcadores específicos del endotelio, incluyendo CD-31 y VEcadherin. La tinción específica vascular se cuantifica usando el análisis de imágenes asistido por ordenador (Image Pro Plus, Media Cybernetics, ML).

El compuesto de pirazolibenzotiazol en dosis de 5, 25 o 50 mg/kg se administra diariamente por inyección intraperitoneal desde el día 12 hasta el día 16. El grupo control recibe una inyección diaria de vehículo. El efecto inhibidor del inhibidor de ILK sobre la neovascularización retinal se determina comparando el grado de tinción vascular en ratones tratados con el compuesto y aquellos tratados con vehículo solamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KINETEK PHARMACEUTICALS, INC.

ZHANG, Zaihui

DAYNARD, Timothy S.

WANG, Shisen

DU, Xinyao

CHOPIUK, Gregory B.

YAN, Jun

<120> DERIVADOS DE PIRAZOLIBENZOTIAZOL Y SU USO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

<130> 49624-13

<140> NO ASIGNADO AÚN

<141> 2003-07-23

<150> US 60/398,504

<151> 2002-07-24

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de sustrato

<220>

<221> MOD RES

< 222> (10).. (10)

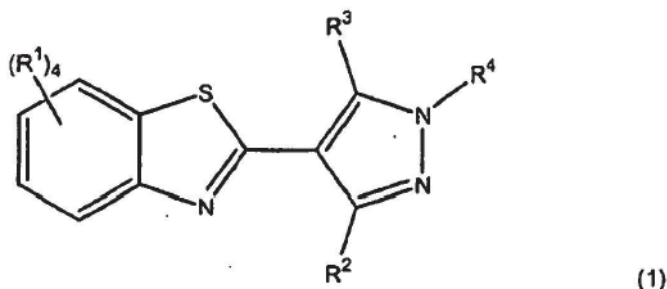
< 223> AMIDACIÓN

<400> 1

Cys Lys Arg Arg Arg Leu Ala Ser Leu Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (1):



como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable, donde:

R¹ en cada caso se selecciona independientemente entre amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, fenilo, azido, halógeno, heteroarilo, heteroalquilo, hidrazinilo, hidrocarbilo C₁₋₁₅, hidrógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfinico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido;

R^2 es amino;

R³ se selecciona entre hidrocarbilo C₁₋₁₅, -O-hidrocarbilo C₁₋₁₅, -S-hidrocarbilo C₁₋₁₅,

R⁴ es hidrógeno,

donde heteroalquilo es aminohidrocarbilo, amido, ácido carboxílico, ciano, dihidrocarbilamido, dihidrocarbilamino, di(hidrocarbil)fosfido, formilo, hidrocarbilo, hidrocarbiloxi, hidrocarbilamino, hidrocarbiloxi, hidrocarbilocarbonilo, hidrocarbilsiloxi, hidrocarbilsililamino, hidrocarbilsulfido, hidrocarbilitio, hidrocarbilamido, isotiocianato, N-heterociclo, perfluorohidrocarbilo, tiocianato e hidrocarbilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilamino C₁₋₁₅, amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, azido, di.alquilamino C₁₋₁₅, halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfínico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonylo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido, donde el resto hidrocarbilo de heteroalquilo es hidrocarbilo C₁₋₁₅;

N-heterociclo es un radical de anillo de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados de nitrógeno;

heteroarilo es un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

2. El compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

[2-(3-Amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-il]-metanol;

[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-il]-metanol;

[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-metanol;

Amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-4,5,6-trifluoro-benzotiazol-7-sulfónico;

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-carboxílico;

Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico:

Ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico:

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico,

Metilamida de ácido 2-(3-amino-5-Metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico:

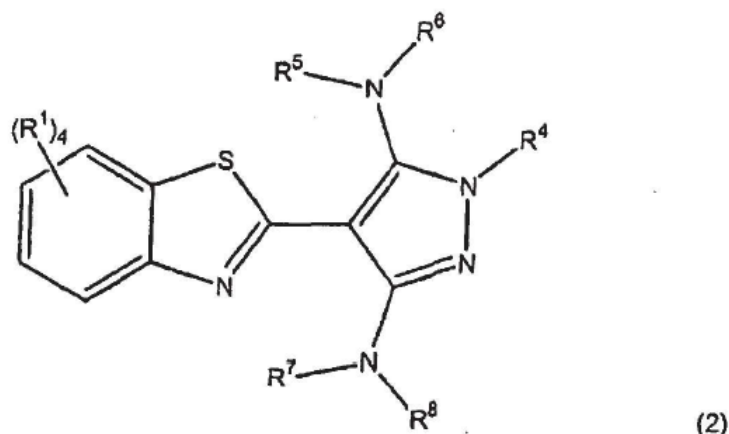
(2,6-Dimetil-pirimidin-4-il)-amida de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;

Éster metílico de ácido 2-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-7-carboxílico:

Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-4-fluorobenzotiazol-6-sulfónico;

- (2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-4-sulfónico;
 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico;
 (Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-5-fluoro-benzotiazol-6-sulfónico;
- 5 2-(5-Amino-3-metil)-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-ol:
 Metilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-5-sulfónico;
 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-carboxílico;
 Amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Hidroxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 10 (2-Metoxi-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-sulfónico;
 4-Fluoro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-sulfónico;
 (2-Tiofen-2-il-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 4-Cloro-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 4-Metoxi-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 15 Bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-sulfónico;
 Fenetil-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 [2-(4-Amino-fenil)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Morfolin-4-il-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2,2,2-Trifluoro-etil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
- 20 Ciclopropilmetil-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 [2-(3H-Imidazol-4-il)-etil]-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 4-Amino-bencilamida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (2-Dimetilaminaetil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-8-sulfónico;
- 25 (3-Dimetilamino-propil)-amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 Amida (hidrazido acética) de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 (Fenilhidrazino) amida de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfónico;
 2-[[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-ilmetil]-amino]-etanol;
 3-[[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-4-ilmetil]-amino]-bencenosulfonamida;
- 30 4-(4-Fluorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-(2-fenil-ciclopropil)-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-6-metil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
- 35 4-(5-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Bromo-5-fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;

- 4-(6-Bromo-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Clorobenzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Dimetilaminometil-5-fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Dimetilaminometil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 5 4-(6-Fluoro-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Metanosulfonil-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-(7-cloro-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-metil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(7-Cloro-5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-il)-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 10 4-Benzotiazol-2-il-5-il-5-ciclopropil-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-etil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-metil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-il-metilsulfanil-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-fenil-1H-pirazol-3-ilamina;
 15 5-Ciclopropil-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(4,5,6-trifluoro-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(5-trifluorometilbenzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(6-metilaminometil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-(6-morfolin-4-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 20 5-Metil-4-(6-pirrolidin-1-ilmetil-benzotiazol-2-il)-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-[6-(4-metil)-piperazin-1-ilmetil]-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina;
 5-Metil-4-[6-(4-metil-piperazina-1-sulfonil)-benzotiazol-2-il]-2H-pirazol-3-ilamina;
 N-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-il]-acetamida,
 N-{2-[2-(5-Amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)-benzotiazol-6-sulfonilamino]-etil}-acetamida; y
 25 Éster etílico de ácido 2-(5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-il)benzotiazol-5-carboxílico,
 como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros, o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable.
3. Un compuesto de fórmula (2):



como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros, o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable, donde:

5 R¹ en cada caso se selecciona independientemente entre amino, aminosulfinilo, aminosulfonilo, fenilo, azido, halógeno, heteroarilo, heteroalquilo, hidrazinilo, hidrocarbilo C₁₋₁₅, hidrógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamoilo, sulfato, ácido sulfinico, sulfonamido, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tiol, tioureido y ureido, donde el resto hidrocarbilo de heteroalquilo es hidrocarbilo C₁₋₁₅;

R^4 se selecciona de hidrógeno; y

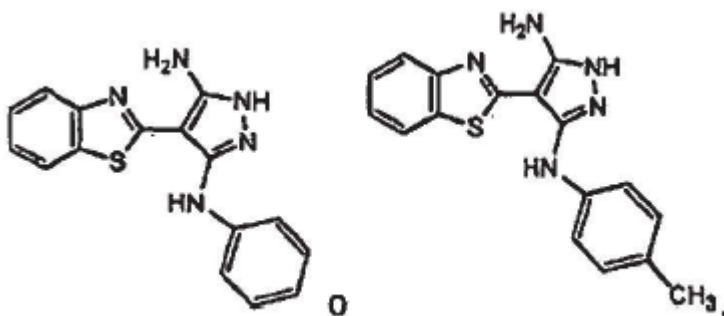
10 R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ en cada caso se seleccionan independientemente entre heteroalquilo, heteroarilo, hidrocarbilo C₁₋₁₅ e hidrógeno, con la salvedad que R⁷ y R⁸ pueden unirse para formar un anillo heterocíclico que incluye el nitrógeno al que están ambos unidos.

donde heteroalquilo es aminohidrocarboílo, amido, ácido carboxílico, ciano, dihidrocarbílamo, dihidrocarbílamo, di(hidrocarbíl)fosfido, formilo, hidrocarboílo, hidrocarbóiloxi, hidrocarbílamo, hidrocarbóiloxi, hidrocarbóiloxycarbonilo, hidrocarbóilsiloxi, hidrocarbóilsilamino, hidrocarbóilsulfido, hidrocarbóiltio, hidrocarbílamo, isotiocianato, N-heterociclo, perfluorohidrocarbilo, tiocianato e hidrocarbilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilamino C₁₋₁₅, amino, aminosulfínico, aminosulfónico, azido, di-alquilamino C₁₋₁₅, halógeno, heteroalquilo, heteroarilo, hidrazinilo, hidroxilo, nitro, nitroso, fosfato, fosfinato, fosfonato, fosfonio, fosforotioato, fosforilo, sulfamóilo, sulfato, ácido sulfónico, sulfonamida, sulfonato, ácido sulfónico, sulfonilo, sulfóxido, tior, tioureido y ureido, donde el resto hidrocarbilo de heteroalquilo es hidrocarbilo C₁₋₁₅;

20 N-heterociclo es un radical de anillo de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados de nitrógeno:

heteroarilo es un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre:

con la salvedad que el compuesto de Fórmula (2) no es:



25

4. El compuesto según la reivindicación 3 seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

4-Benzotiazol-2-il-N³-[2-(1H-midazol-4-il)-etil]-1H-pirazol-3.5-diamina:

2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etanol;

- 2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-ciclopentanol;
 3-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-propan-1-ol;
 3-[5-Amino-4-(5-fluoro-6-metoxi -benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamino]propan-1-ol;
 4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-butan-1-ol;
- 5 Ácido 4-(5-amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-butírico;
 4-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-2H-pirazol-3-ilamino)-N-tiazol-2-il-bencenosulfonamida;
 4-(5-Fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-(5-Fluoro-8-metoxi-benzotiazol-2-il)-N3-[2-(3H-imidazol-4-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-(6-Metoxi-benzotiazol-2-il)-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina;
- 10 4-[(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-metil]-bencenosulfonamida;
 4-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etil]-fenol;
 4-Benzotiazol-2-il-5-piperazin-1-il-2H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-pirrolidin-1-il-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-(1H-imidazol-2-ilmetil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 15 4-Benzotiazol-2-il-N³-(1H-imidazol-2-ilmetileno)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-(2-dimetilamino-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-(2-etilamino-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-(2-metoxi-etil)-1H-pirazol-5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-(2-pirrolidin-1-il-etil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 20 4-Benzotiazol-2-il-N³-(3-dimetilamino-propil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-(3-imidazol-1-il-propil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-[2-(1H-indol-3-il)-etil]-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N³-piperidin-4-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-etil-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 25 4-Benzotiazol-2-il-N⁶-piridin-3-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina;
 N-[2-(5-Amino-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3-ilamino)-etil]-acetamida;
 N-{2-[5-Amino-4-(5-fluoro-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3-ilamino]-etil}-acetamida;
 N³-(2-Amino-etil)-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina:
 N³-(2-Dimetilamino-etil)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 30 N³-(3-Dimetilamino-propil)-4-(5-fluoro-6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 N³-(4-Amino-fenil)-4-benzotiazol-2-il-1H-pirazol-3,5-diamina;
 N³-[2-(3H-imidazol-4-il)-etil]-4-(6-metoxi-benzotiazol-2-il)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N⁵ bencil-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-5-morfolin-4-il-1H-pirazol-3-ilamina;
- 35 4-Benzotiazol-2-il-5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-pirazol-3-ilamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-(3,5-diclorofenil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-(3-trifluorometanosulfonil-fenil)-1H-pirazol-3,5-diamina;

- 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-quinolin-6-il-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 4-Benzotiazol-2-il-N³-quinolin-5-il-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-3-il-1H-pirazol-3,5-diamina;
- 4-Benzotiazol-2-il-N⁵-piridin-4-ilmetil-1H-pirazol-3,5-diamina; y
- 5 4-Benzotiazol-2-il-N³-(3-metilbutil)-1H-pirazol-3,5-diamina;
- como un tautómero sencillo, una mezcla de tautómeros, un estereoisómero sencillo, una mezcla de estereoisómeros, o una mezcla racémica; o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable.
5. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 10 6. Una composición según la reivindicación 5 o un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para tratar un trastorno hiperproliferativo.
7. La composición o el compuesto según la reivindicación 6, donde dicho trastorno hiperproliferativo comprende el crecimiento de células tumorales, hiperplasia neoíntima o trastornos linfoproliferativos.
- 15 8. La composición o el compuesto según la reivindicación 6, donde dicho trastorno hiperproliferativo comprende angiogénesis o neovascularización.
9. La composición o el compuesto según la reivindicación 8, donde dicha neovascularización es la neovascularización ocular.
10. La composición o el compuesto según la reivindicación 9, donde dicha neovascularización ocular es la neovascularización de la cornea, iris, retina o coroides.
- 20 11. La composición o el compuesto según la reivindicación 9, donde dicha neovascularización ocular se asocia con degeneración macular relacionada con el envejecimiento o con retinopatía diabética relacionada con el envejecimiento.
12. La composición o el compuesto según la reivindicación 9, donde dicha composición comprende además un agente fotosensible o donde dicho compuesto se administra como un agente fotosensible.
- 25 13. La composición o el compuesto según la reivindicación 12, donde dicho agente fotosensible es verteporfina.
14. La composición o el compuesto según la reivindicación 6, donde dicho trastorno hiperproliferativo comprende enfermedades inflamatorias y afecciones autoinmunitarias.
15. La composición o el compuesto según la reivindicación 14, donde dichas enfermedades inflamatorias y afecciones autoinmunitarias incluyen una o más de las siguientes: artritis reumatoide, dermatitis de contacto, dermatitis alérgica, psoriasis, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjögren.
- 30 16. Una composición según la reivindicación 5 o un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para inhibir la migración o invasión celular.
17. La composición o compuesto según la reivindicación 16, donde dichas células son células cancerosas.
- 35 18. La composición o el compuesto según la reivindicación 17, donde dichas células son neutrófilos.