

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 130**

51 Int. Cl.:

C07D 519/00 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07844414 .8**

96 Fecha de presentación: **18.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2084162**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.2009**

54

Título: **Triazoles bicíclicos como moduladores de proteínas quinasas**

30

Prioridad:

23.10.2006 US 862552 P

15.12.2006 US 870309 P

24.04.2007 US 913766 P

30.07.2007 US 952840 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

73

Titular/es:

SGX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

10505 ROSELLE STREET

SAN DIEGO, CA 92121, US

72

Inventor/es:

BOUNAUD, PIERRE-YVES;

SMITH, CHRISTOPHER RONALD y

JEFFERSON, ELIZABETH ANNE

74

Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 130 T3

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

DESCRIPCIÓN

Triazoles bicíclicos como moduladores de proteínas quinasas

La presente revelación se refiere a moduladores de las proteínas quinasas de triazol bicíclico, a las composiciones farmacéuticas que los contienen, y a procedimientos para preparar y usar estos compuestos y estas composiciones para tratar enfermedades mediadas por la actividad quinasa.

Las proteínas quinasas de mamífero son importantes reguladores de las funciones celulares. Debido a que las disfunciones de la actividad quinasa se han asociado con varias enfermedades y trastornos, las proteínas quinasas son un objetivo en el desarrollo de fármacos. La familia de las tirosina quinasas y, en particular, el subconjunto de las tirosina quinasas receptoras, se enriquece con dianas cancerígenas probadas y putativas. Las tirosina quinasas receptoras (RTK) tales como EGFR, HER2, KIT y KDR son proteínas bien caracterizadas con una función en el cáncer claramente establecida. Se han autorizado fármacos dirigidos a estas RTK, tales como Gleevec, Iressa y Tarceva, para el tratamiento de ciertos cánceres. Otras RTK están menos caracterizadas, pero también se han implicado en el cáncer. Por ejemplo, van apareciendo datos que sugieren que los inhibidores de TRKC, ROS, CSF1R/FMS y ALK pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer. MET y RON son dos RTK diana particularmente atractivas para el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento del cáncer.

El factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión, es un factor de crecimiento multifuncional que potencia la transformación y el desarrollo tumoral induciendo la mitogénesis y la movilidad celular. Además, el HGF potencia la metástasis mediante la estimulación de la movilidad y la invasión celular a través de diversas rutas de señalización. Para producir los efectos celulares, el HGF debe unirse a su receptor, MET, una tirosina quinasa receptora. MET, una proteína heterodimérica ampliamente expresada que comprende una subunidad α de 50 kilodalton (kDa) y una subunidad β de 145 kDa (Maggiara *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 173:183-186, 1997), se sobreexpresa en un porcentaje relevante de los cánceres humanos y se amplifica durante la transición entre los tumores primarios y la metástasis. Los diversos cánceres en los que está implicada la sobreexpresión de MET incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma gástrico, cáncer renal, carcinoma pulmonar de células pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer pancreático y cáncer de mama. MET también está implicada en la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar.

MET se identificó por primera vez como una reorganización de ADN transformante (TPR-MET) en una línea celular de osteosarcoma humano que había sido tratada con *N*-metil-*N*'-nitro-nitrosoguanidina (Cooper *et al.*, 1984). La tirosina quinasa receptora MET (también conocida como receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, HGFR, MET orc-Met) y su ligando factor de crecimiento de hepatocitos ("HGF") tienen numerosas actividades biológicas, entre las que se incluye la estimulación de la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la morfogénesis, la tubulogénesis de ramificación, la movilidad celular y el crecimiento invasivo. Patológicamente, MET se ha implicado en el crecimiento, la invasión y la metástasis de muchas formas diferentes de cáncer, incluyendo cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado y cáncer de mama. Se han descubierto mutaciones de activación somáticas en MET en metástasis de carcinomas humanos y en cánceres esporádicos, tales como el carcinoma de células renales papilares. También hay pruebas de que la ruta de señalización de MET desempeña un papel importante en la resistencia a las terapias contra el cáncer. Por ejemplo, se ha descubierto que el gen de MET se amplifica en los pacientes de cáncer de pulmón que han tenido una recaída tras una respuesta inicial a inhibidores del EGFR tales como gefitinib y erlotinib. Además del cáncer, hay pruebas de que la inhibición de MET puede ser valiosa en el tratamiento de diversos trastornos, entre los que se incluyen: invasión por *Listeria*, osteolisis asociada con mieloma múltiple, paludismo, retinopatías diabéticas, soriasis y artritis. Las mutaciones en la secuencia de codificación de MET son relativamente poco frecuentes en los cánceres humanos. Sin embargo, basándose en el precedente de la selección de mutaciones de BCR-ABL en pacientes con leucemia mielógena crónica tratados con imatinib, y de mutaciones EGFR en pacientes con cáncer tratados con erlotinib y gefitinib, se prevé que estas y/o quizás otras mutaciones adicionales de MET que podrían conferir resistencia a medicamentos son cada vez más frecuentes si se extiende el uso de los inhibidores de MET en el cáncer. Por lo tanto, los fármacos que inhiben eficazmente algunas de estas mutaciones de MET podrían convertirse en importantes herramientas para las futuras terapias contra el cáncer.

MET está estrechamente relacionada con un grupo de cinco tirosina quinasas receptoras que no se han estudiado tanto como la propia MET. Estas incluyen Tyro3/Sky, MER, AXL, RYK y RON. La tirosina quinasa RON es el receptor para la proteína estimulante de macrófagos y es la tirosina quinasa más cercana a MET, perteneciente a la familia de las tirosina quinasas receptoras de MET. Como MET, RON está implicada en el crecimiento, la invasión y la metástasis de varias formas diferentes de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal y cáncer de vejiga. También hay pruebas de que AXL y MER no reguladas pueden desempeñar papeles importantes en el cáncer. MER tiene muchas propiedades que guardan correlación con la actividad como oncogén. Los ratones transgénicos que expresan MER en el linaje hematopoyético desarrollan síntomas similares a la leucemia linfoblástica de linfocitos T/linfoma, y se expresa en la mayoría de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T. Los estudios en modelos de ratón sugieren que AXL es importante para el crecimiento del cáncer de mama, en el que AXL parece regular los procesos tanto angiogénico y tumorigénico. Otros estudios con líneas celulares de cánceres humanos sugieren que AXL está implicada en la metástasis del carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM) y en la resistencia a los medicamentos. Aunque se sabe muy poco de las funciones normales y patológicas de Tyro3/Sky,

esta tirosina quinasa receptora comparte ciertas propiedades y funciones con sus parientes más estudiados, y es posible que, finalmente, se pruebe su importante papel en el cáncer. RYK también se expresa en ciertos cánceres, pero es una tirosina quinasa receptora huérfana poco común que carece de actividad quinasa detectable y, por tanto, su docilidad como diana para los pequeños agentes terapéuticos moleculares contra el cáncer todavía es incierta.

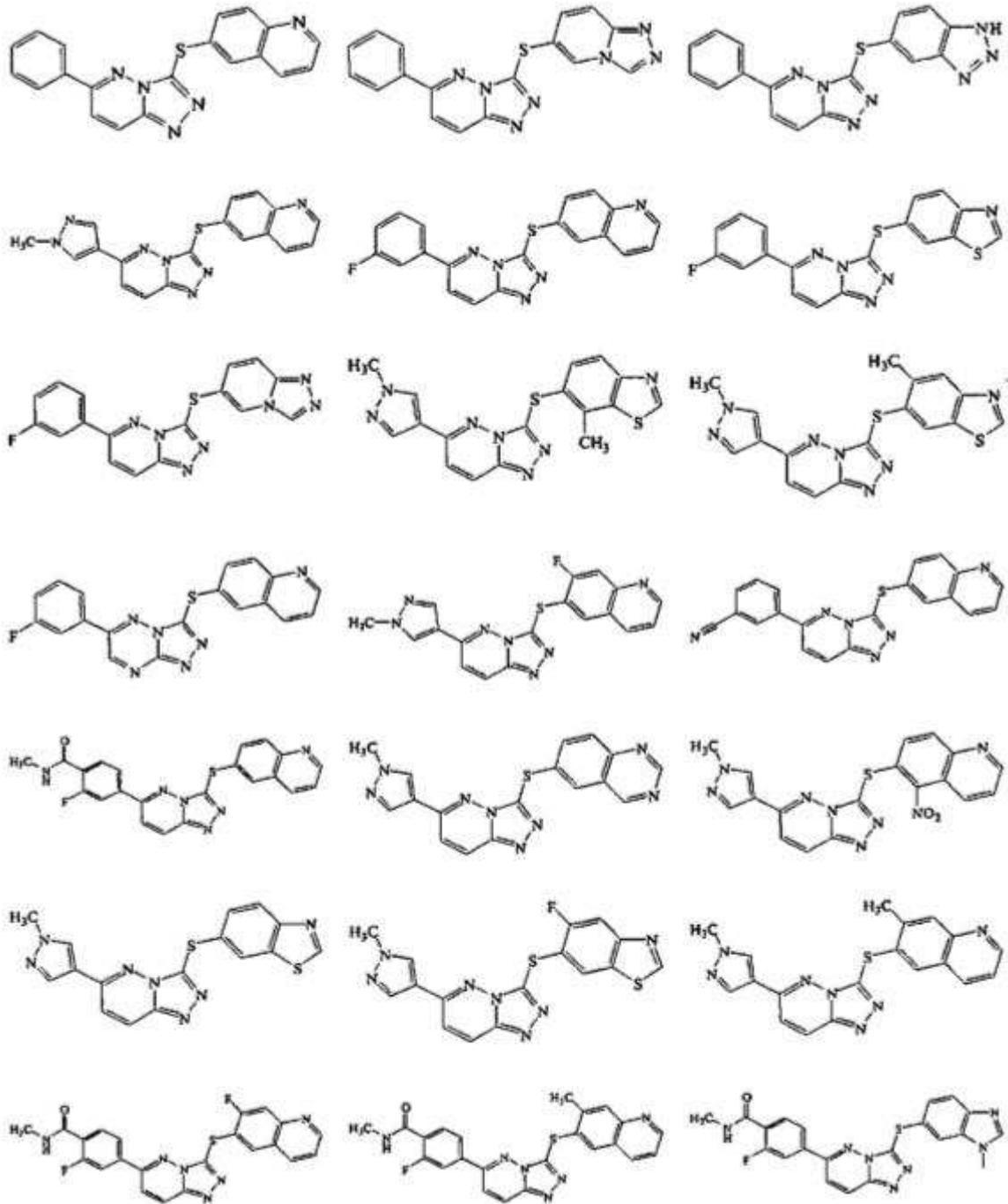
5 Los documentos WO 02/083139 y WO 02/083675 se dirigen a compuestos de triazolo[4,3-*b*]piridazina para el tratamiento del cáncer.

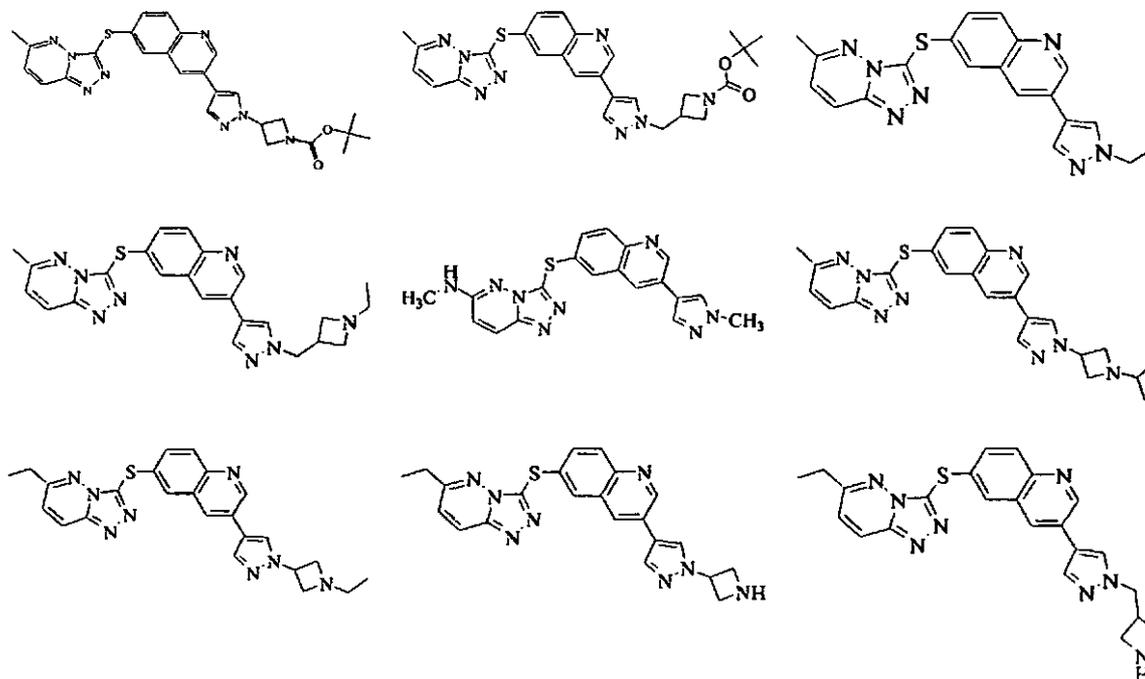
10 Debido a que las quinasas se han implicado en numerosas enfermedades y afecciones, tales como el cáncer, hay una necesidad de desarrollar inhibidores de las proteínas quinasas nuevos y potentes que se puedan usar para tratamientos. La presente invención satisface estas y otras necesidades en la técnica. Aunque, en la presente memoria, se mencionen expresamente ciertas proteínas quinasas, la presente invención no se limita a los inhibidores de estas quinasas, e incluye dentro de su ámbito de aplicación los inhibidores de proteínas quinasas relacionadas y los inhibidores de proteínas homólogas.

15 Se ha descubierto que los compuestos de triazol bicíclicos de la presente revelación se pueden usar para modular la actividad quinasa y para tratar enfermedades mediadas por la actividad quinasa. En particular, los compuestos de la presente revelación se pueden usar para modular y/o inhibir tirosinas quinasas, incluyendo MET. Además, los compuestos de la presente revelación se pueden usar para reducir o inhibir la actividad de la quinasa MET en una célula o en un sujeto, y para modular la expresión de MET en una célula o en un sujeto. Los compuestos descritos también son útiles para prevenir o tratar en un sujeto un trastorno de proliferación celular y/o trastornos relacionados con MET. Los triazoles bicíclicos moduladores de quinasas revelados se describen detalladamente a continuación.

20 Además, en la presente memoria, se dan a conocer las actividades inhibitoras de los compuestos seleccionados.

En un aspecto, la revelación proporciona compuestos que tienen la fórmula:





o un enantiómero, diastereómero, racemato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En otros aspectos, la revelación se refiere a compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer, a composiciones farmacéuticas y a procedimientos para preparar dichos compuestos.

La Figura 1 ilustra la disminución del volumen tumoral medio tras la administración del compuesto 4 en comparación con el volumen tumoral medio del grupo tratado con vehículo.

La Figura 2 ilustra la inhibición del crecimiento tumoral (ICT) tras la administración del compuesto 4 en comparación con los volúmenes tumorales medios del grupo tratado con vehículo.

10 La Figura 3 ilustra la disminución del peso del tumor tras la administración del compuesto 4 en comparación con el peso tumoral media del grupo tratado con vehículo.

La Figura 4 ilustra la disminución del volumen tumoral medio tras la administración del compuesto 41 en comparación con el volumen tumoral medio del grupo tratado con vehículo.

15 La Figura 5 ilustra la inhibición del crecimiento tumoral (ICT) tras la administración del compuesto 41 en comparación con los volúmenes tumorales medios de grupo tratado con vehículo.

La Figura 6 ilustra la disminución del peso del tumor tras la administración del compuesto 41 en comparación con el peso tumoral medio del grupo tratado con vehículo.

Las abreviaturas usadas en la presente memoria tienen su significado convencional empleado en las técnicas químicas y biológicas.

20 Los compuestos de la presente revelación pueden existir como sales. La presente revelación incluye dichas sales. Los ejemplos de formas salinas aplicables incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (por ejemplo, (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas, succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como el ácido glutámico. Estas sales se pueden preparar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. También se incluyen sales de adición de base tales como sal sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrógenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o de fósforo y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos como ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, *p*-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares. Ciertos compuestos específicos de la presente revelación contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

35

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferentemente poniendo en contacto la sal con una base o con un ácido, y aislando el compuesto original en la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares.

5 Ciertos compuestos de la presente revelación pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas, y están abarcadas dentro del alcance de la presente revelación. Ciertos compuestos de la presente revelación pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente revelación y están destinadas a pertenecer al alcance de la misma.

10 Ciertos compuestos de la presente revelación poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces. En la presente revelación, se engloban los enantiómeros, racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos, formas estereoisoméricas que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (*R*) o (*S*), o como (*D*) o (*L*) para aminoácidos, y los isómeros individuales. Los compuestos de la presente revelación no incluyen aquellos conocidos en la técnica por ser demasiado inestables ante la síntesis y/o el aislamiento. La presente revelación pretende incluir compuestos en formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (*R*) y (*S*), o (*D*) y (*L*) se pueden preparar usando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en la presente memoria contienen enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique lo contrario, se pretende que los compuestos incluyan los isómeros geométricos tanto *E* como *Z*.

20 El término "tautómero", como se usa en la presente memoria, se refiere a uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y que se convierten fácilmente de una forma isómera a otra.

Será evidente para el experto en la técnica que ciertos compuestos de la presente revelación pueden existir en formas tautoméricas, estando la totalidad de dichas formas tautoméricas de los compuestos dentro del alcance de la revelación.

25 A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en la presente memoria también pretenden incluir todas las formas estereoquímicas de la estructura; es decir, las configuraciones *R* y *S* para cada centro asimétrico. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas y diastereoméricas de los presentes compuestos pertenecen al alcance de la revelación.

30 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los restos de sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en la presente memoria. Cuando los compuestos de la presente revelación contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente revelación contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o de fósforo y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, *p*-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente revelación contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

Además de las formas salinas, la presente revelación proporciona compuestos que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en la presente memoria son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente revelación. Además, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente revelación mediante procedimientos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente revelación al colocarlos en un reservorio de parche transdérmico con una enzima o un reactivo químico adecuados.

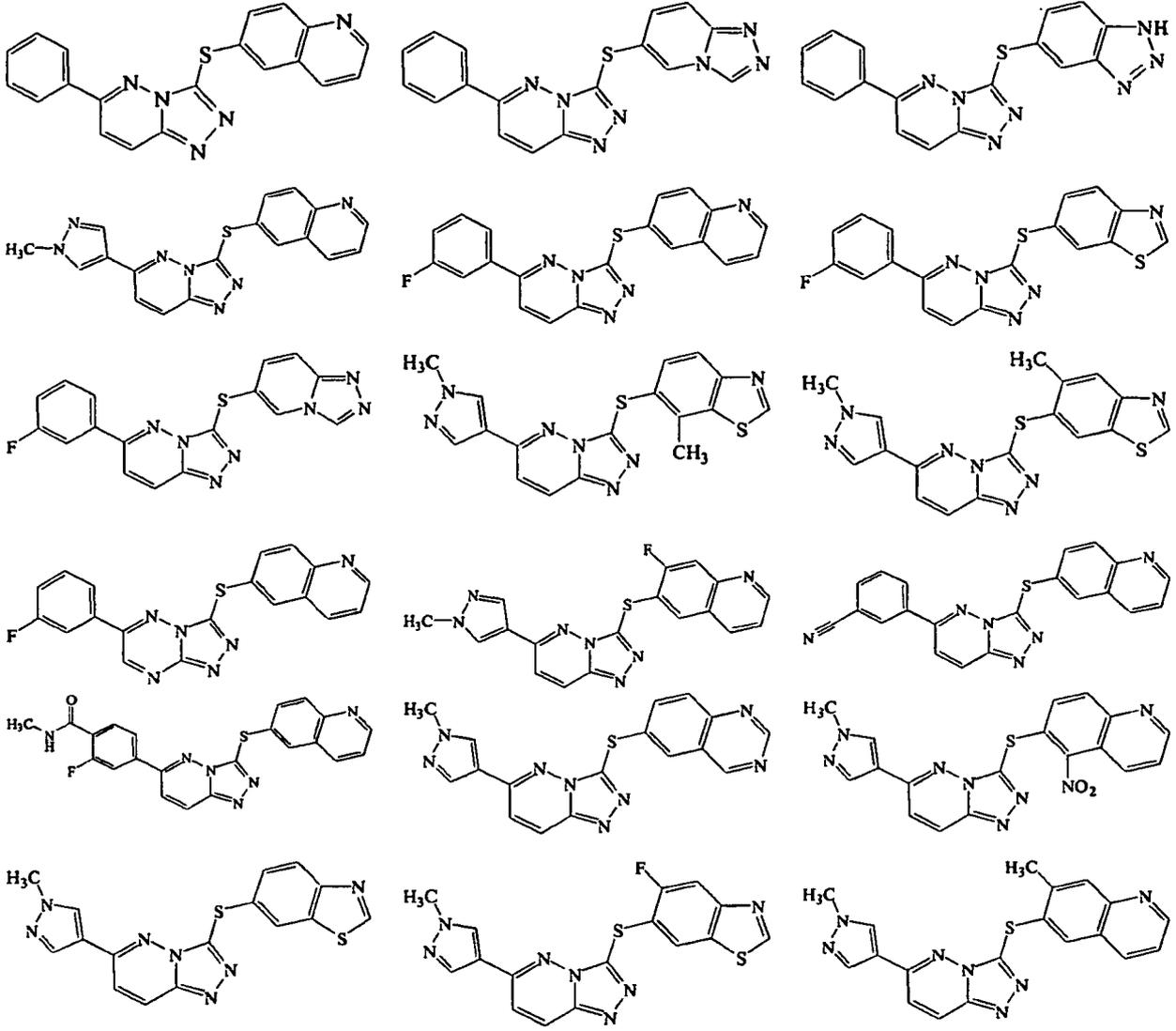
55 La descripción de los compuestos de la presente revelación está limitada por los principios de enlace químico conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, cuando se puede sustituir un grupo con uno o más de una serie de sustituyentes, dichas sustituciones se seleccionan de manera que cumplan los principios de enlace químico y den compuestos que no sean inherentemente inestables ni que sean conocidos por cualquier experto habitual en la técnica por ser probablemente inestable en condiciones ambiente tales como en condiciones acuosas,

neutras y fisiológicas.

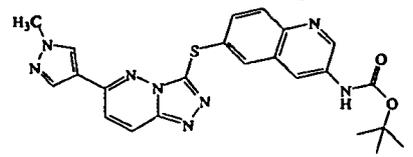
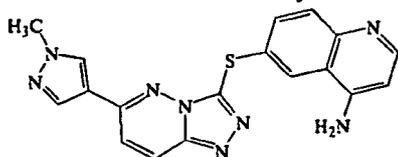
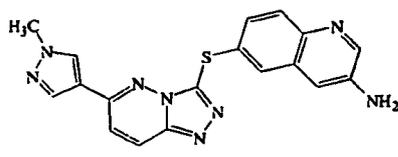
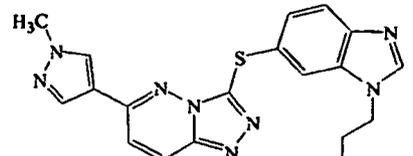
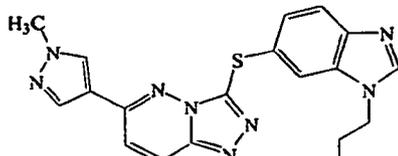
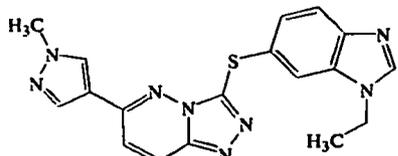
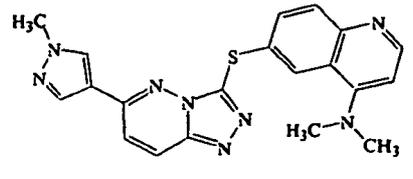
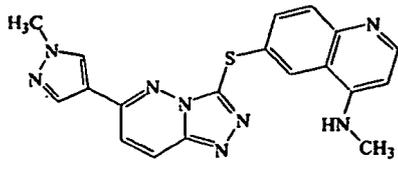
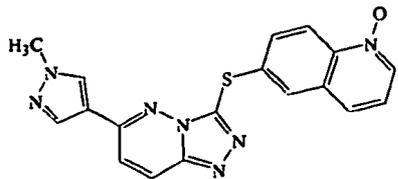
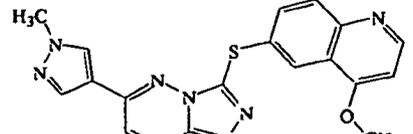
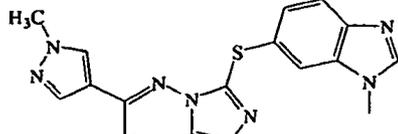
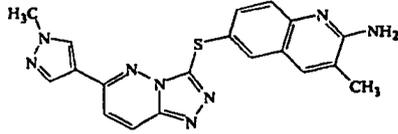
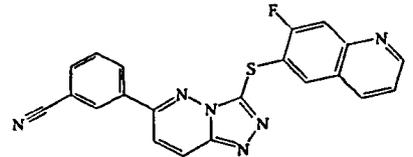
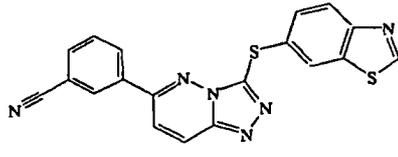
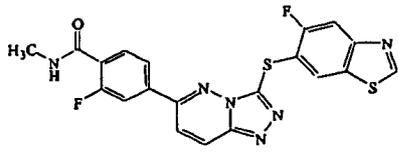
Los términos “tratar” o “tratamiento” con referencia a una determinada enfermedad incluyen la prevención de la enfermedad.

En un aspecto, la revelación proporciona compuestos que tienen las fórmulas:

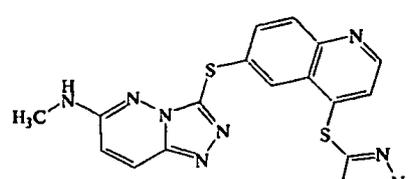
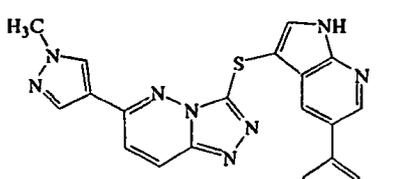
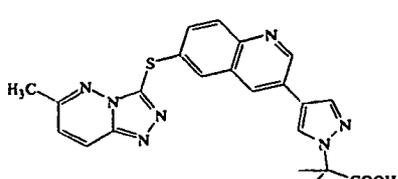
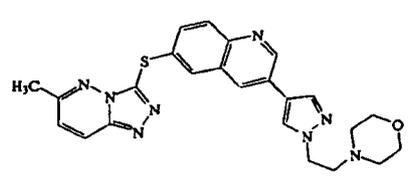
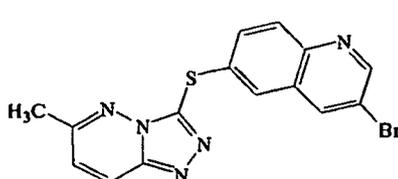
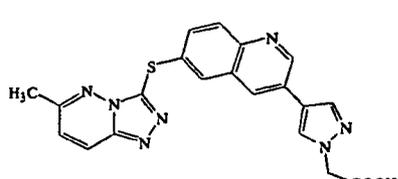
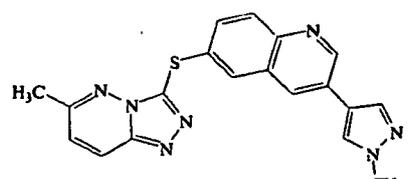
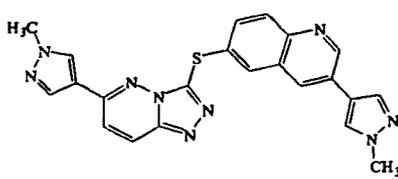
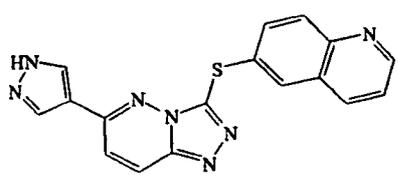
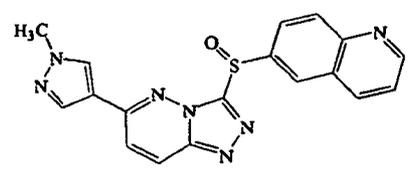
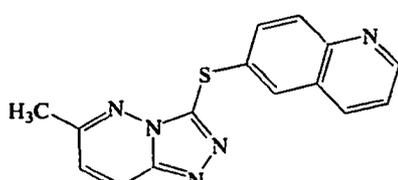
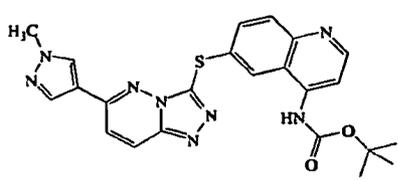
5



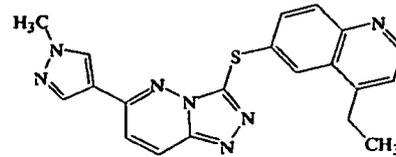
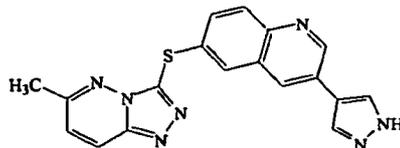
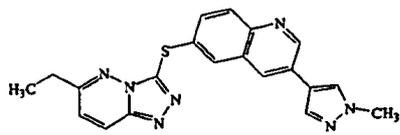
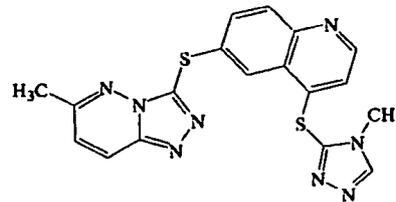
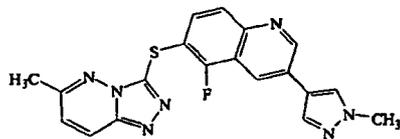
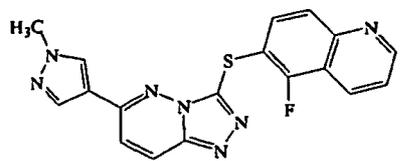
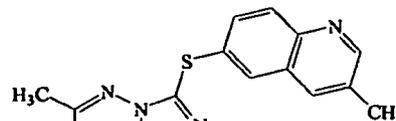
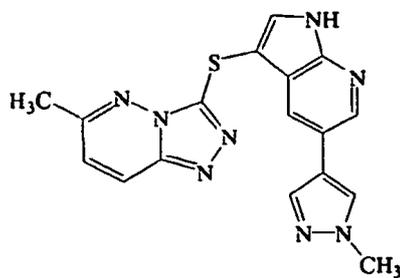
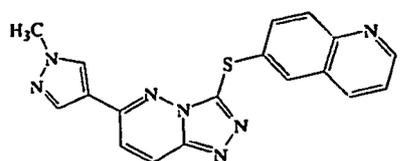
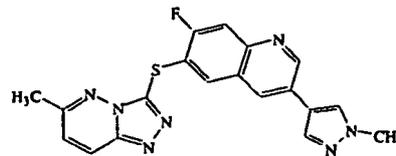
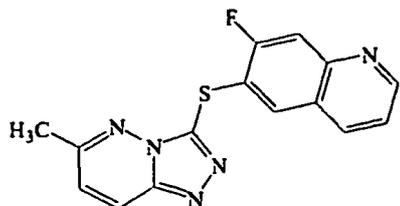
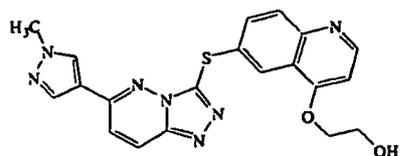
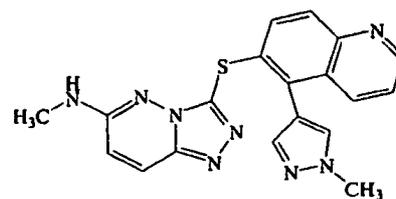
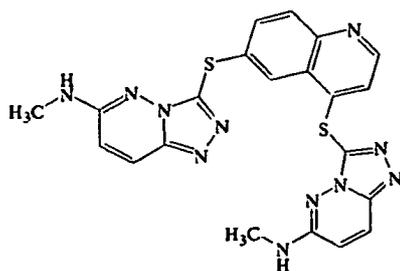
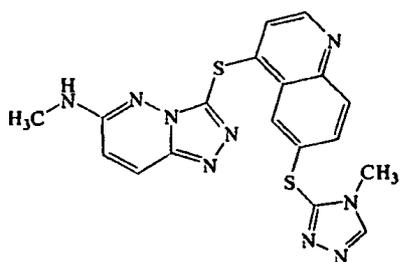
10



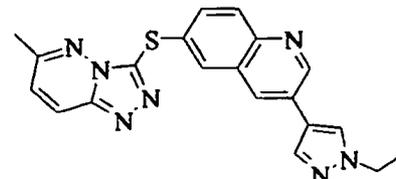
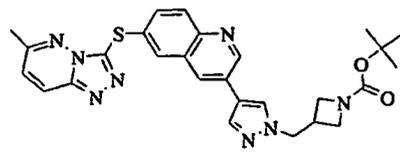
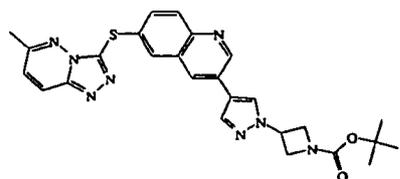
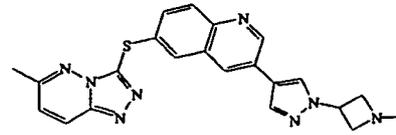
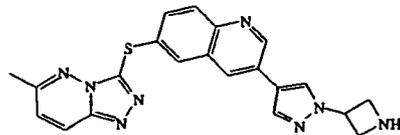
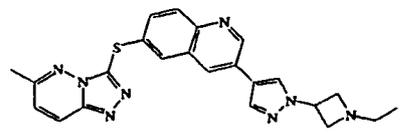
5

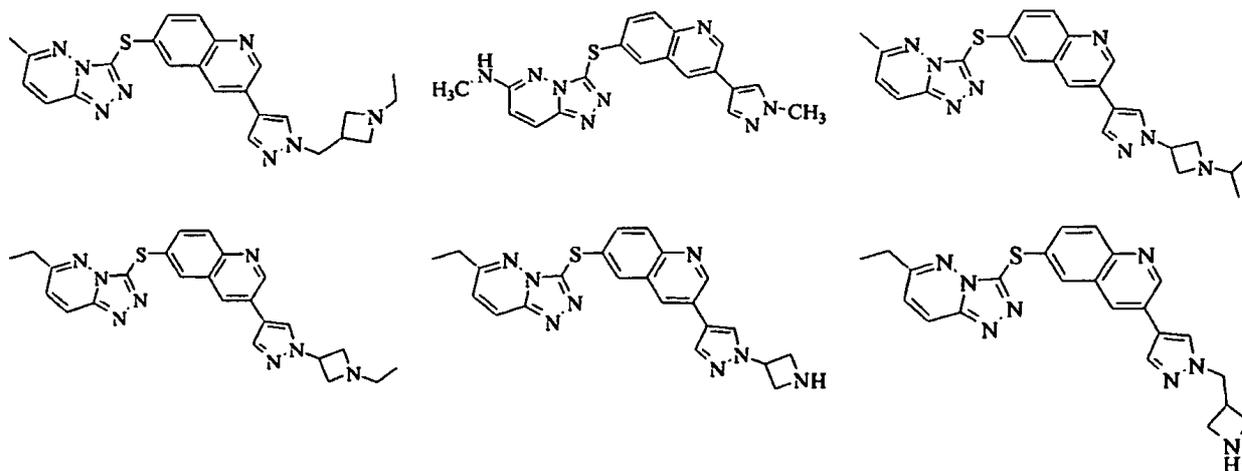


10



5





En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano.

- 5 En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células escamosas, glioblastoma, cáncer de páncreas, leiomioma, mieloma múltiple, carcinoma papilar de células renales, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma y leucemia (por ejemplo, mieloides, mieloides crónicas, linfoblástica aguda, linfoblástica crónica, Hodgkins, y otras leucemias y cánceres hematológicos).

En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano, en la que el cáncer incluye mutaciones de MET, cánceres con amplificación de genes de MET, cánceres que expresan la proteína MET, cánceres que expresan MET fosforilada, cánceres con señalización activada de MET, cánceres que expresan HGF, cánceres que expresan marcadores de otras dianas de las quinasas.

- 15 En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de la invasión de *Listeria*, osteólisis asociada con el mieloma múltiple, paludismo, retinopatías diabéticas, soriasis y artritis.

En otro aspecto, la revelación proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la presente invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 En otro aspecto, la presente revelación proporciona procedimientos para modular la actividad de la proteína quinasa usando los triazoles bicíclicos moduladores de quinasas de la presente revelación. La expresión "modulación de la actividad quinasa", como se usa en la presente memoria, significa que la actividad de la proteína quinasa se aumenta o se disminuye cuando entra en contacto con un triazol bicíclico modulador de quinasas de la presente revelación en comparación con la actividad en ausencia del triazol bicíclico modulador de quinasas. Por lo tanto, la presente revelación proporciona un procedimiento para modular la actividad de una proteína quinasa poniendo en contacto la proteína quinasa con un triazol bicíclico modulador de quinasas de la presente revelación.

- 25 En una realización ejemplar, el triazol bicíclico modulador de quinasas inhibe la actividad quinasa. El término "inhibir", como se usa en la presente memoria, con referencia a la actividad quinasa, significa que la actividad de la quinasa se reduce cuando se pone en contacto con un triazol bicíclico modulador de quinasas con respecto a la actividad en ausencia del triazol bicíclico modulador de quinasas. Por lo tanto, la presente revelación proporciona además un procedimiento para inhibir la actividad de una proteína quinasa poniendo en contacto la proteína quinasa con un triazol bicíclico modulador de quinasas de la presente revelación.

- 30 En ciertas realizaciones, la proteína quinasa es una proteína tirosina quinasa. Una proteína tirosina quinasa, como se usa en la presente memoria, se refiere a una enzima que cataliza la fosforilación de los residuos de tirosina en proteínas con un donante de fosfato (por ejemplo, un donante de fosfato nucleotídico tal como ATP). Las proteínas tirosina quinasas incluyen, por ejemplo, tirosina quinasas Albenson ("Abl") (por ejemplo c-Abl y v-Abl), tirosina quinasas receptoras Ron ("RON"), tirosina quinasas receptoras Met ("MET"), tirosina quinasas de tipo fms ("FLT") (por ejemplo, FLT3), tirosina quinasas de la familia Src (por ejemplo, lyn, CSK) y quinasa 4 activada por p21 ("PAK"), FLT3, Aurora-A quinasas, tirosina quinasas B-linfoides ("Blk"), quinasas dependientes de ciclinas ("CDK") (por ejemplo, CDK1 y CDK5), proteínas tirosina quinasas relacionadas con la familia src (por ejemplo, Fyn quinasa), glucógeno sintasa quinasa ("GSK") (por ejemplo, GSK3 α y GSK3 β), proteínas tirosina quinasas de linfocitos ("Lck"), quinasas ribosomales S6 (por ejemplo, Rsk1, RSK2 y Rsk3), tirosina quinasas de esperma (por ejemplo, Yes) y los subtipos y homólogos de las mismas que presentan actividad tirosina quinasa.

En ciertas realizaciones, la proteína quinasa es una tirosina quinasa receptora de Met.

En otra realización, la quinasa es una quinasa mutante, tal como una MET mutante. Las quinasas MET mutantes incluyen, por ejemplo, quinasas MET que tienen mutaciones, incluyendo inserciones y eliminaciones, en los dominios extracelulares o transmembrana, o en el dominio citoplasmático, incluyendo una o más de las siguientes mutaciones: Ser1058Pro, Val1110Ile, His1112Tyr, His1124Asp, Met1149Thr, Val1206Leu o Met1268Thr.

- 5 Las quinasas MET incluyen, por ejemplo, quinasas MET que tiene mutaciones, incluyendo inserciones y eliminaciones, en los dominios extracelulares o transmembrana, o en el dominio citoplasmático, incluyendo una o más de las siguientes mutaciones: Ser1058Pro, Val1110Ile, His1112Tyr, His1124Asp, Met1149Thr, Val1206Leu o Met1268Thr.

- 10 En algunas realizaciones, la quinasa es homóloga a una quinasa conocida (también denominada en la presente memoria como una "quinasa homóloga"). Los compuestos y las composiciones útiles para inhibir la actividad biológica de quinasas homólogas se pueden examinar inicialmente, por ejemplo, en ensayos de unión. Las enzimas homólogas comprenden una secuencia de aminoácidos de la misma longitud que es al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la quinasa conocida, o una homología del 70%, 80% o 90% con los dominios activos de quinasas conocidas. La homología se puede determinar usando, por ejemplo, una búsqueda PSI-BLAST, tal como, pero sin limitación, a la descrita por Altschul, *et al.*, *Nuc. Acids Rec.* 25:3389-3402 (1997). En ciertas realizaciones, se alinea al menos el 50% o al menos el 70% de la secuencia en este análisis. Otras herramientas para realizar la alineación incluyen, por ejemplo, DbClustal y ESPript, que se pueden usar para generar la versión PostScript de la alineación. Véase Thompson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 28:2919-26, 2000; Gouet, *et al.*, *Bioinformatics*, 15:305-08 (1999).
- 15 Los homólogos pueden tener, por ejemplo, un valor BLAST E de 1×10^{-6} en al menos 100 aminoácidos (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997) con FLT3, Abl u otra quinasa conocida, o cualquier dominio funcional de FLT3, Abl u otra quinasa conocida.

- 20 La homología también se puede determinar comparando la cavidad de unión a sitios activos de la enzima con las cavidades de unión a sitios activos de una quinasa conocida. Por ejemplo, en enzimas homólogas, al menos el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de los aminoácidos de la molécula u homólogo tienen las coordenadas estructurales de los aminoácidos de un dominio comparable en tamaño con el dominio quinasa que tienen una desviación cuadrática media de los átomos de carbono alfa de hasta aproximadamente 1,5 Å, aproximadamente 1,25 Å, aproximadamente 1 Å, aproximadamente 0,75 Å, aproximadamente 0,5 Å y/o aproximadamente 0,25 Å.

- 25 Los compuestos y las composiciones de la presente revelación son útiles para inhibir la actividad quinasa y también para inhibir otras enzimas que se unen a ATP. Por lo tanto, son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos que se pueden aliviar mediante la inhibición de dicha actividad enzimática de unión a ATP. Los procedimientos de determinación de dichas enzimas de unión a ATP incluyen los conocidos por los expertos en la técnica, los descritos en la presente memoria en relación con la selección de enzimas homólogas, y mediante el uso de la base de datos PROSITE, en la que se pueden identificar enzimas que contienen firmas, patrones de secuencia, motivos o perfiles de familias o dominios de proteínas.

- 30 Los compuestos de la presente revelación, y sus derivados, también se pueden usar como agentes de unión a la quinasa. Como agentes aglutinantes, dichos compuestos y derivados pueden estar unidos a una resina estable como un sustrato anclado para aplicaciones de cromatografía de afinidad. Los compuestos de la presente revelación, y sus derivados, también se pueden modificar (por ejemplo, radiomarcado o marcado de afinidad, etc.) con el fin de utilizarlos en la investigación de la caracterización, la estructura y/o la función de enzimas o polipéptidos.

- 35 En una realización ejemplar, el triazol bicíclico modulador de quinasas de la presente revelación es un inhibidor de quinasas. En algunas realizaciones, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 1 micromolar. En otra realización, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 500 micromolar. En otra realización, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 10 micromolar. En otra realización, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 1 micromolar. En otra realización, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 500 nanomolar. En otra realización, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 10 nanomolar. En otra realización, el inhibidor de quinasas tiene una CI_{50} o una constante de inhibición (K_i) de menos de 1 nanomolar.

- 40 En otro aspecto, la presente revelación proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por la actividad quinasa (enfermedad o trastorno mediado por quinasa) en un organismo (por ejemplo, mamíferos, tales como seres humanos). La expresión "mediado/a por quinasas" o "asociado/a con quinasas" significa enfermedades en sí o sus síntomas que se pueden aliviar mediante la inhibición de la actividad quinasa (por ejemplo, cuando la quinasa está implicada en la señalización, la mediación, la modulación o la regulación del proceso patológico). "Enfermedades" significa las enfermedades o síntomas de enfermedades.

- 45 Los ejemplos de enfermedades asociadas quinasas incluyen el cáncer (por ejemplo, leucemia, tumores y metástasis), alergia, asma, inflamación (por ejemplo, enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias), enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades metabólicas, infección (por ejemplo,

bacteriana, de levadura, viral, fúngica), enfermedades del SNC, tumores cerebrales, enfermedades degenerativas neuronales, enfermedades cardiovasculares y enfermedades asociadas con la angiogénesis, la neovascularización y la vasculogénesis. En una realización ejemplar, los compuestos son útiles para el tratamiento del cáncer, incluyendo la leucemia y otras enfermedades o trastornos que implican la proliferación celular anómala, trastornos mieloproliferativos, trastornos hematológicos, asma, enfermedades inflamatorias u obesidad.

Los ejemplos más específicos de los cánceres tratados con los compuestos de la presente revelación incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células escamosas, glioblastoma, cáncer de páncreas, leiomiocarcinoma, mieloma múltiple, carcinoma papilar de células renales, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma y leucemia (por ejemplo, mieloides, mieloides crónicas, linfoblástica aguda, linfoblástica crónica, Hodgkins y otras leucemias y cánceres hematológicos).

Otros ejemplos específicos de las enfermedades o trastornos para los que el tratamiento con los compuestos o composiciones de la revelación son útiles para su tratamiento o prevención incluyen, pero sin limitación, rechazo a trasplantes (por ejemplo, trasplante de riñón, hígado, corazón, pulmón, células de los islotes, páncreas, médula ósea, córnea, intestino delgado, aloinjertos de piel o xenoinjertos y otros trasplantes), enfermedad del injerto contra huésped, osteoartritis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, retinopatía diabética, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otras enfermedades intestinales), enfermedad renal, caquexia, choque séptico, lupus, miastenia grave, soriasis, dermatitis, eczema, seborrea, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, protección de células madre durante la quimioterapia, selección *ex vivo* o purga *ex vivo* para el trasplante de médula ósea autólogo o alogénico, enfermedades oculares, retinopatías (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética y otras retinopatías), enfermedad de la córnea, glaucoma, infecciones (por ejemplo bacteriana, viral o fúngica), enfermedades del corazón, incluyendo, pero sin limitación, la restenosis.

En otro aspecto, la revelación proporciona terapias de combinación para tratar o inhibir el inicio de un trastorno proliferativo celular o un trastorno relacionado con Met en un sujeto. La terapia de combinación comprende administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, y una o más terapias contra la proliferación celular distintas, incluyendo la quimioterapia, la radioterapia, la terapia génica y la inmunoterapia.

En otro aspecto, los compuestos de la revelación se pueden administrar en combinación con quimioterapia. Como se usa en la presente memoria, la quimioterapia se refiere a una terapia que implica un agente quimioterapéutico. Se puede usar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los procedimientos de tratamiento combinados descritos en la presente memoria. Los agentes quimioterapéuticos contemplados como ejemplares incluyen, pero sin limitación: compuestos de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino); compuestos de taxano (por ejemplo, paclitaxel, docetaxol); compuestos campototecina (irinotecán, topotecán); alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina); derivados nucleósidos antitumorales (por ejemplo, 5-fluorouracilo, leucovorina, gemcitabina, capecitabina); agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, lomustina, tiotepa); epipodofilotoxinas/podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, tenipósido); inhibidores de la aromataza (por ejemplo, anastrozol, letrozol, exemestano); compuestos anti-estrogénicos (por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant), antifolatos (por ejemplo, premetrexed disódico); agentes hipometilantes (por ejemplo, azacitidina); compuestos biológicos (por ejemplo, gemtuzamab, cetuximab, rituximab, pertuzumab, trastuzumab, bevacizumab, erlotinib); antibióticos/antracilinas (por ejemplo, idarubicina, actinomicina D, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, dactinomicina, carminomicina, daunomicina); antimetabolitos (por ejemplo, clofarabina, aminopterina, citosina arabinósido, metotrexato); agentes de unión a la tubulina (por ejemplo, combretastatina, colchicina, nocodazol); inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina); agentes diferenciadores (por ejemplo, retinoides, vitamina D y ácido retinoico); agentes bloqueadores del metabolismo del ácido retinoico (RAMBA) (por ejemplo, Accutane); inhibidores de quinasa (por ejemplo, flavoperidol, mesilato de imatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, lapatinib, sorafinib, temsirolimus, dasatinib); inhibidores de la farnesiltransferasa (por ejemplo, tipifarnib); inhibidores de la histona desacetilasa; inhibidores de la vía ubiquitina-proteasoma (por ejemplo, bortezomib, Yondelis).

Otros agentes útiles incluyen verapamilo, un antagonista del calcio encontrado útil, en combinación con agentes antineoplásicos, para establecer la quimiosensibilidad en células tumorales resistentes a agentes quimioterapéuticos y para potenciar la eficacia de dichos compuestos en malignidades sensibles a fármacos. Véase Simpson W. G, "The calcium channel blocker verapamil and cancer chemotherapy". *Cell Calcium*. Diciembre 1985; 6(6):449-67. Además, se contempla su utilidad como agentes quimioterapéuticos en combinación con el compuesto de la presente revelación.

En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos que se pueden administrar en combinación con radioterapia. Como se usa en la presente memoria, "radioterapia" se refiere a una terapia que comprende exponer al sujeto que lo necesite a radiación. Dicha terapia es conocida por los expertos en la técnica. El esquema apropiado de radioterapia será similar a los ya empleados en terapias clínicas en las que se usa la radioterapia sola o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos que se pueden administrar en combinación con una terapia génica. Como se usa en la presente memoria, "terapia génica" se refiere a una terapia dirigida a determinados genes implicados en el desarrollo de un tumor. Las posibles estrategias de terapia génica incluyen la restauración de genes defectuosos inhibidores del cáncer, la transducción o transfección de células con ADN antisentido correspondiente a los genes que codifican factores de crecimiento y sus receptores, estrategias basadas en el ARN tales como ribozimas, señuelos de ARN, ARN mensajero antisentido y moléculas de ARN de interferencia pequeñas (ARNip) y los denominados "genes suicidas".

En otro aspecto, la revelación proporciona compuestos que se pueden administrar en combinación con una inmunoterapia. Como se usa en la presente memoria, "inmunoterapia" se refiere a una terapia dirigida a una proteína en particular implicada en el desarrollo tumoral a través de anticuerpos específicos contra dicha proteína. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento endotelial vascular se han usado en el tratamiento de cánceres.

Cuando se usa un segundo compuesto farmacéutico además de un compuesto de la revelación, los dos compuestos farmacéuticos se pueden administrar simultáneamente (por ejemplo, en composiciones separadas o unitarias) secuencialmente en cualquier orden, en aproximadamente el mismo tiempo o en regímenes de dosificación separados. En este último caso, los dos compuestos se administrarán en un periodo, y en una cantidad y forma que será suficiente para garantizar que se produzca un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el procedimiento preferido, y el orden de administración, y los respectivos regímenes y cantidades de dosificación para cada componente de la combinación dependerán del agente quimioterapéutico que se administre en concreto en combinación con el compuesto de la presente invención, de su vía de administración, del tumor que se trate en particular y del huésped que se esté tratando en concreto.

Como los expertos habituales en la técnica entenderán, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos serán generalmente similares o inferiores a aquellas ya empleadas en terapias clínicas en las que se administren agentes quimioterapéuticos solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

El procedimiento óptimo, y el orden de administración, y las cantidades y régimen de dosificación pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la técnica mediante procedimientos convencionales y en vista de la información que figura en la presente memoria.

A modo de ejemplo, se administran ventajosamente compuestos de platino a una dosis de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo, de 50 a 400 mg/m^2 ; particularmente para el cisplatino, a una dosis de aproximadamente 75 mg/m^2 ; y para el carboplatino a aproximadamente 300 mg/m^2 por ciclo de tratamiento. El cisplatino no se absorbe oralmente y, por lo tanto, se debe administrar mediante una inyección por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

A modo de ejemplo, se administran ventajosamente compuestos de taxano a una dosis de 50 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo, de 75 a 250 mg/m^2 ; en particular para el paclitaxel, a una dosis de aproximadamente 175 a 250 mg/m^2 ; y para el docetaxel de aproximadamente 75 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

Únicamente a modo de ejemplo, se administran ventajosamente compuestos de camptotecina a una dosis de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo, de 1 a 300 mg/m^2 ; particularmente para el irinotecán, a una dosis de aproximadamente 100 a 350 mg/m^2 ; y para el topotecán, de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

Únicamente a modo de ejemplo, se pueden administrar ventajosamente alcaloides de la vinca a una dosis de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal; particularmente para la vinblastina, a una dosis de aproximadamente 3 a 12 mg/m^2 ; para la vincristina, a una dosis de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 ; y para la vinorelbina, a una dosis de aproximadamente 10 a 30 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

Únicamente a modo de ejemplo, se pueden administrar ventajosamente derivados de nucleósidos antitumorales a una dosis de 200 a 2.500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo, de 700 a 1.500 mg/m^2 . El 5-fluorouracilo (5-FU) se utiliza comúnmente por vía intravenosa a dosis que varían de 200 a 500 mg/m^2 (preferentemente, de 3 a 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$). La gemcitabina se administra ventajosamente a una dosis de aproximadamente 800 a 1.200 mg/m^2 y la capecitabina se administra ventajosamente a una dosis de aproximadamente 1.000 a 2.500 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

Únicamente a modo de ejemplo, se pueden administrar ventajosamente agentes alquilantes a una dosis de 100 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo, de 120 a 200 mg/m^2 ; particularmente para la ciclofosfamida, a una dosis de aproximadamente 100 a 500 mg/m^2 ; para el clorambucilo, a una dosis de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg de peso corporal; para la carmustina, a una dosis de aproximadamente 150 a 200 mg/m^2 ; y para la lomustina, a una dosis de aproximadamente 100 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

Únicamente a modo de ejemplo, se pueden administrar ventajosamente derivados de podofilotoxina a una dosis de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo, de 50 a 250 mg/m^2 ; en particular para

etopósido, a una dosis de aproximadamente 35 a 100 mg/m²; y para el tenipósido, de aproximadamente 50 a 250 mg/m² por ciclo de tratamiento.

5 Únicamente a modo de ejemplo, se pueden ser administrar ventajosamente derivados de antraciclina a una dosis de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m²) de superficie corporal, por ejemplo, de 15 a 60 mg/m²; en particular para la doxorubicina, a una dosis de aproximadamente 40 a 75 mg/m²; para la daunorrubicina, a una dosis de aproximadamente 25 a 45 mg/m²; y para la idarrubicina, a una dosis de aproximadamente 10 a 15 mg/m² por ciclo de tratamiento

10 Únicamente a modo de ejemplo, se pueden administrar ventajosamente compuestos antiestrogénicos a una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg al día dependiendo del agente en particular y de la afección que se está tratando. El tamoxifeno se administra ventajosamente por vía oral a una dosis de 5 a 50 mg, preferentemente, de 10 a 20 mg dos veces al día, continuando la terapia durante el tiempo suficiente para alcanzar y mantener un efecto terapéutico. El toremifeno se administra ventajosamente por vía oral a una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día, continuando la terapia durante el tiempo suficiente para alcanzar y mantener un efecto terapéutico. El anastrozol se administra ventajosamente por vía oral a una dosis de aproximadamente 1 mg una vez al día. El droloxifeno se administra ventajosamente por vía oral a una dosis de aproximadamente 20-100 mg una vez al día. El raloxifeno se administra ventajosamente por vía oral a una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día. El exemestano se administra ventajosamente por vía oral a una dosis de aproximadamente 25 mg una vez al día.

15 Únicamente a modo de ejemplo solamente, se pueden administrar ventajosamente compuestos biológicos a una dosis de aproximadamente 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m² de superficie corporal o como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el trastuzumab se administra ventajosamente a una dosis de 1 a 5 mg/m², particularmente, de 2 a 4 mg/m² por ciclo de tratamiento.

Las dosis se pueden administrar, por ejemplo, una vez, dos veces o más por ciclo de tratamiento, que se puede repetir, por ejemplo, cada 7, 14, 21 ó 28 días.

25 Los compuestos de la presente revelación se pueden administrar a un sujeto sistémicamente, por ejemplo, por vía intravenosa, oral, subcutánea, intramuscular, intradérmica o por parenteral. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar a un sujeto localmente. Los ejemplos no restrictivos de sistemas de administración local incluyen el uso de dispositivos médicos intraluminales que incluyen catéteres de administración de fármacos intravasculares, cables, stents farmacológicos y revestimiento endoluminal.

30 Los compuestos de la presente revelación se pueden administrar además a un sujeto en combinación con un agente de direccionamiento para lograr una alta concentración local del compuesto en el sitio diana. Además, los compuestos de la presente invención se pueden formular para la liberación rápida o la liberación lenta con el objetivo de mantener los fármacos o los agentes en contacto con los tejidos diana durante un período que varía de las horas a las semanas.

35 En otro aspecto, la presente revelación proporciona una composición farmacéutica que incluye un triazol bicíclico modulador de quinasas mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. El experto en la técnica reconocerá que las composiciones farmacéuticas incluyen las sales farmacéuticamente aceptables de los triazoles bicíclicos moduladores de quinasas descritos anteriormente.

40 En aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico, los compuestos de la revelación se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluyendo la administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (XX ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000).

45 Según otro aspecto, la revelación proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen compuestos de fórmula I, y un vehículo, adyuvante o transportador farmacéuticamente aceptable. La cantidad de compuesto de las composiciones de la revelación es tal que es eficaz para inhibir detectablemente una proteína quinasa, particularmente, MET en una muestra biológica o en un paciente.

Como se usa en la presente memoria, el término "MET" es sinónimo de "Met", "c-MET", "c-Met" u otras designaciones conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto, se formula una composición de la presente revelación para su administración a un paciente en necesidad de dicha composición. En otro aspecto, la composición de la revelación se formula para una administración oral a un paciente.

50 Los compuestos según la revelación son eficaces en un amplio intervalo de dosis. Por ejemplo, en el tratamiento de seres humanos adultos, las dosis de 0,01 a 10.000 mg, de 0,5 a 1.000 mg, de 1 a 500 mg por día y de 5 a 100 mg por día son ejemplos de dosis que se pueden utilizar. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en la que se administre el compuesto, el sujeto que se vaya a tratar, el peso corporal del sujeto que se vaya a tratar, y la preferencia y experiencia del médico a cargo.

55 Las sales farmacéuticamente aceptables son en general ampliamente conocidas por los expertos habituales en la técnica, y pueden incluir, a modo de ejemplo no restrictivo, acetato, bencenosulfonato, besilato, benzoato,

- bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, carnisilato, carbonato, citrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato o teoclato. Otras sales farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (XX ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas incluyen, por ejemplo, acetato, benzoato, bromuro, carbonato, citrato, gluconato, bromhidrato, clorhidrato, maleato, mesilato, napsilato, pamoato (embonato), fosfato, salicilato, succinato, sulfato o tartrato.
- 5
- 10 En función de las afecciones específicas que se estén tratando, dichos agentes se pueden formular en formas de dosificación líquida o sólida, y administrarse sistémica o localmente. Los agentes se pueden administrar, por ejemplo, en una forma de liberación baja sostenida conocida por los expertos en la técnica. Las técnicas para la formulación y la administración se pueden encontrar en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (XX ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Las vías adecuadas pueden incluir administración oral, bucal, mediante pulverizado por inhalación, sublingual, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa, nasal o intestinal; administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intra-articulares, intra-esternales, intra-sinoviales, intrahepáticas, intralesionales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intraoculares, u otros modos de administración.
- 15
- 20 Para la inyección, los agentes de la revelación se pueden formular y diluir en soluciones acuosas tales como en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para dicha administración transmucosa, en la formulación, se usan penetrantes apropiados para la barrera que se vaya a atravesar. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.
- 25 El uso de vehículos inertes farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos descritos en la presente memoria para la práctica de la revelación a dosis adecuadas para una administración sistémica está dentro del alcance de la revelación. Con la elección apropiada de vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente revelación, en particular, aquellas formuladas como soluciones, se pueden administrar parenteralmente, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos se pueden formular fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica a dosis adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten formular los compuestos de la revelación en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte del paciente que se vaya a tratar.
- 30
- 35 Para administración nasal o por inhalación, los agentes de la revelación también se pueden formular mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, ejemplos de sustancias solubilizantes, diluyentes o dispersantes tales como solución salina, conservantes, tales como alcohol bencílico, promotores de la absorción y fluorocarbonos.
- 40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo deseado. La determinación de las cantidades eficaces es competencia de los expertos en la técnica, especialmente, a la luz de la revelación detallada proporcionada en la presente memoria.
- 45 Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se puedan usar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para una administración oral pueden estar en forma de comprimidos, grageas, cápsulas o soluciones.
- 50 Las preparaciones farmacéuticas para un uso oral se pueden obtener combinando los compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir adyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio (CMC) y/o polivinilpirrolidona (PVP: povidona). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal del mismo tal como alginato sódico.
- 55 Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol (PEG) y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir materias colorantes o pigmentos a los comprimidos o a las cubiertas de las grageas para identificar o caracterizar las diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.
- Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras de gelatina, así como cápsulas blandas selladas de gelatina, y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden

contener los ingredientes activos mezclados con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos (PEG). Además, se pueden añadir estabilizantes.

5 Dependiendo de la afección o el estado patológico en particular que se vaya a tratar o prevenir, se pueden administrar agentes terapéuticos adicionales, normalmente administrados para tratar o prevenir esa afección, junto con los inhibidores de la presente revelación. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos u otros agentes anti-proliferativos se pueden combinar con los inhibidores de la presente revelación para tratar enfermedades proliferativas y cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos conocidos incluyen, pero sin limitación, 10 adriamicina, dexametasona, vincristina, ciclofosfamida, fluorouracilo, topotecán, taxol, interferones y derivados del platino.

Otros ejemplos de agentes con los que también se pueden mezclar los inhibidores de la presente revelación incluyen, sin limitación, agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides, bloqueadores de TNF, IL-1 RA, azatioprina, ciclofosfamida y sulfasalazina; inmunomoduladores y agentes inmunosupresores tales como 15 ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, micofenolato mofetil, interferones, corticosteroides, ciclofosfamida, azatioprina y sulfasalazina; factores neurotróficos tales como inhibidores de acetilcolinesterasa, inhibidores de MAO, interferones, anticonvulsivos, bloqueadores de canales iónicos, riluzol y agentes anti-parkinsonianos; agentes para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como beta-bloqueadores, inhibidores de ACE, diuréticos, nitratos, 20 bloqueadores de canales de calcio y estatinas; agentes para tratar la enfermedad hepática tales como corticosteroides, colestiramina, interferones y agentes anti-virales; agentes para el tratamiento de trastornos sanguíneos tales como corticosteroides, agentes anti-leucémicos y factores de crecimiento; agentes para el tratamiento de la diabetes tales como insulina, análogos de insulina, inhibidores de alfa glucosidasa, biguanidas y sensibilizadores a la insulina; y agentes para tratar trastornos de inmunodeficiencia tales como gammaglobulina.

Estos agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de una pauta de dosificación múltiple, de 25 la composición que contiene el inhibidor. Alternativamente, estos agentes pueden ser parte de una única forma de dosificación, mezclados con el inhibidor en una sola composición.

El alcance de la presente revelación no se limita a las realizaciones ejemplificadas, que pretenden ser ilustraciones de aspectos únicos de la revelación. De hecho, hay diversas modificaciones de la revelación, además de las 30 descritas en la presente memoria, que serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la revelación anterior. Se pretende que dichas modificaciones queden englobadas por el alcance de la revelación. Además, se pueden combinar una o más características de cualquier realización de la revelación con una o más de otras características de cualquier otra realización de la revelación sin apartarse del alcance de la misma. Por ejemplo, los triazoles bicíclicos moduladores de quinasas descritos en el apartado de Triazoles bicíclicos moduladores de 35 quinasas son igualmente aplicables a los procedimientos de tratamiento y a los procedimientos de inhibición de quinasas descritos en la presente memoria. Las referencias citadas en la presente solicitud son ejemplos del nivel de experiencia en la técnica, y se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad a todos los efectos, bien se hayan incorporado específicamente con anterioridad o no.

Ensayos

Los compuestos de la presente revelación se pueden analizar fácilmente para determinar su capacidad para 40 modular proteínas quinasas, para unirse a proteínas quinasas y/o para prevenir el crecimiento o la proliferación celular. A continuación, se presentan algunos ejemplos de ensayos útiles.

Ensayos de unión e inhibición de quinasas

La inhibición de diversas quinasas se mide mediante procedimientos conocidos por los expertos habituales en la 45 técnica, tales como los diversos procedimientos presentados en la presente memoria y los descritos en la publicación "Upstate Kinase Assay Protocols", junio de 2003.

Por ejemplo, cuando se realizan ensayos *in vitro*, la quinasa se diluye comúnmente a la concentración apropiada para formar la solución de quinasa. Se añade un sustrato para quinasas y un donante de fosfato, tal como ATP, a la solución de quinasa. Se permite que la quinasa transfiera un fosfato al sustrato de quinasa para formar sustrato fosforilado. La formación de un sustrato fosforilado se puede detectar directamente mediante cualquier 50 procedimiento adecuado tal como radioactividad (por ejemplo, [32 P-ATP]) o el uso de anticuerpos secundarios detectables (por ejemplo, ELISA). Alternativamente, la formación de un sustrato fosforilado se puede detectar mediante cualquier técnica apropiada tal como la detección de la concentración de ATP (por ejemplo, sistema de ensayo Kinase-Glo® (Promega)). Los inhibidores de quinasa se identifican mediante la detección de la formación de un sustrato fosforilado en presencia y en ausencia de un compuesto de prueba (véase el apartado de Ejemplos que 55 figura más adelante).

La capacidad del compuesto para inhibir una quinasa en una célula también se puede analizar con procedimientos ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden poner en contacto células que contengan una quinasa con un agente de activación (tal como un factor de crecimiento) que active la quinasa. La cantidad de sustrato

fosforilado intracelular formado en ausencia y en presencia del compuesto de prueba se puede determinar mediante la lisis de las células y la detección de la presencia de sustrato fosforilado mediante cualquier procedimiento apropiado (por ejemplo, ELISA). Cuando la cantidad de sustrato fosforilado producido en presencia del compuesto de prueba se reduce con respecto a la cantidad producida en ausencia del compuesto de prueba, se indica la inhibición de la quinasa. En el apartado de Ejemplos que figura más adelante, se describen ensayos con quinasas celulares de manera más detallada.

Para medir la unión de un compuesto a una quinasa, se puede usar cualquier procedimiento conocido por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un kit de ensayo fabricado por Discoverx (Fremont, CA), el kit de ensayo de unión a una enzima ED-Staurosporine NSIP® (véase la patente estadounidense n.º 5.643.734). La actividad quinasa también se puede analizar como en la patente estadounidense n.º 6.589.950, concedida el 8 de julio de 2003.

Los inhibidores adecuados de quinasas se pueden seleccionar de los compuestos de la revelación por medio del rastreo cristalográfico de proteínas, según lo revelado, por ejemplo, en Antonysamy *et al.*, publicación PCT n.º WO03087816A1, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad a todos los efectos.

Los compuestos de la presente revelación se pueden rastrear por ordenador para analizar y visualizar su capacidad para unirse a y/o inhibir diversas quinasas. La estructura se puede rastrear por ordenador con una pluralidad de compuestos de la presente invención para determinar su capacidad para unirse a una quinasa en diversos sitios. Dichos compuestos se pueden usar como dianas o dirigir los esfuerzos de química médica para identificar, por ejemplo, los inhibidores de posible importancia terapéutica (Travis, *Science*, 262:1374, 1993). Las estructuras tridimensionales de dichos compuestos se pueden superponer en una representación tridimensional de las quinasas, o un sitio activo o en la cavidad de las mismas para determinar si el compuesto se adapta espacialmente a la representación y, por lo tanto, a la proteína. En este rastreo, se puede evaluar la calidad del ajuste de dichas entidades o compuestos a la cavidad de unión bien mediante complementariedad de la forma o mediante la energía de interacción estimada (Meng *et al.*, *J. Comp. Chem.* 13:505-24, 1992).

El rastreo de los compuestos de la presente revelación que se unen a y/o modulan quinasas (por ejemplo, inhiben o activan quinasas) según la presente revelación general implica la consideración de dos factores. En primer lugar, el compuesto debe ser capaz de asociarse física y estructuralmente, bien covalente o no covalentemente, con las quinasas. Por ejemplo, las interacciones covalentes pueden ser importantes para el diseño de inhibidores irreversibles o suicidas de una proteína. Las interacciones moleculares no covalentes importantes en la asociación de las quinasas con el compuesto incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas. En segundo lugar, el compuesto debe ser capaz de adoptar una conformación y una orientación con respecto a la cavidad de unión que le permita asociarse con las quinasas. Aunque ciertas partes del compuesto no participarán directamente en la asociación con las quinasas, esas partes todavía pueden influir en la configuración global de la molécula y pueden tener un impacto significativo en la potencia. Los requisitos de configuración incluyen la estructura tridimensional global y la orientación del grupo o compuesto químico en relación con toda o una porción de la cavidad de unión, o el espacio entre los grupos funcionales de un compuesto que comprende varios grupos químicos que interactúan directamente con las quinasas.

Los programas de acoplamiento descritos en la presente memoria, tales como, por ejemplo, DOCK o GOLD, se usan para identificar compuestos que se unen al sitio activo y/o a la cavidad de unión. Los compuestos se pueden rastrear frente a más de una cavidad de unión de la estructura proteica o más de un conjunto de coordenadas para la misma proteína, teniendo en cuenta las diferentes configuraciones moleculares dinámicas de la proteína. Luego se puede usar la puntuación de consenso para identificar los compuestos que mejor se ajusten a la proteína (Charifson, P. S. *et al.*, *J. Med. Chem.* 42: 5100-9 (1999)). Los datos obtenidos a partir de más de una estructura de molécula de proteína también se pueden puntuar según los procedimientos descritos en Klingler *et al.*, solicitud de utilidad estadounidense, presentada el 3 de mayo 2002, titulada "Computer Systems and Methods for Virtual Screening of Compounds". Los compuestos que tienen el mejor ajuste se obtienen luego del productor del banco químico, o se sintetizan, y se usan en ensayos de unión y bioensayos.

Las técnicas de modelización por ordenador se pueden usar para evaluar el posible efecto de modulación o de unión de un compuesto químico sobre las quinasas. Si la modelización por ordenador indica una fuerte interacción, entonces, se puede sintetizar la molécula, y analizar su capacidad para unirse a quinasas y afectar (por inhibición o activación) a su actividad.

Los compuestos moduladores u otros compuestos de unión a quinasas se pueden por ordenador mediante una serie de etapas en las que se rastrean grupos o fragmentos químicos y se seleccionan en cuanto a su capacidad para asociarse con cada cavidad de unión u otras zonas de las quinasas. Este procedimiento puede comenzar por la inspección visual de, por ejemplo, el sitio activo en la pantalla del ordenador en base a las coordenadas de las quinasas. A continuación, se pueden disponer los fragmentos o grupos químicos seleccionados en una variedad de orientaciones, o acoplarse, dentro de una determinada cavidad de unión de las quinasas (Blaney, J. M. y Dixon J. S., "Perspectives in Drug Discovery and Design", 1: 301, 1993). Es posible realizar un acoplamiento manual con un programa informático tal como Insight II (Accelrys, San Diego, CA) Ministerio de Educación (Chemical Computing Group, Inc., Montreal, Quebec, Canadá); y SYBYL (Tripos, Inc., St. Louis, MO, 1992), seguido de la minimización de

energía y/o la dinámica molecular con campos de fuerzas mecánicas moleculares estándar tales como CHARMM (Brooks, *et al.*, *J. Comp. Chem.* 4:187-217, 1983), AMBER (Weiner, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 106: 765-84, 1984) y C² MMFF (Merck Molecular Force Field; Accelrys, San Diego, CA). Se puede efectuar un acoplamiento más automatizado mediante el uso de programas tales como DOCK (Kuntz *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 161: 269-88, 1982; DOCK está disponible de la Universidad de California, San Francisco, CA); AUTODOCK (Goodsell y Olsen, "Proteins: Structure, Function, and Genetics", 8:195-202, 1990; AUTODOCK se encuentra disponible en Scripps Research Institute, La Jolla, CA); GOLD (Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC); Jones *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 245:43-53, 1995); y FLEXX (Tripos, St. Louis, MO; Rarey, M., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 261:470-89, 1996). Otros programas adecuados se describen, por ejemplo, en Halperin *et al.*

10 Durante la selección de los compuestos mediante los procedimientos anteriores, se puede analizar y optimizar la eficacia con la cual ese compuesto puede unirse a quinasas mediante evaluación informatizada. Por ejemplo, un compuesto que ha sido diseñado o seleccionado para funcionar como un inhibidor de quinasas puede ocupar un volumen que no se solape el volumen ocupado por los residuos del sitio activo cuando el sustrato nativo está unido. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que existe cierta flexibilidad, lo que permite la reordenación de las cadenas principales y las cadenas laterales. Además, el experto puede diseñar compuestos que podrían aprovechar el reordenamiento de la proteína tras la unión, produciendo, por ejemplo, un ajuste inducido. Un inhibidor de quinasa eficaz puede demostrar una diferencia relativamente pequeña en la energía entre el estado de unión y libre (es decir, debe tener una baja energía de deformación de la unión y/o una baja deformación de la configuración tras la unión). Por lo tanto, los inhibidores de quinasa más eficientes se deberían diseñar, por ejemplo, con una energía de deformación de unión no superior a 10 kcal/mol, no superior a 7 kcal/mol, no superior a 5 kcal/mol o no superior a 2 kcal/mol. Los inhibidores de quinasas pueden interactuar con la proteína en más de una configuración que tenga una energía de unión total similar. En esos casos, la energía de deformación de la unión se toma como la diferencia entre la energía del compuesto libre y la energía media de las configuraciones observadas cuando el inhibidor se une a la enzima.

25 Hay programas informáticos específicos disponibles en la técnica para evaluar la energía de deformación y la interacción electrostática de un compuesto. Los ejemplos de programas diseñados para dichos usos incluyen: Gaussian 94, revisión C (Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA. ©1995); AMBER, versión 7. (Kollman, Universidad de California, San Francisco, ©2002); QUANTA/CHARMM (Accelrys, Inc., San Diego, CA, ©1995); Insight II/Discover (Accelrys, Inc., San Diego, CA, ©1995); DelPhi (Accelrys, Inc., San Diego, CA, ©1995); y AMSOL (Universidad de Minnesota) (Quantum Chemistry Program Exchange, Universidad de Indiana). Estos programas se pueden implantar, por ejemplo, usando una estación de trabajo informatizada como las conocidas en la técnica, por ejemplo, una estación de trabajo LINUX, SGI o Sun. Los expertos en la técnica conocerán otros sistemas de hardware y programas informáticos.

35 Los expertos en la técnica pueden expresar la proteína quinasa mediante procedimientos conocidos en la técnica y los procedimientos descritos en la presente memoria. Los polipéptidos quinasa nativos y mutados descritos en la presente memoria se pueden sintetizar químicamente total o parcialmente usando técnicas que son ampliamente conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Principles", WH Freeman & Co., NY, 1983).

40 Para la síntesis de polipéptidos nativos y mutados, se pueden usar sistemas de expresión génica. Se pueden preparar vectores de expresión que contengan la secuencia codificante del polipéptido nativo o mutado y las señales de control de la transcripción/traducción apropiadas, que son conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2001, y Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989.

45 Para expresar quinasas, se pueden usar sistemas vectoriales de expresión en huéspedes. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con ADN recombinante de bacteriófago, vectores de expresión de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen la secuencia de codificación; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia de codificación; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia de codificación; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión virales recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia de codificación; o sistemas de células animales. La proteína también se puede expresar en sistemas de terapia de genes humanos, incluyendo, por ejemplo, la expresión de la proteína para aumentar la cantidad de la proteína en un individuo o para expresar una proteína terapéutica diseñada genéticamente. Los elementos de expresión de estos sistemas varían en cuanto a fuerza y especificidades.

60 Los vectores específicamente diseñados permiten el lanzamiento de ADN entre huéspedes tales como células de levadura en bacterias o células de animales en bacterias. Un vector de expresión construido apropiadamente debe contener: un origen de replicación para la replicación autónoma en células huésped, uno o más marcadores seleccionables, un número limitado de sitios útiles de enzimas de restricción, el potencial de un alto número de

copias y promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige la ARN polimerasa para que se una al ADN e inicie la síntesis de ARN. Un promotor potente es aquel que produce el inicio de los ARNm a alta frecuencia.

5 El vector de expresión también puede comprender diversos elementos que afectan a la transcripción y la traducción, incluyendo, por ejemplo, promotores constitutivos e inducibles. Estos elementos suelen depender del huésped y/o del vector. Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tales como el promotor T7, pL del bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares; cuando se clonan en sistemas de células de insectos, se pueden usar promotores tales como el promotor de la polihedrina de baculovirus; cuando se clonan en sistemas de células vegetales, se pueden usar los promotores derivados del genoma de células vegetales (por ejemplo, promotores de choque térmico; el promotor de la subunidad pequeña de RUBISCO; el promotor de la proteína de unión a la clorofila a/b) o de virus vegetales (por ejemplo, el promotor de ARN 35S de CaMV; el promotor de la proteína de la cubierta de TMV); cuando se clonan en sistemas de células de mamíferos, se pueden usar promotores de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o promotores de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; promotor 7.5K del virus vaccinia; promotor SV40; 10 promotor del virus del papiloma bovino; y el promotor del virus de Epstein-Barr).

Se pueden usar varios procedimientos para introducir el vector en células huésped, por ejemplo, transformación, transfección, infección, fusión de protoplastos y electroporación. Las células que contienen los vectores de expresión se propagan clonalmente y se analizan individualmente para determinar si producen los polipéptidos apropiados. Se pueden usar diversos procedimientos de selección, incluyendo, por ejemplo, la resistencia a antibióticos, para 20 identificar células huésped que se hayan transformado. La identificación de clones de células huésped que expresen el polipéptido se puede realizar mediante varios procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, la reactividad inmunológica con anticuerpos contra la quinasa y la presencia de actividad asociada con la célula huésped.

La expresión de ADNc también se puede realizar utilizando ARNm sintético producido *in vitro*. El ARNm sintético puede traducirse eficazmente en diversos sistemas libres de células, incluyendo, pero sin limitación, extractos de germen de trigo y extractos de reticulocitos, así como traducirse eficazmente en sistemas basados en células, 25 incluyendo, pero sin limitación, la microinyección en oocitos de rana.

Para determinar la/s secuencia/s de ADNc que produce/n niveles óptimos de actividad y/o proteína, se preparan moléculas de ADNc modificadas. Un ejemplo no restrictivo de un ADNc modificado es aquel en el que se ha optimizado el uso de codones en el ADNc para la célula huésped en la que se expresará el ADNc. Las células huésped se transforman con las moléculas de ADNc, y se miden los niveles de RNA de quinasa y/o de proteína. 30

Los niveles de la proteína quinasa en células huésped se cuantifican mediante una variedad de procedimientos tales como técnicas de inmunoafinidad y/o de afinidad por ligandos, perlas de afinidad específicas de una quinasa o el uso de anticuerpos específicos para aislar proteína marcada con ³⁵S-metionina o sin marcar. La proteína marcada o no marcada se analiza mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS. La proteína no marcada se detecta mediante transferencia Western, ELISA o RIA empleando anticuerpos específicos. 35

Tras la expresión de la quinasa en una célula huésped recombinante, se pueden recuperar los polipéptidos para proporcionar la proteína en forma activa. Hay varios procedimientos de purificación disponibles y adecuados para su uso. Se puede purificar la quinasa recombinante a partir de lisados celulares o del medio de cultivo acondicionado mediante diversas combinaciones de, o la aplicación individual de, etapas de fraccionamiento o de cromatografía que son conocidas en la técnica. 40

Además, la quinasa recombinante se puede separar de otras proteínas celulares mediante el uso de una columna de inmunoafinidad hecha con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de la proteína naciente de longitud completa o fragmentos polipeptídicos de la misma. También se pueden usar otras técnicas purificación basadas en la afinidad conocidas en la materia.

45 Alternativamente, se pueden recuperar los polipéptidos a partir de una célula huésped en forma desplegada inactiva, por ejemplo, a partir de cuerpos de inclusión de bacterias. Las proteínas recuperadas de esta forma se pueden disolver usando un desnaturizante, por ejemplo, clorhidrato de guanidinio, y después volverlas a plegar en una forma activa mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica tales como la diálisis.

Ensayos de Crecimiento Celular

50 Hay una variedad de ensayos de crecimiento celular conocidos en la técnica que son útiles en la identificación de compuestos de triazol bicíclicos (es decir, "compuestos de prueba") capaces de inhibir (por ejemplo, reducir) el crecimiento y/o proliferación celular.

Por ejemplo, se conoce una variedad de células que requieren quinazinas específicas para su crecimiento y/o proliferación. Es posible evaluar la capacidad de una célula para crecer en presencia de un compuesto de prueba y compararla con el crecimiento en ausencia del compuesto de prueba, identificando de este modo las propiedades anti-proliferativas del compuesto de prueba. Un procedimiento común de este tipo consiste en medir el grado de incorporación de un marcador, tal como timidina tritiada, en el ADN de células en división. Alternativamente, se 55

5 puede analizar la inhibición de la proliferación celular mediante la determinación de la actividad metabólica total de células con un marcador alternativo que se correlacione con el número de células. Las células se pueden tratar con un indicador metabólico en presencia y en ausencia del compuesto de prueba. Las células viables metabolizan el indicador metabólico, formando de este modo un producto metabólico detectable. La reducción de los niveles detectables de productos metabólicos en presencia del compuesto de prueba con respecto a la ausencia del compuesto de prueba indica la inhibición del crecimiento y/o la proliferación celular. Los ejemplos de indicadores metabólicos incluyen, por ejemplo, sales de tetrazolio y AlamarBlue® (véase el siguiente apartado de Ejemplos).

10 Un ensayo para las quinasas que estimulan la migración celular es el ensayo de rayado. Este ensayo se usa para evaluar los inhibidores de quinasas mediante la imitación de eventos tales como la cicatrización de heridas. En una variante de este ensayo usada para probar los inhibidores de MET, se permite la formación de una monocapa confluyente de células sobre una placa celular. Tras la formación de la monocapa, se genera una herida lineal sobre la monocapa raspando mecánicamente la misma, mediante lo que se forma un canal libre de células. Se añade un factor de crecimiento requerido por la quinasa para el crecimiento celular en la presencia o en ausencia del compuesto de prueba. El cierre del canal en la presencia del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba no inhibe la quinasa, lo que permite la migración y el crecimiento celular para cerrar el canal. Por el contrario, la presencia del canal tras la adición del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba inhibe la quinasa, evitando así el crecimiento celular. La selección de las células, las condiciones de crecimiento y los factores de crecimiento adecuados es competencia de los expertos en la técnica (véase el siguiente apartado de Ejemplos).

Preparación de compuestos moduladores de proteínas quinasas

20 Síntesis ejemplar

Los compuestos de la revelación se sintetizan mediante una combinación apropiada de procedimientos sintéticos generalmente bien conocidos. Las técnicas útiles en la síntesis de los compuestos de la revelación son tanto evidentes como accesibles para los expertos en la técnica relevante. La siguiente descripción se ofrece para ilustrar algunos de los diversos procedimientos disponibles para su uso en la preparación de los compuestos de la revelación. Sin embargo, la descripción no pretende definir el alcance de las reacciones ni de las secuencias de reacción que son útiles en la preparación de los compuestos de la presente revelación. Los compuestos de la presente revelación se pueden preparar mediante los procedimientos y las técnicas descritos en el siguiente apartado de Ejemplos, así como mediante técnicas conocidas de síntesis orgánica.

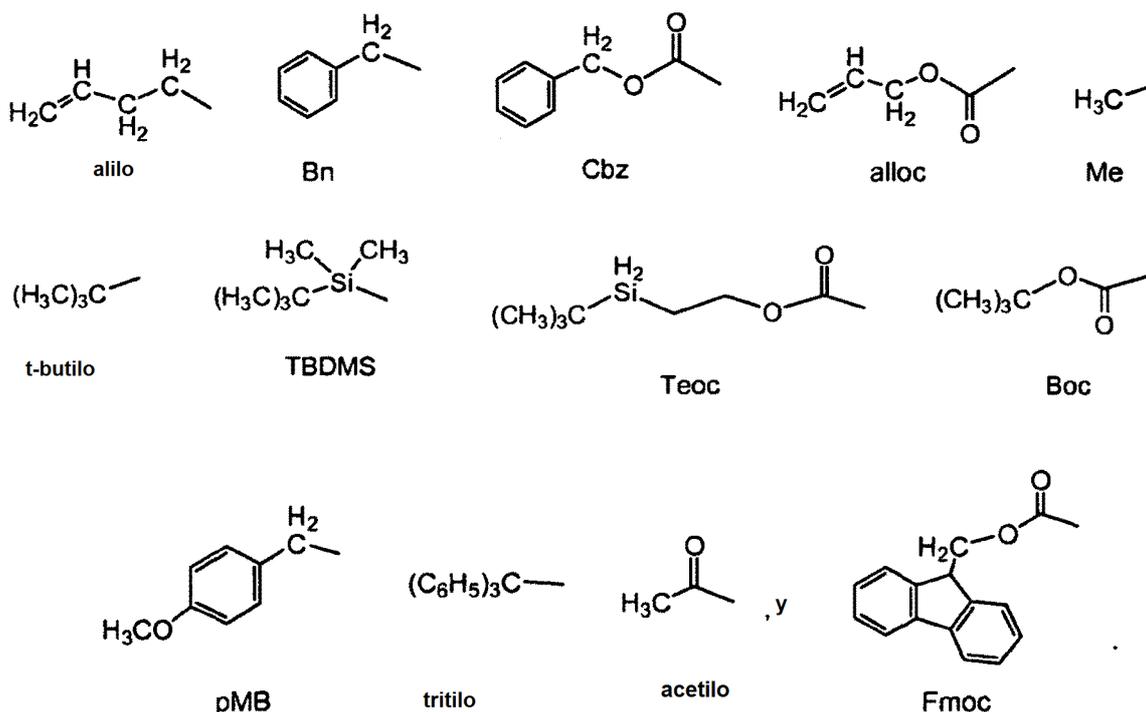
Grupos protectores

30 Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar usando uno o más grupos protectores generalmente conocidos en la técnica de la síntesis química. La expresión "grupo protector" se refiere a restos químicos que bloquean algunos o todos los restos reactivos de un compuesto y evitan que dichos restos participen en reacciones químicas hasta que el grupo protector se elimina, por ejemplo, aquellos restos enumerados y descritos en Greene, *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis", III ed. John Wiley & Sons (1999). Puede ser ventajoso, cuando se emplean diferentes grupos protectores, que cada grupo (diferente) protector se pueda retirar mediante un medio diferente. Los grupos protectores que se escinden en condiciones de reacción totalmente dispares permiten la eliminación diferencial de dichos grupos protectores. Por ejemplo, los grupos protectores pueden eliminarse por un ácido, una base e hidrogenólisis. Los grupos tales como tritilo, dimetoxitritilo, acetal y *t*-butildimetilsililo son lábiles en medio ácido y se pueden usar para proteger los restos reactivos carboxilo e hidroxilo en presencia de grupos amino protegidos con grupos Cbz, que se pueden retirar mediante hidrogenólisis, y grupos Fmoc, que son lábiles en medio básico. Los restos reactivos de ácido carboxílico e hidroxilo se pueden bloquear con grupos lábiles en medio básico, tales como, sin limitación, metilo, etilo y acetilo, en presencia de aminas bloqueadas con grupos lábiles en medio ácido tales como *t*-butil-carbamato o con carbamatos que son estables en medios tanto ácido como básicos, pero que se retiran hidrolíticamente.

45 Los restos reactivos de ácido carboxílico e hidroxilo también se pueden bloquear con grupos protectores hidrolíticamente extraíbles tales como el grupo bencilo, mientras que los grupos amino capaces unirse mediante puentes de hidrógeno con los ácidos se pueden bloquear con grupos lábiles en medio básico, tales como Fmoc. Los restos reactivos de ácido carboxílico se pueden bloquear con grupos protectores oxidativamente extraíbles tales como 2,4-dimetoxibencilo, mientras que los grupos amino coexistentes se pueden bloquear con sililcarbamatos lábiles en medios fluorados.

55 Los grupos de bloqueo de alilo son útiles en presencia de grupos protectores de ácido y base, ya que los primeros son estables y se pueden eliminar posteriormente mediante catalizadores de metales o ácido pi. Por ejemplo, un ácido carboxílico bloqueado con alilo se puede desproteger con una reacción catalizada con un catalizador de paladio (0) en presencia de grupos protectores de *t*-butil-carbamato lábil en medio ácido, o de acetato o amina lábiles en medios básicos. Sin embargo, otra forma de grupo protector es una resina a la que se puede unir un compuesto o compuesto intermedio. Mientras el residuo está unido a la resina, ese grupo funcional está bloqueado y no puede reaccionar. Una vez retirado de la resina, el grupo funcional está preparado para reaccionar.

Los grupos bloqueadores o protectores más comunes incluyen, por ejemplo:

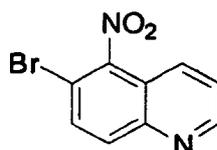


Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la revelación. La preparación de las realizaciones de la presente revelación se describe en los siguientes ejemplos. Los expertos habituales en la técnica entenderán que las reacciones químicas y los procedimientos de síntesis proporcionados se pueden modificar para preparar muchos de los otros compuestos de la presente revelación. Para los compuestos de la presente revelación que no se hayan ejemplificado, aquéllos expertos habituales en la técnica reconocerán que estos compuestos se pueden preparar mediante la modificación de los procedimientos de síntesis presentados en la presente memoria y mediante el uso de los procedimientos de síntesis conocidos en la técnica. Los ejemplos 2, 3, 11, 14 y 19 se refieren a compuestos intermedios.

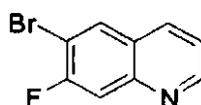
Ejemplo 1: Preparación de los compuestos intermedios

Compuesto intermedio 1: 6-Bromo-5-nitro-quinolina



15 Se enfrió una solución de 6-bromoquinolina (2,0 g, 9,61 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (1,0 ml) hasta 0°C. Se añadió nitrito de sodio (27 mg, 0,384 mmol), tras lo que se añadió ácido nítrico concentrado en gotas (0,8 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 45 min, luego a temperatura ambiente durante 1 h, antes de verterla sobre hielo, dando como resultado un precipitado amarillo. Se neutralizó la mezcla hasta un pH 7 con hidróxido de amonio. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se secó al vacío, produciendo 2,26 g de 6-bromo-5-nitro-quinolina en forma de un sólido verde claro (rendimiento del 93%): RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,62 (dd, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,07 (d, 1H), 8,1,7 (d, 1H), 9,06 (dd, 1H); MS (*m/z*) 253, 255 [M+H]⁺.

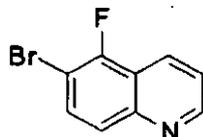
Compuesto intermedio 2: 6-Bromo-7-fluoro-quinolina



25 Se calentó lentamente una mezcla de 4-bromo-3-fluoroanilina (2,85 g, 1,5 mmol), sulfato férrico (0,95 g, 6,25 mmol), glicerol (5,66 g, 61 mmol), nitrobenceno (0,93 ml, 9,1 mmol) y ácido sulfúrico concentrado (2,61 ml). Tras la primera reacción vigorosa, se hirvió la mezcla durante 7 h. Luego se evaporó el nitrobenceno al vacío. Se acidificó la solución acuosa con ácido acético helado, y se separó un precipitado marrón, que se recogió y se purificó mediante

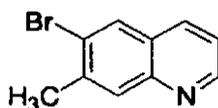
cromatografía de desorción súbita (gel de sílice, petróleo/acetato de etilo = 8/1), dando 1,44 g de 6-bromo-7-fluoro-quinolina en forma de cristales blancos (rendimiento del 42,5%).

Compuesto intermedio 3: 6-Bromo-5-fluoro-quinolina



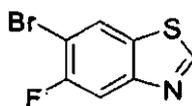
- 5 Se calentó lentamente una mezcla de 4-bromo-3-fluoroanilina (1,00 g, 526 mmol), 30 g de sulfato ferroso, 200 g de glicerol, 40 g de nitrobenzoceno y 1,00 ml de ácido sulfúrico concentrado. Tras la primera reacción vigorosa, se hirvió la mezcla durante cinco horas. Se retiró el nitrobenzoceno mediante destilación al vacío. Se acidificó la solución acuosa con ácido acético helado y se separó un precipitado marrón oscuro, que se purificó mediante cromatografía de desorción súbita (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo = 12/1), dando una mezcla de 6-bromo-7-fluoro-quinolina y 6-bromo-5-fluoro-quinolina en forma de un sólido blanco (80 g, 68%). Se calentó la mezcla hasta el reflujo en éter de petróleo. Se enfrió la solución hasta temperatura ambiente y se filtró para recoger 6-bromo-7-fluoro-quinolina. Se añadió HCl/metanol al filtrado, y se filtró el precipitado blanco resultante. Se basificó el sólido blanco, se recogió mediante filtración y se secó, obteniéndose 6-bromo-5-fluoro-quinolina en forma de un sólido blanco. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 9,0 (d, 1H), 8,5 (d, 1H), 8,0 (m, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,7 (m, 1H).

15 **Compuesto intermedio 4: 6-Bromo-7-metil-quinolina**



- 20 Se calentó lentamente una mezcla de 4-bromo-3-metil-anilina (20 g, 107,5 mmol), sulfato férrico (6,6 g, 43,4 mmol), glicerol (40,8 g, 440 mmol), nitrobenzoceno (8,12 g, 66 mmol) y ácido sulfúrico concentrado (23 ml). Tras la primera reacción vigorosa, se hirvió la mezcla durante 3 h y luego se evaporó para eliminar el nitrobenzoceno en exceso. Se añadió la solución a solución acuosa saturada de bicarbonato sódico hasta un pH = 7-8, luego se filtró la solución y se extrajo con diclorometano. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío. Se purificó el sólido mediante cromatografía de desorción súbita, dando un sólido amarillo, que se volvió a lavar con éter de petróleo, dando 7,5 g de 6-bromo-7-metil-quinolina (rendimiento del 31%): RMN de ^1H (CDCl_3) δ 2,60 (s, 3H), 7,36 (m, 1H), 7,96 (s, 1, H), 8,04 (m, 2H), 8,89 (m, 1H).

25 **Compuesto intermedio 5: 6-Bromo-5-fluoro-benzotiazol**



Etapa 1: 6-Bromo-5-fluoro-benzotiazol-2-ilamina

- 30 A una solución de 4-bromo-3-fluoro-anilina (3,68 g, 19,37 mmol) en AcOH glacial (40 ml), se añadió tiocianato de amonio (2,95 g, 38,74 mmol). Cuando la mezcla de reacción estaba casi transparente, se colocó en un baño de agua fría y se añadió una solución de bromo (3,1 g, 19,37 mmol) en AcOH glacial (1,0 ml) en gotas durante un periodo de 1,0 min. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h, luego se concentró al vacío. Se dividió el residuo entre KOH 1N acuoso y acetato de etilo. Luego se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo, y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-70%/hexano proporcionó 2,73 g de 6-bromo-5-fluoro-benzotiazol-2-ilamina en forma de un sólido amarillo claro (rendimiento del 57%): RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 7,29 (d, 1H), 7,78 (s ancho, 2H), 7,99 (d, 1H); MS (m/z) 247, 249 [$\text{M}+\text{H}^+$] $^+$.

Etapa 2: 6-Bromo-5-fluoro-benzotiazol

- 40 A una solución de 6-bromo-5-fluoro-benzotiazol-2-ilamina (2,73 g, 11,05 mmol) en DMF (60 ml) se añadió *terc*-butilnitrito (1,58 ml, 13,26 mmol) en gotas. Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 3 h, luego se concentró el vacío. Se agitó el residuo en KOH 1N acuoso durante 1,0 min, después se añadió acetato de etilo y se agitó la mezcla durante una noche. Se filtraron las sustancias insolubles, se lavaron con agua, y luego con acetato de etilo. Se separó el filtrado resultante, y se lavó la capa orgánica con salmuera y se adsorbió directamente sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-30%/hexano proporcionó 1,33 g de 6-bromo-5-fluoro-benzotiazol en forma de un sólido amarillo claro (rendimiento del 52%): RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 8,1,3 (d, 1H), 8,63 (d, 1H), 9,50 (s, 1H); MS (m/z) 232, 234 [$\text{M}+\text{H}^+$] $^+$.

Compuesto intermedio 6: 6-Bromo-5-metil-benzotiazol y 6-Bromo-7-metil-benzotiazol



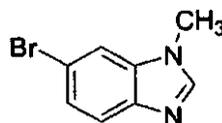
Etapa 1: 6-Bromo-5-metil-benzotiazol-2-ilamina y 6-Bromo-7-metil-benzotiazol-2-ilamina

5 A una solución de 4-bromo-3-metil-anilina (9,68 g, 52,02 mmol) en AcOH glacial (1,50 ml), se añadió tiocianato de amonio (7,92 g, 104,04 mmol). Cuando la mezcla de reacción estaba casi transparente, se colocó en un baño de agua fría y se añadió una solución de bromo (2,67 ml, 52,02 mmol) en AcOH glacial (5 ml) en gotas. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con AcOH. Se elevó la torta filtrante de color blanco roto en agua y se neutralizó hasta un pH 9 con NaOH 1N acuoso. Se filtró el sólido resultante, se lavó con agua y se secó al vacío, dando 4,83 g de una mezcla (4:1) de 6-bromo-7-metil-benzotiazol-2-ilamina y 6-bromo-5-metil-benzotiazol-2-ilamina respectivamente (rendimiento del 38%): EM (*m/z*) 243, 245 [M+H]⁺; 6-Bromo-7-metil-benzotiazol-2-ilamina: RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,42 (s, 3H), 7,1,0 (d, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,61, (s ancho, 2H). 6-Bromo-5-metil-benzotiazol-2-ilamina: RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,35 (s, 3H), 7,31, (s, 1H), 7,57 (s ancho, 2H), 7,88 (s, 1H).

Etapa 2: 6-Bromo-5-metil-benzotiazol y 6-Bromo-7-metil-benzotiazol

15 A una solución de mezcla 4:1 de 6-bromo-7-metil-benzotiazol-2-ilamina y 6-bromo-5-metil-benzotiazol-2-ilamina respectivamente (4,5 g, 1,86 mmol) en DMF (1,00 ml), se añadió *tert*-butilnitrilo (2,65 ml, 22,3 mmol) en gotas. Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 1,5 h, y luego se concentró al vacío. Se dividió el residuo entre carbonato de potasio acuoso 1N y acetato de etilo. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (x 3), y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-50%/hexano proporcionó 2,1 g de una mezcla 5:1 de 6-bromo-7-metil-benzotiazol y 6-bromo-5-metil-benzotiazol respectivamente (rendimiento del 50%): EM (*m/z*) 228,230 [M+H]⁺; 6-Bromo-7-metil-benzotiazol: RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,63 (s, 3H), 7,75 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 9,42 (s, 1H). 6-Bromo-5-metil-benzotiazol: RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,63 (s, 3H), 8,09 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 9,37 (s, 1H).

Compuesto intermedio 7: 6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol



25 Etapa 1: 2,4-Dibromo-1-nitro-benceno

30 A una solución enfriada con hielo de 1,3-dibromobenceno (1,0 g, 42,4 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (200 ml), se añadió nitrato de amonio (3,39 g, 42,4 mmol) en porciones. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 1,5 min, luego se vertió sobre una mezcla de agua con hielo. Se extrajo la mezcla acuosa con diclorometano (x 2). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua, luego con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (x 2), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío. Se trituró el residuo con hexano, se filtró y se secó al vacío, dando 7,63 g de 2,4-dibromo-1-nitro-benceno en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 64%): RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,62 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,95 (d, 1H).

Etapa 2: (5-Bromo-2-nitro-fenil)-metil-amina

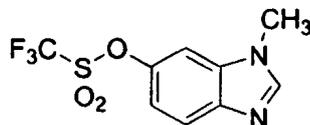
35 A una solución de 2,4-dibromo-1-nitro-benceno (2,0 g, 7,14 mmol) en etanol (50 ml), se añadió una solución acuosa de metilamina al 40% (50 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 80°C en un recipiente cerrado durante 3 h, y luego se enfrió hasta 0°C. Se añadió agua y se filtró el precipitado, se lavó con agua y se secó al vacío, dando 1,26 g de (5-bromo-2-nitro-fenil)-metil-amina en forma de un sólido naranja (rendimiento del 76%): RMN de ¹H (CDCl₃) δ 3,04 (s, 3H), 6,79 (dd, 1H), 7,03 (d, 1H), 8,05 (d, 1H), 8,0-8,1, (s ancho, 1H); EM (*m/z*) 231,233 [M+H]⁺.

Etapa 3: 6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol

40 A una suspensión de (5-bromo-2-nitro-fenil)-metil-amina (1,2 g, 5,1,9 mmol) en etanol (25 ml), se añadió cloruro de estaño (II) (1,97 g, 1,0,39 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 80°C durante 4 h, luego se concentró al vacío. Al residuo, se añadió tolueno (1,2 ml), ortoformiato de trimetilo (0,625 ml, 5,71, mmol) y ácido paratoluenosulfónico (49 mg, 0,26 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 110°C durante 1,5 h, luego se concentró al vacío y se adsorbió el residuo sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-8%/ diclorometano proporcionó 482 mg de 6-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol en forma de un sólido naranja oscuro (rendimiento del 44%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,83 (s, 3H), 7,33 (dd, 1H), 7,59 (d, 1H),

7,86 (d, 1H), 8,21, (s, 1H); EM (m/z) 21,1; 21,3 [$M+H$]⁺.

Compuesto intermedio 8: 3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico



Etapa 1: 3-Metilamino-4-nitro-fenol

5 A un recipiente a presión, se añadió 3-fluoro-4-nitro-fenol (5,0 g, 31,82 mmol) y una solución acuosa de metilamina al 40% (1,0 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 85°C durante 5 h, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió sobre agua y se acidificó hasta un pH 1, con HCl acuoso 1N. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó al vacío, dando 5,23 g de 3-metilamino-4-nitro-fenol en forma de un sólido naranja (rendimiento del 98%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,88 (d, 3H), 6,1,4 (dd, 1H), 6,1,7 (d, 1H), 7,96 (d, 1H), 8,25 (q, 1H), 1,0,8 (s ancho, 1H); EM (m/z) 1,67 [$M-H$].

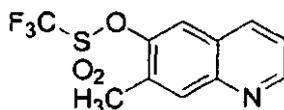
Etapa 2: 3-Metil-3*H*-benzoimidazol-5-ol

15 A una suspensión de 3-metilamino-4-nitro-fenol (300 mg, 1,786 mmol) en ácido fórmico (4 ml), se añadió hierro en polvo (1,0 g, 17,86 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante una noche, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó con metanol. Se filtraron las sustancias insolubles y se lavaron con metanol. Se concentró el filtrado al vacío y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol 0-al 1,5%/diclorometano proporcionó 249 mg de 3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-ol en forma de un sólido marrón claro (rendimiento del 94%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,71, (s, 3H), 6,69 (dd, 1H), 6,81, (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,94 (s, 1H), 9,3 (s ancho, 1H); EM (m/z) 1,49 [$M+H$]⁺.

Etapa 3: 3-Metil-3*H*-benzoimidazol-5-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

20 A una suspensión de 3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-ol (245 mg, 1,655 mmol) en THF (5 ml) en un recipiente para microondas, se añadió carbonato de potasio (41,7 mg, 3,02 mmol) y *N*-fenil-bis(trifluorometanosulfonimida) (1,1,8 g, 3,31, mmol). Se tapó el recipiente para microondas y se calentó en un reactor de microondas a 120°C durante 20 min. Se dividió la mezcla de reacción entre agua y acetato de etilo. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-40%/hexano proporcionó 235 mg de 3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un aceite marrón (rendimiento del 51,%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,88 (s, 3H), 7,28 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 8,37 (s, 1H); EM (m/z) 281, [$M+H$]⁺.

Compuesto intermedio 9: 7-Metil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico



Etapa 1: 7-Metil-quinolin-6-ol

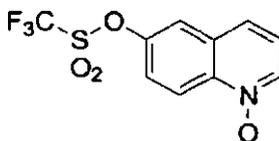
35 Se purgó un vial con nitrógeno y se cargó con 6-bromo-7-metil-quinolina (2,0 g, 9 mmol), KOH molido (2,02 g, 36 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) (1,65 mg, 0,1,8 mmol) y Xantphos (ligando Strem, 343 mg, 0,72 mmol). Se añadieron agua (6 ml) y 1,4-dioxano (6 ml) y se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 2 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se acidificó la mezcla de reacción hasta un pH 5 con HCl acuoso 1N y se extrajo con acetato de etilo (x 2). Se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo 0-100%/hexano proporcionó 1,37 g de 7-metil-quinolin-6-ol en forma de un sólido amarillo claro (rendimiento del 95%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,34 (s, 3H), 7,1,2 (s, 1H), 7,32 (dd, 1H), 7,73 (s, 1H), 8,07 (dd, 1H), 8,60 (dd, 1H), 1,0,1, (s ancho, 1H); EM (m/z) 1,60 [$M+H$]⁺.

Etapa 2: 7-Metil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

45 A una suspensión de 7-metil-quinolin-6-ol (870 mg, 5,47 mmol) en THF (10 ml), en un recipiente apto para microondas, se añadió carbonato de potasio (2,27 g, 16,41, mmol) y *N*-fenil-bis(trifluorometanosulfonimida) (3,9 g, 10,94 mmol). Se cerró el recipiente apto para microondas y se calentó en un reactor de microondas a 120°C durante 20 min. Se dividió la mezcla de reacción entre agua y acetato de etilo. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-30%/hexano proporcionó 1,48 g de 7-metil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un aceite transparente (rendimiento del 93%):

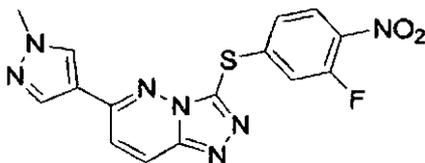
RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 2,53 (s, 3H), 7,60 (dd, 1H), 8,1,2 (s, 1H), 8,1,5 (s, 1H), 8,50 (dd, 1H), 8,97 (dd, 1H); EM (m/z) 292 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto intermedio 10: *N*-óxido de quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico



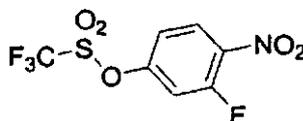
- 5 A una solución de quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (200 mg, 0,721 mmol) en diclorometano (3 ml), se añadió mCPBA (213 mg, 0,865 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h, luego se diluyó con diclorometano y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (x 3). Se adsorbió la capa orgánica sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 50-100%/hexano proporcionó 185 mg de *N*-óxido de quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un sólido blanco (rendimiento del 87%): RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 7,60 (dd, 1H), 7,91, (dd, 1H), 8,05 (d, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,68 (m, 2H); EM (m/z) 294 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto intermedio 11: 3-(3-Fluoro-4-nitro-fenil-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina



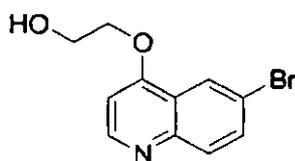
- 15 Se desgasificó una solución de 3-fluoro-4-nitro-feniléster de ácido trifluorometanosulfónico (1,51 g, 4,74 mmol), diisopropiltilamina (1,5 ml, 8,62 mmol) en DMF (14 ml) bajo nitrógeno mediante el burbujeo de nitrógeno durante 10 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (99 mg, 0,108 mmol, catalizador Strem) y Xantphos (125 mg, 0,215 mmol) conjuntamente en una porción, seguida de 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (1,0 g, 4,31 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 3 h, luego se concentró al vacío. Se dividió el residuo entre cloruro de amonio acuoso saturado y metanol al 10% en diclorometano. Se extrajo la capa acuosa con metanol al 10% en diclorometano, y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas directamente sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano proporcionó 387 mg de 3-(3-fluoro-4-nitro-fenil-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 24%): RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 3,90 (s, 3H), 7,20 (dd, 1H), 7,59 (dd, 1H), 7,87 (d, 1H), 8,06 (m, 2H), 8,46 (s, 1H), 8,54 (d, 1H); EM (m/z) 372 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto intermedio 12: 3-fluoro-4-nitro-feniléster de ácido trifluorometanosulfónico



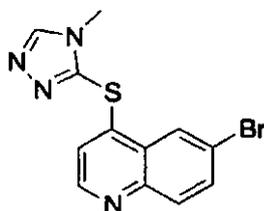
- 30 A un recipiente apto para microondas, se añadió secuencialmente 3-fluoro-4-nitrofenol (2,0 g, 12,73 mmol), carbonato de potasio (5,28 g, 38,19 mmol), *N*-fenil-bis(trifluorometanosulfonimida) (5,46 g, 15,27 mmol) y THF (10 ml). Se cerró el recipiente apto para microondas y se calentó en un reactor de microondas a 120°C durante 20 min. Se dividió la mezcla de reacción entre agua y acetato de etilo. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo y se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, luego se adsorbieron directamente sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-20%/hexano proporcionó 2,93 g de 3-fluoro-4-nitro-fenil-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un líquido amarillo claro (rendimiento del 80%): RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 7,68 (d, 1H), 8,13 (d, 1H), 8,39 (t, 1H).

Compuesto intermedio 13: 2-(6-Bromo-quinolin-4-iloxi)-etanol



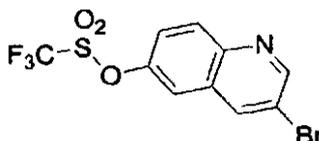
5 A una suspensión de hidruro de sodio (suspensión al 60%, 40 mg, 0,99 mmol) en DMF (3 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió etilenglicol en gotas. Se agitó la mezcla de reacción durante 20 min antes de añadir 4-cloro-6-bromoquinolina (200 mg, 0,825 mmol) en una porción. Se agitó la mezcla de reacción a 90°C durante 22 h. Se añadieron otros 20 mg de hidruro de sodio tras 1,6 h. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se disolvió el residuo en metanol y se adsorbió la solución sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano proporcionó 127 mg de 2-(6-bromoquinolin-4-iloxi)etanol en forma de un sólido blanco (rendimiento del 57%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,93 (c, 2H), 4,32 (t, 2H), 5,21, (t, 1H), 7,1,4 (d, 1H), 7,94 (m, 2H), 8,50 (d, 1H), 8,82 (d, 1H); EM (*m/z*) 268, 270 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 14: 6-Bromo-4-(4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolina



15 Se cargó un vial cerrado con 4-cloro-6-bromoquinolina (500 mg, 2,06 mmol), 4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-tiol (238 mg, 2,06 mmol), carbonato de potasio (427 mg, 3,09 mmol) y DMF (5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 18 h, y luego a 90°C durante otras 24 h, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se vertió la mezcla de reacción sobre agua (50 ml), y se filtró el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío a 70°C durante una noche, proporcionando 600 mg de 6-bromo-4-(4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido blanco (rendimiento del 91%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,63 (s, 3H), 6,90 (d, 1H), 8,02 (m, 2H), 8,40 (d, 1H), 8,74 (d, 1H), 8,92 (s, 1H); EM (*m/z*) 321, 323 [M+H]⁺.

20 **Compuesto intermedio 15: 3-Bromo-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico**



Etapla 1: Quinolin-6-ol

25 Se calentó lentamente una mezcla de 4-aminofenol (44,7 g, 0,41 mol), sulfato ferroso (14 g, 0,05 mol), glicerol (120 ml, 1,65 ml), *p*-nitrofenol (33,3 g, 0,24 mol) y ácido sulfúrico concentrado (20 ml) hasta 70°C. Luego se añadió una segunda porción de ácido sulfúrico concentrado (25 ml) en gotas a la mezcla de reacción, y se agitó la mezcla a reflujo durante 8 horas. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se basificó la mezcla de reacción hasta un pH de 5,5 con solución acuosa de hidróxido de sodio al 15% en un baño de hielo. Se filtró el precipitado resultante, se secó y se obtuvieron 25 g de quinolin-6-ol en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 42%).

Etapla 2: Quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

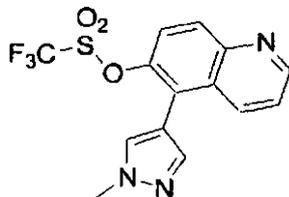
30 Se disolvió quinolin-6-ol (2,9 g, 20 mmol) en piridina (30 ml). Se enfrió la mezcla hasta 0°C en un baño de hielo bajo nitrógeno, y se añadió Tf₂O (4 ml, 24 mmol) a la mezcla de reacción lentamente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas, antes de dividirla entre diclorometano (50 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (50 ml). Se separó la fase orgánica y se lavó con salmuera (5 x 30 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, dando 3,9 g de quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un aceite marrón (rendimiento del 70%).

Etapla 3: 3-Bromo-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

40 A una mezcla de quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (3,88 g, 14 mmol) y piridina (2,26 ml, 28 mmol) en CCl₄ (50 ml), se añadió bromo (0,86 ml, 16,8 mmol) en gotas. Se calentó la mezcla hasta el reflujo durante 2 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se decantó el líquido del matraz, y se lavó con NaHCO₃ y agua. Se trató el sólido oscuro que quedó en el fondo del matraz con NaHCO₃ y diclorometano. Se volvieron a lavar las capas orgánicas combinadas con agua y se secaron antes de evaporarlas hasta la sequedad. Se purificó el producto en

bruto mediante cromatografía en columna por desorción súbita, eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (10/1~1/1), dando 1,3 g de 3-bromo-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico: RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,62 (m, 1H), 7,68 (d, 1H), 8,20 (d, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,98 (d, 1H); EM (m/z) 356 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto intermedio 16: 5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico



5

Etapa 1: 6-Metoxi-quinolina

Se calentó suavemente una mezcla de *p*-metoxianilina (24,6 g, 0,2 mol), sulfato ferroso (8,34 g, 0,03 mol), glicerol (73,6 g, 60 ml), *p*-nitrofenol (16,68 g, 0,12 mol) y ácido sulfúrico concentrado (10 ml) hasta 70°C. Luego se añadió una segunda porción de ácido sulfúrico concentrado (25 ml) en gotas a la mezcla de reacción y se agitó a reflujo durante 8 horas. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se basificó la mezcla de reacción hasta un pH de 5,5 con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 15% en un baño de hielo. Se filtró el precipitado resultante, se secó, y se obtuvieron 16 g de 6-metoxi-quinolina en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 50%).

10

Etapa 2: 5-Bromo-6-metoxi-quinolina

A una mezcla de 6-metoxi-quinolina (13,0 g, 0,082 mol) y piridina (13,2 ml, 0,164 mol) en CCl_4 (130 ml), se añadió bromo (8,4 ml, 0,164 mol) en gotas. Se calentó la mezcla hasta el reflujo durante 2 h y se enfrió hasta LA temperatura ambiente. Se decantó el líquido del matraz y se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado y agua. Se trató el sólido oscuro que quedó en el fondo del matraz con NaHCO_3 y diclorometano. Se volvieron a lavar las capas orgánicas combinadas con agua y se secaron antes de evaporarlas hasta la sequedad. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna por desorción súbita eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (10/1~1/1), dando 7 g de 5-bromo-6-metoxi-quinolina en forma de un sólido rojo (rendimiento del 36%).

15

20

Etapa 3: 6-Metoxi-5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina

Se calentó una mezcla de 5-bromo-6-metoxi-quinolina (6,5 g, 0,021 mol), pinacoléster de ácido 1-metil-4-pirazolborónico (8,74 g, 0,042 mol), Na_2CO_3 (6,687 g, 0,063 mol), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (1,7 g, 0,001 mol), H_2O (32 ml) y 1,4-dioxano (80 ml) a 100°C durante una noche. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se retiró la mayoría del dioxano al vacío. Se diluyó la mezcla con acetato de etilo (50 ml) y salmuera (50 ml). Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 250 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, dando 7 g de compuesto 6-metoxi-5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina.

25

Etapa 4: 5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ol

Se cargó un matraz con compuesto 6-metoxi-5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina (5,5 g, 0,023 mol) y diclorometano (50 ml). Se añadió una solución de tribromuro de boro (27,6 ml, solución 1M en diclorometano, 27,6 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 1,5 minutos, luego se retiró el baño refrigerante y se agitó la reacción durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción añadiendo lentamente ácido clorhídrico acuoso al 10%, luego se basificó la solución hasta un pH 6 con solución acuosa de hidróxido de sodio al 20%. Se extrajo la mezcla con acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se filtró. La extracción del disolvente dio 4 g de 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ol en forma de un sólido amarillo.

30

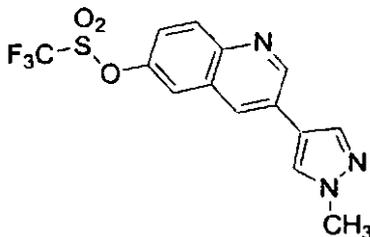
35

Etapa 5: 5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

Se disolvió 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ol (2,9 g, 12,89 mmol) en piridina (30 ml), y se enfrió la mezcla hasta 0°C en un baño de hielo bajo un flujo de nitrógeno. Se añadió Tf_2O (2,6 ml, 15,47 mmol) lentamente. Luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Se dividió la mezcla entre diclorometano (50 ml) y NaHCO_3 acuoso saturado (50 ml). Se separó la fase orgánica y se lavó con salmuera (5 x 30ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, dando 3,9 g de 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (rendimiento del 84%): RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,05 (s, 3H), 7,48~7,44 (m, 1H), 7,69~7,61, (m, 3H), 8,18 (d, 1H), 8,32 (m, 1H), 8,98 (m, 1H); EM (m/z) 358 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

40

45

Compuesto intermedio 17: 3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico**Etapas 1: Quinolin-6-il-éster de ácido acético**

5 Se disolvió quinolin-6-ol (135 g, 0,93 mol) en piridina (500 ml), y se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo bajo un flujo de nitrógeno. Se añadió lentamente cloruro de acetilo (79 ml, 1,16 mol) a la mezcla de reacción. Luego se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se dividió la mezcla entre acetato de etilo (400 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (200 ml). Se separó la fase orgánica y se lavó con salmuera (5 x 200 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, proporcionando 1,20 g de quinolin-6-il-éster de ácido acético en forma de un sólido blanco (rendimiento del 69%).

10 Etapas 2: 3-Bromo-quinolin-6-il-éster de ácido acético

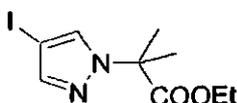
15 A una mezcla de quinolin-6-il-éster de ácido acético (120 g, 0,642 mol) y piridina (114 ml, 1,41 mol) en 6 l de CCl₄, se añadió Br₂ (66 ml, 1,28 mol) en gotas. Se calentó la mezcla hasta el reflujo durante 2 horas, antes de enfriarla hasta la temperatura ambiente. Se decantó el líquido del matraz y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado y agua. Se dividió el sólido oscuro del fondo del matraz entre acuoso NaHCO₃ y diclorometano. Se volvieron a lavar las capas orgánicas combinadas con agua y se secaron antes de evaporarlas hasta la sequedad al vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna por desorción súbita, eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (10/1~1/1), proporcionando 1,08 g de 3-bromo-quinolin-6-il-éster de ácido acético en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 63%).

Etapas 3: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ol

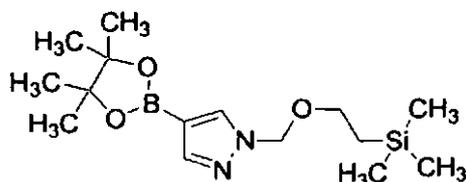
20 Se calentó una mezcla de 3-bromo-quinolin-6-il-éster de ácido acético (108 g, 0,406 mol), pinacoléster de ácido 1-metil-4-pirazol-borónico (169 g, 0,752 mol), Na₂CO₃ (129 g, 1,28 mol), Pd(dppf)Cl₂ (32,8 g, 0,0406 mol), H₂O (607 ml) y 1,4-dioxano (1.000 ml) hasta 100°C durante una noche. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se eliminó la mayor parte del dioxano al vacío. Se dividió la mezcla entre acetato de etilo (500 ml) y salmuera (500 ml). Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 500 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, dando 54 g de 3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ol en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 59%).

Etapas 4: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

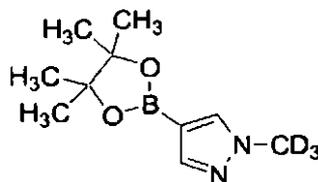
30 Se enfrió una solución de 3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ol (54 g, 0,24 mol) en piridina (400 ml) hasta 0°C en un baño de hielo bajo un flujo de nitrógeno. Se añadió lentamente anhídrido trifílico (48 ml, 0,28 mol) a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se dividió la mezcla de reacción entre diclorometano (300 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (200 ml). Se separó la fase orgánica y se lavó con salmuera (5 x 300ml). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, dando 58 g de 3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un sólido blanco (rendimiento del 70%): RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 9,30 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,10 (d, 1H), 7,76 (m, 1H), 3,92 (s, 3H); EM (m/z) 358 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 18: Etiléster de ácido 2-(4-yodo-pirazol-1-il)-2-metil-propiónico

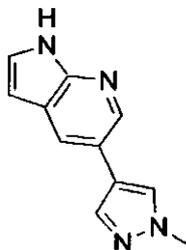
40 A una solución de yodopirazol (1,0 g, 5,10 mmol) en DMF (10 ml), se añadió hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60%, 245 mg, 6,12 mmol). Tras agitar durante 10 min, se añadió una solución de etil-2-bromoisobutirato (0,681 ml, 4,59 mmol) en DMF (4 ml). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 18 horas. Se diluyó la mezcla con acetato de etilo, y se lavó la capa orgánica con agua, salmuera y se secó sobre sulfato de sodio, obteniéndose 1,3 g de etiléster de ácido 2-(4-yodo-pirazol-1-il)-2-metil-propiónico en forma de un aceite transparente (rendimiento del 83%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,11 (t, 3H), 1,73 (s, 6H), 4,08 (c, 2H), 7,57 (s, 1H), 8,11, (s, 1H); EM (m/z) 309 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 19: 4-(4,4,5,5-Tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol

El compuesto del título se preparó según el procedimiento descrito en el documento US:200610142307A1.

5 Compuesto intermedio 20: 1-Metil-*d*₃-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol

A una solución de 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (5,0 g, 25,8 mmol) y Cs₂CO₃ (10,1 g, 30,96 mmol) en DMF (105 ml), se añadió CD₃I (1,77 ml, 28,38 mmol). Se agitó la mezcla durante 3 horas, y luego se extrajo en acetato de etilo y se lavó con agua (x 3) y salmuera (x 3), y se secó sobre sulfato de sodio. Se eliminaron las sustancias volátiles, proporcionando 1-metil-*d*₃-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (2,7 g, rendimiento del 50%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,25 (s, 1,2H), 7,55 (s, 1H), 7,90 (s, 1H); EM (*m/z*) 21,2 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 21: 5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridina:

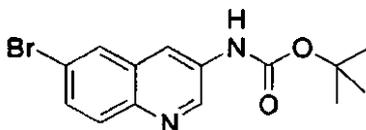
Se introdujo en un matraz de fondo redondo purgado con N₂ 5-bromo-1H-pirrol[2,3-b]piridina (1,0 g, 5,05 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,17 g, 5,55 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (37 mg, 0,045 mmol). Se disolvieron los reactivos en DMA (6 ml) y se purgó con N₂. Se añadió lentamente una solución acuosa de K₂CO₃ (978 mg en 6 ml) a la mezcla de reacción, mientras se mantenía la temperatura por debajo de 40°C, y se purgó durante 10 minutos con N₂. Luego se calentó la solución hasta 75°C durante una noche. Se interrumpió el calentamiento y se añadieron 12 ml de H₂O. Se calentó la solución hasta 60°C durante 1 h. A continuación, se transfirió la solución a un embudo de decantación y se extrajo con diclorometano (100 ml x 2). Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄ y se concentró sobre gel de sílice. Se purificó la mezcla de reacción mediante cromatografía de desorción súbita con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano, proporcionando 780 mg de 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (rendimiento del 78%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,94 (3H, s), 6,49 (1H, d), 7,38 (1H, d), 7,84 (1H, s), 7,97 (1H, s), 8,12 (1H, d), 8,38 (1H, d); EM (*m/z*) 1,99 [M+H]⁺.

25 Compuesto intermedio 22: *Terc*-butiléster de ácido (6-bromo-quinolin-4-il)-carbámico

A una solución de 6-bromo-quinolina-4-ilamina (100 mg, 0,45 mmol) [preparada según *J. Med. Chem.* 1978, 21, 271] y 4-dimetilaminopiridina (5,5 mg, 0,045 mmol) en diclorometano (2 ml), se añadió anhídrido de *t*BOC (122 mg, 0,56 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante una noche, y luego se concentró al vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía de desorción súbita con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano, proporcionando 123 mg de *terc*-butiléster de ácido (6-bromo-quinolin-4-il)-carbámico (rendimiento del 85%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,54 (s, 9H), 7,90 (m, 2H), 8,03 (d, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,79 (d, 1H),

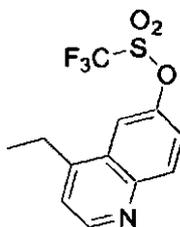
10,00 (s, 1H); EM (m/z) 325 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 23: *Terc*-butiléster de ácido (6-bromo-quinolin-3-il)-carbámico



5 Se desgasificó una solución de ácido 6-bromo-quinolina-3-carboxílico (500 mg, 1,98 mmol) y trietilamina (3,97 mmol) en *tert*-butanol (2 ml) burbujando nitrógeno durante 5 min, y se añadió DPPA (3,97 mmol, 858 mg) se añadió. Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 4 h. Se retiró el disolvente al vacío, y se dividió el residuo entre agua y acetato de etilo. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (x 2), y se lavaron las capas orgánicas combinadas
10 secuencialmente con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía de desorción súbita con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano, proporcionando 347 mg de *tert*-butiléster de ácido (6-bromo-quinolin-3-il)-carbámico (rendimiento del 54%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,53 (s, 9H), 7,69 (dd, 1H), 7,85 (d, 1H), 8,21, (d, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,85 (d, 1H), 10,00 (sa, 1H); EM (m/z) 325 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 24: 4-Etil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

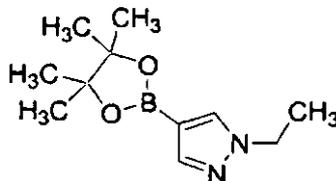


15 **Etapa 1: 4-Etil-quinolin-6-ol**

Se desgasificó una mezcla de tolueno (17 ml) y carbonato sódico 2M acuoso (5 ml) burbujando nitrógeno durante 20 minutos. A la mezcla, se añadió 4-cloro-6-metoxi-quinolina (500 mg, 2,58 mmol) y tetraakis(trifenilfosfin)paladio (0) (90 mg, 0,0774 mmol), seguidos de solución de trietilborano 1M en hexano (15,5 ml, 15,5 mmol). Se agitó la
20 mezcla de reacción a 90°C durante 4 días, añadiendo periódicamente más catalizador de paladio (270 mg total) y solución de trietilborano(30 ml total) para dirigir la reacción. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se dividió entre agua y acetato de etilo. Se separó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita con un gradiente de acetato de etilo al 0-70%/hexano proporcionó 579 mg de 4-etil-6-metoxi-quinolina impura en forma de un sólido
25 céreo de color blanco roto. Se trató el sólido con ácido sulfúrico concentrado (6 ml) y agua (4 ml). Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 5 h y se vertió sobre hielo. Se añadió hidróxido de amonio hasta un pH 9 y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (x 2). Se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita con un gradiente de acetato de etilo al 0-80%/hexano proporcionó 195 mg de 4-etil-quinolin-6-ol en forma de un sólido de color blanco roto (rendimiento del 44%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,30 (t, 3H), 2,96 (c, 2H), 7,25 (d, 1H), 7,28 (m, 2H), 7,86 (d, 1H), 8,56 (d, 1H), 9,98 (s ancho, 1H);
30 EM (m/z) 1,74 [M+H]⁺.

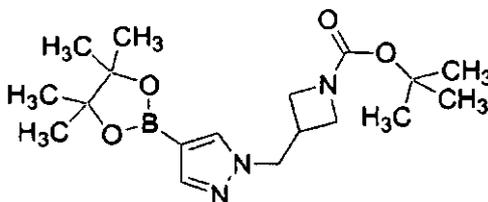
Etapa 2: 4-Etil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico

A un recipiente apto para microondas, se añadió secuencialmente 4-etil-quinolin-6-ol (177 mg, 1,022 mmol), carbonato de potasio (424 mg, 3,066 mmol), *N*-fenil-bis(trifluorometanosulfonimida) (730 mg, 2,044 mmol) y THF (5 ml). Se cerró el recipiente apto para microondas y se calentó en un reactor de microondas a 120°C durante 20
35 min. Se dividió la mezcla de reacción entre agua y acetato de etilo. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo, y se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio, se filtraron y se adsorbieron sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo al 0-50%/hexano proporcionó 286 mg de 4-etil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico en forma de un aceite transparente (rendimiento del 92%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,31, (t, 3H), 3,13 (c, 2H), 7,53 (d, 1H), 7,86
40 (dd, 1H), 8,21, (d, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,92 (d, 1H); EM (m/z) 306 [M+H]⁺.

Compuesto intermedio 25: 1-Etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol

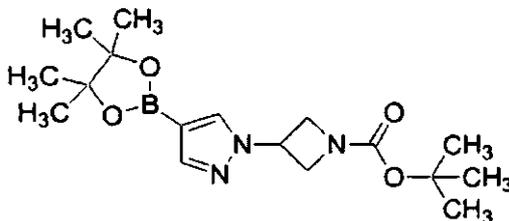
El compuesto del título se preparó según el procedimiento descrito en Ivachtchenko, A.V. *et. al.*, *J. Heterocyclic Chem.* 2004, 41, 931.

5 **Compuesto intermedio 26: Terc-butiléster de ácido 3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3]dioxolan-2-il)-pirazol-1-ilmetil]-azetidín-1-carboxílico**

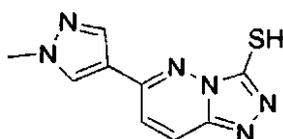


El compuesto del título se preparó según el procedimiento descrito en el documento WO 2006/021.881.

10 **Compuesto intermedio 27: Terc-butiléster de ácido 3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-pirazol-1-il]-azetidín-1-carboxílico**



El compuesto del título se preparó según el procedimiento descrito en el documento WO 2006/021.881.

Ejemplo 2: 6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina-3-tiol

15 **Etapla 1: 3-Cloro-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-piridazina**

Se desgasificó con nitrógeno una mezcla de 3,6-dicloropiridazina (20,1 g, 1,35 mmol), pinacoléster de ácido 1-metil-4-pirazolborónico (22,46 g, 1,08 mmol) y K_2CO_3 (44,71 g, 324 mmol) en 500 ml de dioxano y 200 ml de H_2O . A esta mezcla, se añadió aducto de diclorometano de dicloro[1,1',1'-bis(difenilfosfin)ferroceno]paladio (II) (5,28 g, 7,2 mmol) y se burbujeó la mezcla resultante durante otros 20 min. Se calentó la mezcla de reacción a $80^\circ C$ durante 4 h, y luego se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna por desorción súbita con diclorometano como eluyente, proporcionando 21 g de 3-cloro-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-piridazina (rendimiento del 76%): RMN de 1H ($CDCl_3$) δ 3,99 (s, 3H), 7,45 (d, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,1,1, (s, 1H).

20 **Etapla 2: [6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-piridazin-3-il]-hidrazina**

A una suspensión de 3-cloro-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-piridazina (21,0 g, 1,08 mmol) en etanol (370 ml), se añadió hidrazina monohidratada (36 ml). Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 18 h, y luego se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se recogió el precipitado mediante filtración, se lavó con etanol frío y se secó al vacío, proporcionando 18 g de [6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-piridazin-3-il]-hidrazina en forma de un sólido beis (rendimiento del 87%): RMN de 1H ($DMSO-d_6$): δ 3,88 (s, 3H), 4,28 (s, 2H), 7,02 (d, 1H), 7,59 (d, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,91, (s, 1H), 8,1,9 (s, 1H); EM (m/z) 1,91, $[M+H]^+$.

30

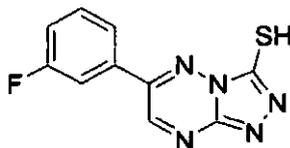
Etapa 3: 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol**Procedimiento A:**

5 A una solución de [6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-piridazin-3-il]-hidrazina (18 g, 94,7 mmol) en etanol (230 ml) y agua (63 ml), se añadió KOH (5,63 g, 100 mmol), seguido de CS₂ (12 ml, 198 mmol). Se agitó la mezcla y se calentó hasta el reflujo durante 2 h bajo una atmósfera de nitrógeno. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se disolvió el residuo en hidróxido de sodio acuoso 1N y se filtraron las sustancias insolubles. Se acidificó el filtrado hasta un pH 2-3 con HCl acuoso 1N. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó al vacío, proporcionando 17,7 g de 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 80,5%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,95 (s, 3H), 7,73 (d, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 8,53 (s, 1H), 1,47 (s, 1H); EM (*m/z*) 233 [M+H]⁺.

Procedimiento B:

15 Se combinaron [6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-pirazin-3-il]-hidrazina (1,0 g, 5,3 mmol) y 1,1'-tiocarbonildiimidazol (1,08 g, 6,1 mmol) en DMF (1,0 ml) y se calentaron a 50°C durante 2 h. Tras este tiempo, se dejó enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente. Se añadió hexano (1,0 ml) seguido de THF (4 ml), se agitó durante 10 min, y luego se filtró y se lavó con THF (2 ml, después con 4 ml). Se secó al vacío el sólido, dando 738 mg de 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 60%).

Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 2: 6-fenil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol, 6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol, 3-(3-mercapto-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il)-benzonitrilo, 2-fluoro-4-(3-mercapto-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il)-*N*-metil-benzamida.

20 Ejemplo 3: 6-(3-Fluorofenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-3-tiol**Etapa 1: Oxima de (3-fluoro-fenil)-oxo-acetaldehído**

25 A una mezcla de dióxido de selenio (58,3 g, 525 mmol) en 20 ml de agua y 400 ml de 1, 4-dioxano, se añadió en 1-(3-fluoro-fenil)-etanol (69,0 g, 500 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo durante una noche y luego se filtró a través de tierra de diatomeas. Se añadió el filtrado a un volumen igual de agua y se ajustó hasta un pH 4 con hidróxido de sodio acuoso al 5%. Se añadió oxima de acetona (40,2 g, 550 mmol) a esta mezcla y se agitó la mezcla durante 24 h. En dilución hasta 1,5 l con agua, se extrajo la mezcla con acetato de etilo (2 x 400 ml), y se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró, dando un residuo oleaginoso, que se purificó mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice (eluyendo con petróleo puro), obteniéndose el compuesto del título en forma de un sólido amarillo pálido (68,0 g, 81,4%). RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 12,78 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,82-7,50 (m, 4H).

Etapa 2: 6-(3-Fluoro-fenil)-2*H*-[1,2,4]triazin-3-ona

35 Se calentó una solución de oxima de (3-fluoro-fenil)-oxo-acetaldehído (70 g, 419 mmol), clorhidrato de semicarbazida (46,7 g, 419 mmol) y acetato de sodio trihidratado (57,0 g, 419 mmol) en 560 ml de solución acuosa de etanol al 50% hasta 50-60°C y se mantuvo a la misma temperatura durante una noche. Tras enfriar la mezcla de reacción, se aisló el sólido cristalino blanco resultante mediante filtración, se lavó bien con agua y se secó al vacío, obteniéndose 90,7 g de un sólido blanco (96,6%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 12,32 (s, 1H), 12,27 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,78 (dd, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,42 (dd, 1H), 7,19 (dt, 1H), 6,90 (s, 2H).

40 Se calentó una suspensión del sólido blanco (22,4 g, 100 mmol) en 630 ml de ácido clorhídrico acuoso al 5% hasta el reflujo y se mantuvo a reflujo durante 1 hora, tiempo durante el cual el sólido en suspensión cambió a una masa pegajosa que se endureció cuando se enfrió la mezcla. Se aisló el sólido mediante filtración, se lavó bien con agua y se secó, luego se disolvió en 1,50 ml de ácido acético. Se calentó la solución resultante a reflujo durante una noche y se eliminó el disolvente al vacío. Se trituró el residuo con etanol-hexano (1:3), dando el compuesto del título en bruto (15,1 g, 79,0%) en forma de un sólido amorfo amarillo.

45 Etapa 3: 3-Cloro-6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazina

50 Se mantuvo a reflujo una mezcla de 6-(3-fluoro-fenil)-2*H*-[1,2,4]triazin-3-ona (15,2 g, 79,5 mmol, en bruto) y 2 ml de DMF en 250 ml de oxocloruro fosforoso-cloroformo (1:1) durante una noche. Luego se concentró la mezcla a presión reducida, se diluyó con cloruro de metileno y se vertió sobre hielo con agitación. Cuando se fundió el hielo, se neutralizó la mezcla con solución de bicarbonato sódico, se separaron las capas, se extrajo la capa acuosa con diclorometano una vez, se lavó la capa orgánica con agua, se secó y se concentró, obteniéndose un aceite marrón

que se purificó mediante cromatografía en columna (eluyendo con petróleo puro), dando el compuesto del título en forma de un sólido amarillo pálido (3,5 g, 21,0%). RMN de ^1H (CDCl_3): δ 8,88 (s, 1H), 7,87-7,82 (m, 2H), 7,60-7,52 (m, 1H), 7,32-7,27 (m, 1H).

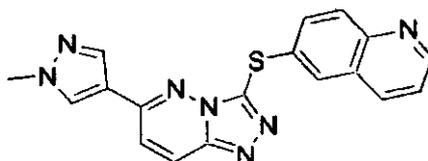
Etapas 4: [6-(3-Fluoro-fenil)-[1,2,4]triazin-3-il]-hidrazina

- 5 Se enfrió una solución de 3-cloro-6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazina (2,09 g, 1,0,0 mmol) en 13,6 ml de piridina seca hasta 0°C con un baño con hielo y se añadieron 1,7 ml de hidrazina hidratada. Luego se calentó la mezcla hasta 65°C y se mantuvo esta temperatura durante aprox. 0,5 horas. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se vertió la mezcla en agua con hielo. Se recuperó el sólido resultante mediante filtración y se lavó con agua, se secó y raspó con hexano, dando el compuesto del título (1,85 g, 90,2%) en forma de un sólido cristalino amarillo: RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 8,97 (a, 1H), 8,90 (s, 1H), 20 7,89-7,82 (m, 2H), 7,59-7,51, (m, 1H), 7,30-7,24 (m, 1H), 5,47 (a, 2H); EM (m/z) 206 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Etapas 5: 6-(3-Fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazina-3-tiol

- 15 A una suspensión de [6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazin-3-il]-hidrazina (400 mg, 0,789 mmol) en etanol (12 ml), se añadió hidróxido de potasio acuoso 2N (1 ml) seguido de sulfuro de carbono (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 h, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se disolvió el residuo con hidróxido de potasio acuoso 1N, se calentó y se sometió a ultrasonidos. Se filtraron las sustancias insolubles. Se acidificó el filtrado hasta un pH 2-3 con HCl acuoso 1N. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó al vacío, obteniéndose el compuesto del título en forma de un sólido naranja (242 mg, rendimiento del 50%): RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 7,52 (dt, 1H), 7,70 (dt, 1H), 7,97-8,04 (m, 2H), 9,36 (s, 1H), 14,05 (s, 1H); EM (m/z) 248 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Ejemplo 4: 6-[6-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina (Compuesto 4)



Procedimiento A:

- 25 Se desgasificó una solución de 6-bromoquinolina (45 mg, 0,215 mmol), diisopropiltilamina (0,075 ml, 0,43 mmol) en DMF (1 ml) bajo nitrógeno mediante burbujeo de nitrógeno durante 5 min. Se añadieron Tris(dibencilideno)acetona)dipaladio (11 mg, 0,011 mmol), Xantphos (13 mg, 0,022 mmol) y 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (50 mg, 0,215 mmol), y se desgasificó la mezcla durante otros 5 min. Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 23 h. Se añadieron más catalizador de paladio (11 mg) y ligando (13 mg) tras 6 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y la mezcla en bruto se purificó directamente mediante CLAR de masas (CH_3CN al 5-95%/H $_2\text{O}$, modificador de HCOOH al 0,1%), proporcionando 45 mg de 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 58%).

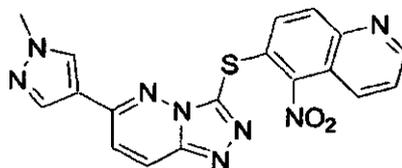
- Los siguientes compuestos se prepararon según el procedimiento a: 6-(6-fenil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 6-fenil-3-([1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, 3-(1*H*-benzotriazol-5-il-sulfanil)-6-fenil[1,2,4]triazolo-[4,3-*b*]piridazina, 6-[6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina, 3-(benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, 6-(3-fluorofenil)-3-([1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, mezcla (2:1) de 3-(7-metil-benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina y 3-(5-metil-benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, 6-[6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-3-il-sulfanil]-quinolina, 7-fluoro-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina, 2-fluoro-*N*-metil-4-[3-(quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il]-benzamida, 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinazolina, 3-(benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, 3-(5-fluoro-benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, 7-Metil-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina, 2-fluoro-4-[3-(7-fluoro-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il]-benzamida, 2-fluoro-*N*-metil-4-[3-(7-metil-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il]-benzamida, 2-fluoro-*N*-metil-4-[3-(3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il]-benzamida, 3-[3-(quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il]-benzonitrilo, 3-[3-(benzotiazol-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-6-il]-benzonitrilo, 3-[3-(7-fluoro-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il]-benzonitrilo, 3-metil-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-2-ilamina, 4-metoxi-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina, metil-{6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-il}-amina, dimetil-{6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-il}-amina, 7-fluoro-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 2-{6-[6-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-il-oxi}-etanol, 3-metil-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, *tert*-butiléster de ácido {6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-

[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-3-il}-carbámico, *tert*-butiléster de ácido 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-il}-carbámico, 5-fluoro-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina.

Procedimiento B:

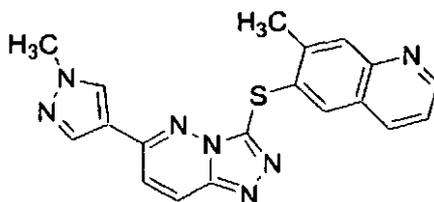
5 Se desgasificó una solución de 6-bromoquinolina (550 mg, 2,64 mmol), diisopropiltilamina (1,13 ml, 6,46 mmol) en DMF (4 ml) bajo nitrógeno mediante burbujeo de nitrógeno durante 20 min. Se añadieron Tris(dibencilidenacetona)dipaladio (105 mg, 0,108 mmol), Xantphos (125 mg, 0,216 mmol) y 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (500 mg, 2,155 mmol) bajo una corriente de nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 22h, con lo que desapareció la suspensión del sólido. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho corto de gel de sílice, usando DMF como eluyente. Luego se vertieron las sustancias orgánicas directamente en una mezcla de hielo y agua, y se dejó reposar durante 15 min. Se filtró el precipitado y se lavó con agua. Se trituró la torta filtrante resultante en dietiléter, se filtró y se secó al vacío, produciendo 770 mg de un sólido amarillo. Se agitó el sólido en isopropanol en reflujo durante 1 h, se filtró, se lavó con isopropanol y se secó en un horno de vacío a 70°C durante 3 días, proporcionándose 500 mg de 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina en forma de un sólido amarillo con un 8% de impurezas (rendimiento del 64%).

Ejemplo 5: 6-[6-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-5-nitro-quinolina (Compuesto 13)



20 Se desgasificó una solución de KOH (146 mg, 2,6 mmol) en etanol (10 ml) mediante burbujeo de nitrógeno durante 15 min. A la solución, se añadió 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (500 mg, 2,15 mmol) y 6-bromo-5-nitroquinolina (600 mg, 2,36 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 7°C durante 4 h, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con metanol al 10%/diclorometano y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-7%/diclorometano proporcionó 659 mg de 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-5-nitro-quinolina en forma de un sólido amarillo oscuro (rendimiento del 76%).

Ejemplo 6: 7-Metil-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina (Compuesto 16)



30 Se desgasificó una solución de 7-metil-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (1,38 g, 4,74 mmol), diisopropiltilamina (1,5 ml, 8,61, mmol) en DMF (8 ml) bajo nitrógeno mediante el burbujeo de nitrógeno durante 20 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (99 mg, 0,11, mmol, catalizador Strem) y Xantphos (125 mg, 0,215 mmol) conjuntamente en una porción, seguidos por 6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (1 g, 4,36 mmol) bajo una corriente de nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 1 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se vertió sobre NaOH acuoso 2M (100 ml). Se filtró el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó al aire durante 30 min. Se disolvió la torta filtrante resultante en MeOH (80 ml) y CHCl₃ (80 ml), y se añadieron 2 g de carbón vegetal decolorante activado. Se agitó la suspensión a 60°C durante 2,5 h. Luego se añadió Celite (10 g) y se filtró la mezcla caliente sobre un lecho corto de gel de sílice. Se evaporó el filtrado al vacío, dando un sólido beis. La recristalización en EtOH y cloroformo proporcionó 1,0 g de 7-metil-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo [4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina en forma de cristales blancos (rendimiento del 62%).

45 Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 6: 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina, 3-(3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina, N-óxido, 6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, metil-{3-[5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il}-amina, 4-etil-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-

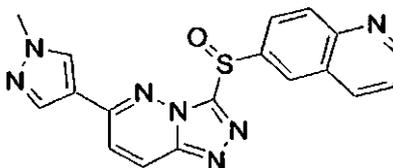
quinolina.

Ejemplo 7: 3-(3-Etil-3*H*-benzoimidazol-5-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina (Compuesto 30)



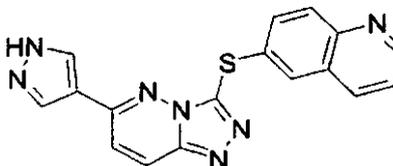
- 5 A 3-(3-fluoro-4-nitro-fenil-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina (50 mg, 0,135 mmol), se añadió una solución 2M de etilamina en THF (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 70°C durante 1 h, luego se concentró al vacío. Se suspendió el residuo en ácido fórmico (1 ml) y se añadió hierro en polvo (75 mg, 1,35 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 16 h, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente y se retiró la varilla agitadora con la mayor parte del hierro. Se concentró la mezcla al vacío y se trató el residuo resultante con hidróxido de sodio acuoso 2M. Se filtró el precipitado, se lavó con agua, y luego con dietiléter. Luego se diluyó en 2 ml de DMSO, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm, y se purificó la mezcla en bruto directamente mediante CLAR desencadenada en masa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%) proporcionando 25 mg de 3-(3-etil-3*H*-benzoimidazol-5-il-sulfanil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina en forma de un sólido blanco (rendimiento del 49%).
- 10
- 15 Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 7: 3-[3-(2-metoxietil)-3*H*-benzoimidazol-5-il-sulfanil]-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina, sal ácido fórmico de dimetil-(2-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-benzoimidazol-1-il)-etil)-amina.

Ejemplo 8: 6-[6-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-sulfonil]-quinolina (Compuesto 38)



- 20 A una solución de 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina (500 mg, 1,393 mmol) en DMF (10 ml), se añadió una solución en gotas de ácido 3-cloroperbenzoico (contenido del 70-75%, 721 mg, 4,178 mmol) en DMF (5 ml) en un periodo de 20 min. Se agitó la mezcla de reacción durante 19 h, y se añadió una solución acuosa de NaOH al 10% (60 ml). Se extrajo la capa acuosa con metanol al 10%/diclorometano (x 3) y se adsorbieron los orgánicos combinados sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-8%/diclorometano proporcionó 66 mg de un sólido blanco. Se disolvió el sólido en DMSO caliente y se filtró la solución fría a través de un filtro de 0,45 µm. La purificación mediante CLAR desencadenada en masa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%) proporcionó 5,7 mg de 6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-sulfonil]-quinolina en forma de un sólido blanco (rendimiento del 1,1%).
- 25
- 30

Ejemplo 9: 6-[6-(1*H*-Pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina (Compuesto 39)



Etapas 1: 3-Cloro-6-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1*H*-pirazol-4-il]-piridazina

- 35 Se desgasificó con nitrógeno una mezcla de 3,6-dicloropiridazina (505 mg, 3,4 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1*H*-pirazol (1 g, 3,1 mmol) y K₂CO₃ (1,3 g, 9,3 mmol) en 10 ml de dioxano y 4 ml de H₂O. A esta mezcla, se añadió aducto de diclorometano de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfin)ferroceno]paladio (II) (45 g, 0,06 mmol) y se burbujeó la mezcla resultante con nitrógeno durante otros 15 min. Se calentó la mezcla de reacción a 100°C durante 4 h, y luego, tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se retiró la fase acuosa con una pipeta. Se concentró la fase orgánica sobre gel de sílice mediante cromatografía en columna por desorción súbita eluyendo con hexanos:acetato de etilo 100:0 a 60:40, obteniéndose el compuesto del título en forma de un sólido blanco (640 mg, 2,06 mmol, rendimiento del 66%): RMN de ¹H (CDCl₃) δ 0,02 (9H, s), 0,96 (2H, t), 3,64 (2H, t), 5,52 (2H, s), 7,52 (1H, d), 7,62 (1H, d), 8,1,0 (1H, s), 8,34 (1H, s); EM (*m/z*) 311, [M+H]⁺.
- 40

Etapas 2: {6-[1-(2-Trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-piridazin-3-il}-hidrazina

5 A una suspensión de 3-cloro-6-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-piridazina (640 mg, 2,06 mmol) en etanol (5 ml), se añadió hidrazina monohidratada (1,34 ml, 1,4 g, 28 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 18 h, y luego se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se recogió el precipitado mediante filtración, se lavó con etanol frío y se secó al vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (500 mg, 1,6 mol, rendimiento del 79%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 0,00 (9H, s), 0,89 (2H, t), 3,61, (2H, t), 4,34 (2H, sa), 5,48 (2H, s), 7,09 (1H, d), 7,69 (1H, d), 7,94 (1H, sa), 8,08 (1H, s), 8,44 (1H, s); EM (*m/z*) 307 [M+H]⁺.

Etapas 3: 6-[1-(2-Trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol

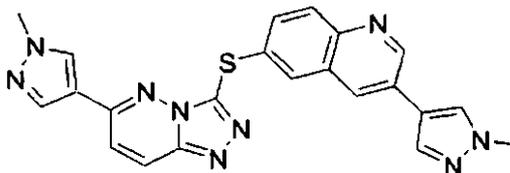
10 A una solución de {6-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-piridazin-3-il}-hidrazina (490 mg, 1,6 mmol) en etanol (6,5 ml) y agua (1,8 ml), se añadió K₂CO₃ (359 mg, 2,6 mmol), seguido de CS₂ (0,212 ml, 3,5 mmol). Se agitó la mezcla y se calentó hasta 80°C durante 3 h bajo una atmósfera de nitrógeno. Se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se concentró hasta un volumen del 50% al vacío, y se acidificó hasta un pH 1 con HCl acuoso 1N. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con agua y se secó al vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido rojo oscuro (rendimiento cuantitativo): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 0,01 (9H, s), 0,90 (2H, t), 3,63 (2H, t), 5,56 (2H, s), 7,82 (1H, d), 8,24 (1H, d), 8,27 (1H, s), 8,80 (1H, s), 1,5,23 (1H, sa); EM (*m/z*) 349 [M+H]⁺.

Etapas 4: 6-[6-[1-(2-Trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina

20 Se desgasificó una solución de 6-quinolinil-trifluorometanosulfonato (436 mg, 1,57 mmol), diisopropiltilamina (0,746 ml, 4,29mmol) en DMF (3,8 ml) bajo nitrógeno mediante burbujeo de nitrógeno durante 30 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (33 mg, 2,5% molar, catalizador Strem) y Xantphos (41 mg, 5% molar) conjuntamente en una porción, seguidos por 6-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (498 mg, 1,43 mmol) bajo una corriente de nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 3 h, antes de añadir 500 mg de carbón vegetal decolorante activado. Se agitó la suspensión a 70°C durante 25 Se evaporó el disolvente al vacío, y se elevó el residuo en diclorometano y se lavó con NaOH acuoso 1N, y se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita eluyendo con diclorometano:metanol (100:0 a 92:8), obteniéndose el compuesto del título en forma de una espuma amarilla clara (250 mg, 0,53 mmol, rendimiento del 37%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 0,00 (9H, s), 0,90 (2H, t), 3,62 (2H, t), 5,54 (2H, s), 7,62 (1H, dd), 7,83 (1H, dd), 7,91 (1H, d), 8,07 (1H, d), 8,18 (1H, s), 8,23 (1H, d), 8,43 (1H, dd), 8,57 (1H, d), 30 8,75 (1H, d), 8,96 (1H, dd); EM (*m/z*) 476 [M+H]⁺.

Etapas 5: 6-[6-(1H-Pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina

35 A una solución de 6-[6-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina (150 mg, 0,32 mmol) en diclorometano (8 ml) a 0°C, se añadió ácido trifluoroacético. Tras 3 horas, se concentró la mezcla hasta la sequedad, y se elevó en diclorometano y se neutralizó mediante la adición de NaHCO₃ acuoso. A esta emulsión, se añadió una mezcla de cloroformo/metanol (95/5) (20 ml) y salmuera (30 ml). Se separó la fase orgánica y se filtró la fase orgánica, y se lavó el residuo sólido con agua y, luego, con Et₂O y se secó, obteniéndose un sólido amarillo (64 mg). Se elevó este sólido en metanol (2 ml), a lo que se añadió etilendiamina (1 mmol) y se calentó a 50°C durante 1 hora. Se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente, y se recogió el sólido mediante filtración y se secó, obteniéndose compuesto del título en forma de un sólido blanco (57 mg, 0,17 mmol, rendimiento del 53%).

Ejemplo 10: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina (Compuesto 40)**Etapas 1: 3-Bromo-6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina**

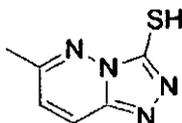
45 A una solución de 6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina (1 g, 2,785 mmol) en ácido acético glacial (20 ml), se añadió bromo (0,716 ml, 13,93 mmol) en gotas. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 min y luego a 100°C durante 3 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, y se concentró la mezcla al vacío. Se dividió el residuo entre NaOH acuoso al 10% y metanol al 10%/diclorometano. Se separó la capa orgánica, se lavó con Na₂S₂O₃ acuoso 1M, se secó sobre sulfato de sodio, se filtro y se adsorbió

sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-7%/ diclorometano proporcionó 381 mg de 3-bromo-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina en forma de un sólido beis (rendimiento del 31%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,89 (s, 3H), 7,77 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,00 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,48 (d, 1H), 8,68 (d, 1H), 8,92 (d, 1H); EM (*m/z*) 438, 440 [M+H]⁺.

Etapa 2: 3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina

Se cargó un recipiente apto para microondas con 3-bromo-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina (38 mg, 0,087 mmol), pinacoléster de ácido 1-metil-4-pirazolborónico (22 mg, 0,104 mmol) y diclorobis(trifenilfosfin)paladio (0) (3 mg, 0,004 mmol). Se añadieron 1,2-dimetoxietano (0,4 ml) y una solución acuosa 2M de carbonato de potasio (0,4 ml). Se tapó el recipiente y se calentó bajo microondas a 120°C durante 20 min. Se separó la capa orgánica, se diluyó en metanol y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano proporcionó 24 mg de un sólido amarillo. Se volvió a purificar el sólido secuencialmente mediante CLAR desencadenada en masa (CH₃CN el 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%) y mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice usando CH₃CN al 50%/diclorometano seguido de metanol al 10%/diclorometano, proporcionándose 10,5 mg de 3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-[6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 28%).

Ejemplo 11: 6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol



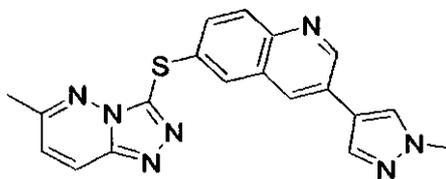
Etapa 1: (6-Metil-pirazin-3-il)-hidrazina

A una suspensión de 3-cloro-6-metil-piridazina (3 g, 23,3 mmol) en etanol (45 ml), se añadió hidrazina hidratada (45 ml) y se calentó la mezcla resultante hasta el reflujo durante 3 h. Se retiró la mayoría del disolvente bajo presión reducida y se recogió el sólido blanco mediante filtración, y se lavó con etanol. Tras secar, se obtuvieron 2,3 g de (6-metilpirazin-3-il)-hidrazina en forma de un sólido cristalino blanco (rendimiento del 80%).

Etapa 2: 6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol

A una solución de KOH (11,3 g, 0,202 mol) en metanol (100 ml), se añadió (6-metil-pirazin-3-il)-hidrazina (25 g, 0,202 mol) a temperatura ambiente. Se metió la mezcla de reacción en un baño de agua con hielo y se añadió lentamente disulfuro de carbono (98 ml, 1,61 mol). Se calentó la solución amarilla resultante a reflujo durante una noche antes de eliminar el disolvente. Se acidificó el residuo amarillo con HCl acuoso 2N hasta un pH ~4, se filtró y se lavó con agua. Tras secar, se obtuvieron 33 g de 6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol en forma de un polvo amarillo (rendimiento del 85%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,5 (s, 3H), 7,28 (d, 1H), 8,05 (d, 1H), 14,66 (sa, 1H); EM (*m/z*) 167 [M+H]⁺.

Ejemplo 12: 3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (Compuesto 41)



Ruta 1

Etapa 1: 3-Bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina

A una solución de 6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (370 mg, 1,26 mmol) en ácido acético glacial (10 ml), se añadió bromo (0,324 ml, 6,31 mmol) en gotas. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 min y luego a 100°C durante 2 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, y se concentró la mezcla al vacío. Se dividió el residuo entre NaOH acuoso al 10% y metanol al 10%/diclorometano. Se separó la capa orgánica, se lavó con Na₂SO₃ acuoso al 5% y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-5%/diclorometano proporcionó 422 mg de 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido beis (rendimiento del 90%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,53 (s, 3H), 7,41 (d, 1H), 7,70 (dd, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,99 (d,

1H), 8,41 (d, 1H), 8,66 (d, 1H), 8,93 (d, 1H); EM (m/z) 372, 374 $[M+H]^+$.

Ruta alternativa:

Se desgasificó una solución de 3-bromo-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (973 mg, 2,74 mmol), diisopropiletilamina (0,87 ml, 4,98 mmol) en DMF (9 ml) bajo nitrógeno mediante el burbujeo de nitrógeno durante 20 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (114 mg, 0,124 mmol, catalizador Strem) y Xantphos (144 mg, 0,249 mmol) conjuntamente en una porción, seguidos de 6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (450 mg, 2,49 mmol) bajo una corriente de nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 1 h. Se enfrió la mezcla reacción hasta temperatura ambiente, y añadieron 500 mg de carbón vegetal decolorante activado. Se agitó la suspensión durante 2,5 h, luego se filtró directamente la mezcla a través de un lecho corto de celite, usando DMF como eluyente. Se evaporó el disolvente al vacío, se dividió el residuo entre agua y metanol al 10%/diclorometano. Se separó la capa orgánica y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-5%/diclorometano proporcionó 534 mg de 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido de color crema (rendimiento del 58%).

Etapas 2: 3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina

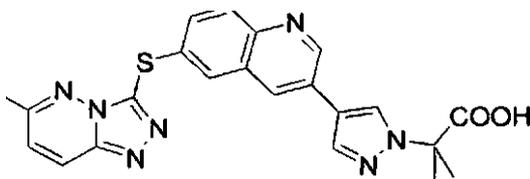
Se cargó un recipiente apto para microondas con 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (40 mg, 0,107 mmol), pinacoléster de ácido 1-metil-4-pirazolborónico (27 mg, 0,129 mmol), y diclorobis(trifenilfosfin)paladio (0) (4 mg, 0,005 mmol). Se añadieron 1,2-dimetoxietano (0,5 ml) y una solución acuosa 2M de carbonato de sodio (0,5 ml). Se tapó el recipiente y se calentó bajo microondas a 120°C durante 30 min. Se separó la capa orgánica, se extrajo la capa acuosa con metanol al 10%/diclorometano (x 2) y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-6%/diclorometano proporcionó 28 mg de un sólido de color blanco roto. Se volvió a purificar el sólido mediante CLAR desencadenada en masa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%), proporcionando 11 mg de 3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido blanco (rendimiento del 28%).

Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 12, ruta 1: ácido {4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-acético, 6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-3-[1-(2-morfolin-4-il-etil)-1*H*-pirazol-4-il]-quinolina, 7-fluoro-3-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 5-fluoro-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina.

Ruta 2: procedimiento de una etapa

Se desgasificó una solución de 3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (15,9 g, 44,79 mmol), diisopropiletilamina (15,5 ml, 89,58 mmol) en DMF (150 ml) bajo nitrógeno burbujeando nitrógeno durante 30 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (2,0 g, 2,24 mmol, catalizador Strem) y Xantphos (2,54 g, 4,48 mmol) conjuntamente en una porción, seguidos de 6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (7,44 mg, 44,79 mmol) bajo una corriente de nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 4 h. Se filtró la mezcla de reacción mientras estaba caliente, y se enfrió el filtrado hasta que precipitó. Se recogió el sólido y se lavó con metanol, dando sólido de color blanco roto que se purificó mediante cromatografía en columna, dando 13,3 g de 3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (rendimiento del 79%). Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 12, ruta 2: 6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina, metil-{3-[3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il}-amina.

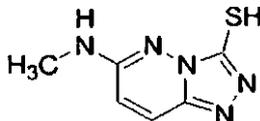
Ejemplo 13: Ácido 2-metil-2-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-propiónico (Compuesto 45)



Se cargó un recipiente apto para microondas con etiléster de ácido 2-(4-yodo-pirazol-1-il)-2-metil-propiónico (50 mg, 0,162 mmol), bis(pinacolato)diboro (50 mg, 0,195 mmol), acetato de potasio (48 mg, 0,486 mmol), aducto de diclorometano de cloruro de [1,1'-bis(difenilfosfin)ferroceno]paladio (II) (6,6 mg, 0,008 mmol) y DMA (0,6 ml). Se purgó el recipiente con nitrógeno y se tapó. Se sometió la mezcla de reacción a radiación de microondas a 130°C durante 30 min. Se añadieron 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (48 mg, 0,1,3 mmol) y diclorobis(trifenilfosfin) paladio (0) (5,7 mg, 0,008 mmol), seguidos de (0,4 ml) y una solución acuosa 2M de carbonato de potasio (0,5 ml). Se sometió la mezcla de reacción a radiación de microondas a 130°C durante 1 h. Se añadió sulfato de sodio sólido para que absorbiera el agua y se filtró la capa líquida a través de un filtro de 0,45 μ m. Se diluyó la mezcla en bruto hasta 2 ml con DMSO y se purificó directamente mediante CLAR desencadenada en

masa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%), proporcionando 11 mg de ácido 2-metil-2-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-propiónico en forma de un sólido color crema (rendimiento del 1,9%).

Ejemplo 14: 6-Metilamino-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol



5

Etapa 1: 6-Cloro-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol

A una suspensión de (6-cloro-pirazin-3-il)-hidrazina (1 g, 6,917 mmol) en etanol (12 ml), se añadió una solución de KOH (390 mg, 6,917 mmol) en agua (12 ml) en gotas. Se añadió disulfuro de carbono (0,84 ml, 13,84 mmol) en gotas. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 48 h. Se añadieron otros 0,84 ml de CS₂ y 390 mg de KOH, y se volvió a agitar la mezcla de reacción durante 24 h, antes de concentrar al vacío. Se trató el residuo con NaOH acuoso 1M y se filtró. Se acidificó el filtrado hasta un pH 3 con HCl acuoso 1N, y se filtró el precipitado. Se extrajo el filtrado resultante con acetato de etilo (x 3) y se secaron los orgánicos combinados sobre sulfato de sodio, se filtraron, se concentraron y se secaron al vacío, proporcionando 485 mg de 6-cloro-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 38%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 7,48 (d, 1H), 8,24 (d, 1H); EM (*m/z*) 187 [M+H]⁺.

10

15

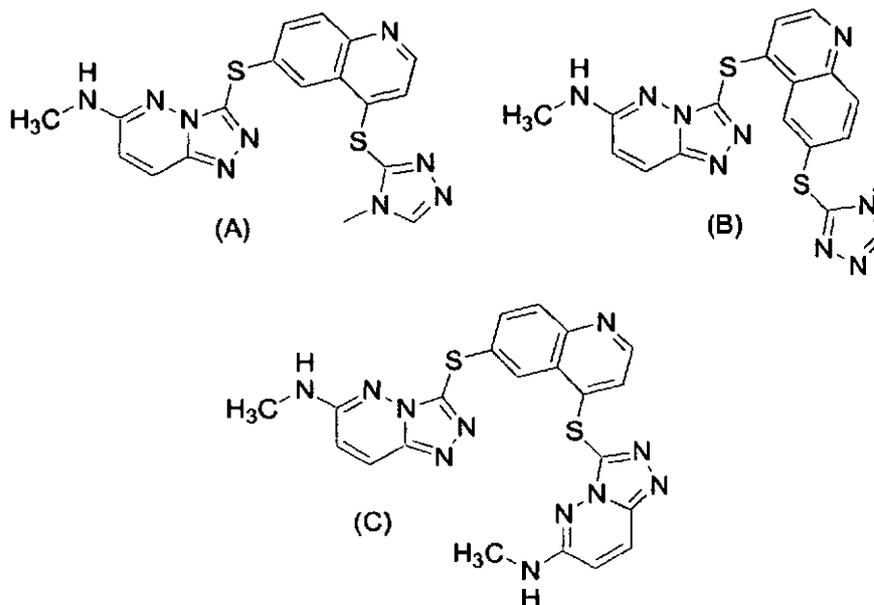
Etapa 2: 6-Metilamino-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol

Se trató 6-cloro-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (330 mg, 1,77 mmol) con una solución acuosa de metilamina al 40% (v/v). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 17 h, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente y se acidificó hasta un pH 1-2 con HCl acuoso 1N. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con agua, y se secó al vacío, dando 1,85 mg de 6-metilamino-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol en forma de un polvo amarillo (rendimiento del 58%): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,83 (d, 3H), 6,85 (d, 1H), 7,44 (c ancho, 1H), 7,74 (d, 1H), 14,2 (s, 1H); EM (*m/z*) 182 [M+H]⁺.

20

25

Ejemplo 15: Metil-(3-[4-(4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolin-6-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il)-amina (A), metil-(3-[6-(4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolin-4-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-6-il)-amina (B) y 4,6-[6-metilamino-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolina (C) (Compuestos 47 y 48)



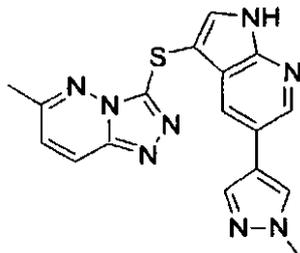
30

35

Se desgasificó una solución de 6-bromo-4-(4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolina (1,06 mg, 0,331, mmol), diisopropiletilamina (0,096 ml, 0,552 mmol) en DMF (1 ml) bajo nitrógeno mediante el burbujeo de nitrógeno durante 15 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (25 mg, 0,028 mmol) Xantphos (32 mg, 0,056 mmol) y 6-metilamino-[1,2,4] triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-tiol (50 mg, 0,276 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 16 h, luego se enfrió hasta la temperatura ambiente, se concentró al vacío, se disolvió el residuo en metanol al 10%/diclorometano y se adsorbió sobre gel de sílice. La primera purificación realizada mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-20%/diclorometano proporcionó 44 mg de un

5 sólido marrón. La segunda purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice de amina con un gradiente de metanol al 0-8%/diclorometano proporcionó 10 mg de (C) en forma de un sólido color crema y 17 mg de una mezcla impura de (A) y (B). Se volvió a purificar la mezcla mediante CLAR desencadenada en masa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%), proporcionando 6,7 mg de una mezcla (1:1) de (A) y (B) en forma de un sólido blanco (rendimiento del 58%).

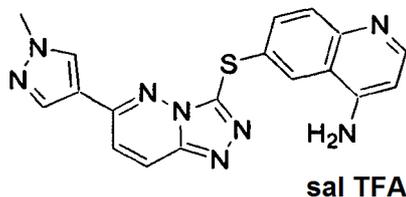
Ejemplo 16: 6-Metil-3-[5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina (Compuesto 53)



10 A una solución de 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (28 mg, 0,141, mmol) y 6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-ol (35,3 mg, 0,212 mmol) en DMF (700 µl), se añadió yodo (72 µl, 0,283 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, se filtró la mezcla de reacción y la se purificó mediante CLAR desencadenada en masa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%), proporcionando 5,7 mg de 6-metil-3-[5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina (rendimiento del 11%).

15 El siguiente compuesto se preparó según el Ejemplo 16: 6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-3-[5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina.

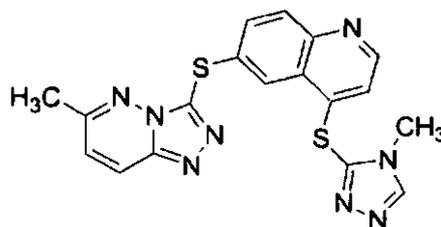
Ejemplo 17: Sal de ácido trifluoroacético de 6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-ilamina, (Compuesto 34)



20 A una suspensión de *tert*-butiléster de ácido {6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-il}-carbámico (15 mg, 0,031 mmol) en diclorometano (2 ml), se añadió TFA (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h, y luego se concentró al vacío. Se disolvió el residuo en DMSO y se liofilizó durante una noche, dando 10,4 mg de sal de ácido trifluoroacético de 6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-ilamina (rendimiento del 90%).

25 El siguiente compuesto se preparó según el Ejemplo 17: sal de ácido trifluoroacético de 6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pirazin-3-il-sulfanil]-quinolin-3-ilamina.

Ejemplo 18: 6-(6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pirazin-3-il-sulfanil)-4-(4-metil-4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolina (Compuesto 57)

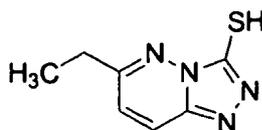


30 Se desgasificó una solución de 4-cloro-6-bromoquinolina (1,6 g, 6,63 mmol), diisopropiletilamina (1,93 ml, 11,05 mmol) en DMF (20 ml) bajo nitrógeno mediante el burbujeo de nitrógeno durante 30 min. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (506 g, 0,552 mmol), Xantphos (640 g, 1,105 mmol) y 6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina-3-ol (1,0 g, 5,525 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 18 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se dividió entre NaOH acuoso 1N y metanol al 10%/diclorometano. Se extrajo la capa acuosa con metanol al 10%/diclorometano (x 3) y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas

35

sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-6%/diclorometano proporcionó 468 mg de una mezcla (1:1) de 4-cloro-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina y 6-bromo-4-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido beis. Después se disolvió la mezcla (1:1) (70 mg) en DMF (0,5 ml), y se añadió 4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-*tiol* (12 mg, 0,1 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 21 h y luego a 80°C durante 25 h. Se enfrió la mezcla reacción hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se dividió el residuo entre NaOH 1N acuoso y metanol al 10%/diclorometano. Se extrajo la capa acuosa con metanol al 10%/diclorometano (x 2) y se adsorbieron las capas orgánicas combinadas sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano proporcionó 16 mg de 6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-4-(4-metil-4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido color crema (rendimiento del 78%).

Ejemplo 19: 6-Etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-*tiol*



Etapa 1: 3-Cloro-6-vinil-piridazina

Se desgasificó una mezcla de 3,6-dicloropiridazina (6 g, 40,3 mmol), pinacoléster e ácido vinilborónico (6,21g, 6,83 ml, 40,3 mmol), carbonato de potasio (120 mmol, 16,7 g), 1,4-dioxano (60 ml) y agua (24 ml) durante 15 min con gas de nitrógeno. Se añadió aducto de diclorometano de dicloro[1,1,1'-bis(difenilfosfin)ferrocen]paladio (II) (0,4 mmol, 292 mg), y se a continuación se calentó la mezcla a 80°C durante 4 horas. Entonces se retiró la fase acuosa con una pipeta y se concentró la fase orgánica sobre gel de sílice, y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita (SiO₂, hexano:acetato de etilo (100:0 a 60:40)), obteniéndose 3-cloro-6-vinil-piridazina en forma de un sólido blanco (5,2 g, rendimiento del 92%). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 5,75 (1H, d), 6,25 (1H, d), 7,05 (1H, dd), 7,49 (1H, d), 7,59 (1H, d). EM *m/z* = 141 (M+H⁺)⁺.

Etapa 2: 3-Cloro-6-etil-piridazina

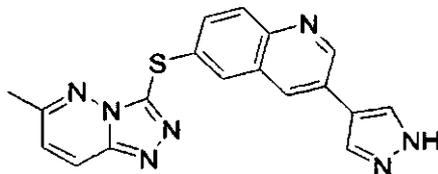
Se agitó vigorosamente una mezcla de 3-cloro-6-vinil-piridazina (1 g, 7,09 mmol), paladio sobre carbono (10% en peso, 200 mg) en acetato de etilo (14 ml) bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 4 horas. Luego se filtró la mezcla a través de un lecho corto de celite, se concentró el filtrado sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita (SiO₂, hexano:acetato de etilo (90:10 a 50:50)), obteniéndose 3-cloro-6-etilpiridazina en forma de un sólido blanco (627 g, rendimiento del 63%). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (3H, t), 2,93 (2H, c), 7,72 (1H, d), 7,83 (1H, d). EM *m/z* = 143 (M+H⁺)⁺.

Etapa 3: Sal clorhidrato de (4-etil-fenil)-hidrazina

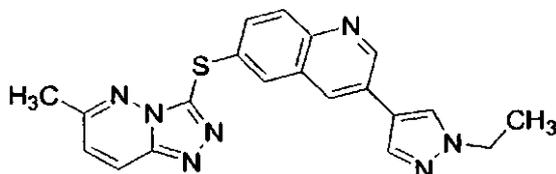
A una solución de 3-cloro-6-etil-piridazina (1,0 g, 7,01 mmol) en etanol (14 ml), se añadió hidrazina monohidratada (14 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 80°C durante 18 h, antes de concentrar al vacío. Se dividió el residuo entre salmuera y acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con salmuera (x 3), se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. Se saturó la capa acuosa con cloruro sódico sólido y luego se extrajo con acetato de etilo (x 3). Se seccionaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio y se filtraron. Se adsorbieron ambos filtrados sobre gel de sílice y se purificaron mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano, proporcionando 476 mg de *N*-(4-etil-fenil)-*N*-isopropiliden-hidrazina en forma de un sólido céreo de color amarillo. Se disolvió el sólido (450 mg) en etanol (3 ml), y se añadió HCl concentrado (2 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 80°C durante 48 h, antes de concentrar al vacío hasta la sequedad. Se trituró el sólido resultante con dietiléter, se azeotropizó con tolueno y se secó al vacío, dando un sólido marrón que se usó en la siguiente etapa sin mayor purificación.

Etapa 4: 6-Etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-*tiol*

Se suspendió el sólido marrón en etanol (3,8 ml) y se añadió KOH (425 mg, 7,59 mmol). Se purgó la cuba de reacción con nitrógeno y se añadió disulfuro de carbono (1,2 ml, 20,24 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 80°C durante 19 h, antes de concentrar al vacío. Se trató el residuo con NaOH acuoso 1N y se filtró. Se trató el filtrado con HCl acuoso 1N hasta un pH 2 y se extrajo con acetato de etilo (x 3). Se concentraron las capas orgánicas combinadas al vacío, dando 258 mg de un sólido amarillo oscuro. Se trituró el sólido con acetato de etilo y hexano, se filtró y se secó al vacío, dando 192 mg de 6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina-3-*tiol* en forma de un sólido beis (rendimiento del 42% de *N*-(4-etil-fenil)-*N*-isopropiliden-hidrazina): RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,26 (t, 3H), 2,82 (c, 2H), 7,35 (d, 1H), 8,07 (d, 1H), 14,2 (s ancho, 1H); EM (*m/z*) 181 [M+H⁺)⁺.

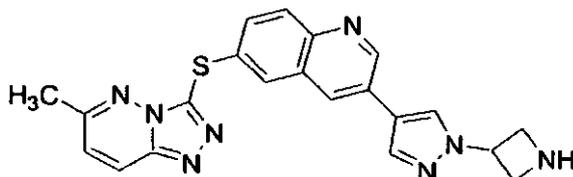
Ejemplo 20: 6-(6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-3-(1*H*-pirazol-4-il)-quinolina (Compuesto 59)

Se cargó un recipiente apto para microondas con 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (970 mg, 2,606 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1*H*-pirazol (930 mg, 2,866 mmol) y diclorobis(trifenilfosfin)paladio (0) (92 mg, 0,13 mmol). Se añadieron 1,4-Dioxano (1,0 ml) y una solución acuosa 2M de carbonato de sodio (5 ml). Se tapó el recipiente y se calentó bajo microondas a 130°C durante 30 min. Se dividió la mezcla de reacción entre agua y metanol al 10%/diclorometano. Se extrajo la capa acuosa con metanol al 10%/diclorometano y se adsorbieron los orgánicos combinados sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-8%/diclorometano proporcionó 1,073 g del producto de acoplamiento en bruto en forma de un aceite marrón claro. Se trató el aceite con TFA (10 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h, antes de concentrarla al vacío. Se trató el residuo con NaOH acuoso 1N, y se filtró el precipitado, y se lavó consecutivamente con agua y acetato de etilo. Se disolvió el sólido amarillo resultante en metanol al 10%/diclorometano y se adsorbió sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía de desorción súbita sobre gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-10%/diclorometano proporcionó 41,7 mg de 6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-3-(1*H*-pirazol-4-il)-quinolina impura. La purificación de 30 mg de material mediante CLAR desencadenada en pasa (CH₃CN al 5-95%/H₂O, modificador de HCOOH al 0,1%) proporcionó 12 mg de 6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-3-(1*H*-pirazol-4-il)-quinolina pura.

Ejemplo 21: 3-(1-Etil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (Compuesto 66)

A un recipiente apto para microondas, se añadieron 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (200 mg, 0,54 mmol), 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (149 mg, 0,67 mmol), K₂CO₃ (186 mg, 1,34 mmol), 1,4-dioxano (7 ml) y agua (3,5 ml). Se desgasificó la solución burbujeando nitrógeno durante 10 min, y luego se añadió diclorometano de Pd(dppf)₂Cl₂ (20 mg, 0,0269 mmol). Se cerró el recipiente apto para microondas y se hizo reaccionar en un reactor de microondas a 120°C durante 20 min. Se enfrió el recipiente de microondas y luego se extrajo la mezcla en diclorometano, y se lavó con agua. Se retiraron las sustancias volátiles, y se adsorbió el residuo sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía de desorción súbita (SiO₂, diclorometano:CH₃OH (100:0-80:20)), obteniéndose 3-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un aceite marrón (rendimiento del 7%).

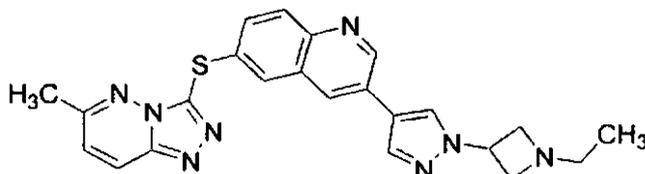
Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 21: *tert*-butiléster de ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-azetidín-1-carboxílico, *tert*-butiléster de ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-ilmetil}-azetidín-1-carboxílico.

Ejemplo 22: 3-(1-Azetidin-3-il-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (Compuesto 62)

A *tert*-butiléster de ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-azetidín-1-carboxílico (65 mg, 0,126 mmol), se añadió 6 ml de TFA:diclorometano (1:1). Se dejó reposar la mezcla durante 2 horas. Se eliminaron los volátiles mediante rotavaporización, y luego se añadieron metanol (6 ml) y MP-carbonato (500 mg, 3,18 mmol/g). Se filtró la resina y se eliminaron las sustancias volátiles al vacío, proporcionando 3-(1-azetidín-3-il-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina en forma de un sólido amarillo (rendimiento cuantitativo).

Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 22: 3-(1-Azetidin-3-ilmetil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 3-(1-azetidín-3-il-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 3-(1-azetidín-3-ilmetil-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina.

5 **Ejemplo 23: 3-[1-(1-Etil-azetidín-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (Compuesto 61)**



10 A 3-(1-azetidín-3-il-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (63 mg, 0,152 mmol) en diclorometano (3,0 ml), se añadió acetaldehído (34 μ l, 0,608 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (80 mg, 0,380). Tras 1 hora, se diluyó la solución con diclorometano (3,0 ml) y se lavó con bicarbonato sódico (3,0 ml). A continuación, se extrajo la capa acuosa con diclorometano (3,0 ml). Se lavaron las capas de diclorometano combinadas con salmuera (6 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. Se concentró el filtrado al vacío sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía de desorción súbita (SiO_2 , diclorometano: $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$, (95:4,995:0,005-80:19,98:0,02),
15 obteniéndose 23 mg de 3-[1-(1-etil-azetidín-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina (rendimiento del 34%).

Los siguientes compuestos se prepararon según el Ejemplo 23: 3-[1-(1-metilazetidín-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 3-[1-(1-etil-azetidín-3-ilmetil)-1*H*-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 3-[1-(1-isopropil-azetidín-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina, 3-[1-(1-etil-azetidín-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pirazin-3-il-sulfanil)-quinolina.
20

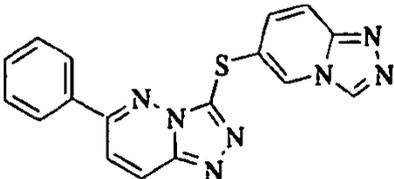
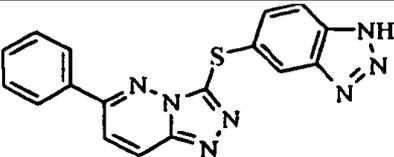
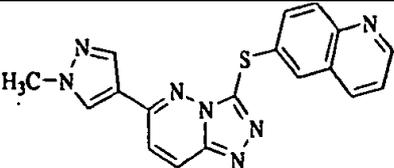
En la Tabla I, se describen además la estructura, el nombre, y los datos físicos y biológicos de los compuestos.

Tabla I

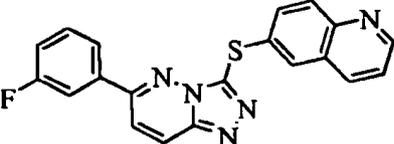
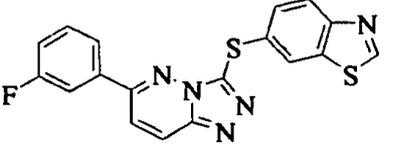
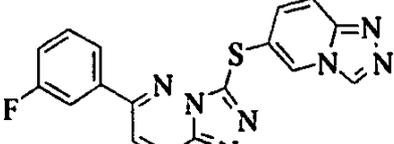
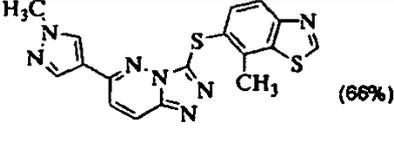
Compuestos	Cl_{50} de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl_{50}	Estructura	RMN de ^1H (500 MHz)	EM (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$
1	I	I	<p>6-(6-Fenil-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- d_6) δ : 7,50 (m, 2H), 7,55 (m, 2H), 7,74 (dd, 1H), 7,93 (m, 2H), 7,99 (d, 1H), 8,05 (d, 1H), 8,1,5(d, 1H), 8,35 (dd, 1H), 8,57(d, 1H), 8,89 (dd, 1H)	356

25

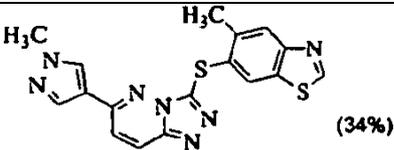
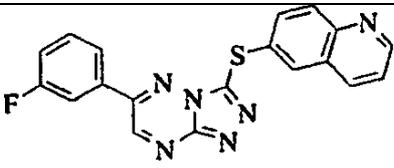
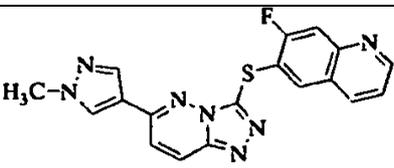
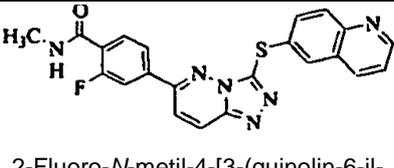
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
2	III		 <p>6-Fenil-3-([1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo [4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,42 (dd, 1H), 7,47-7,51 (m, 3H), 7,84 (d, 1H), 7,92-7,94 (m, 2H), 7,98 (d, 1H), 8,04 (s, 1H), 8,48 (d, 1H)	346
3	III		 <p>3-(1<i>H</i>-Benzotriazol-5-il-sulfanil)-6-fenil[1,2,4]triazolo-[4,3-<i>b</i>]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,48 (dd, 1H), 7,58 (m, 3H), 7,81, (d, 1H), 8,04-8,07 (m, 3H), 8,54 (d, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,25 (s, 1H)	346
4	I	I	 <p>6-[6-(1-Metil-1<i>H</i>-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo-[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil]quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,95 (s, 3H), 7,57 (dd, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,01, (d, 1H), 8,1,7 (d, 1H), 8,24 (d, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,34 (dd, 1H), 8,86 (dd, 1H)	360

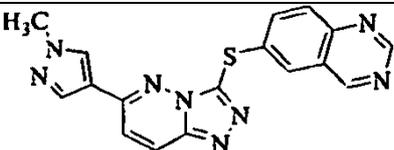
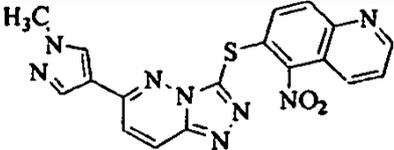
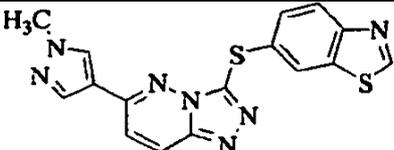
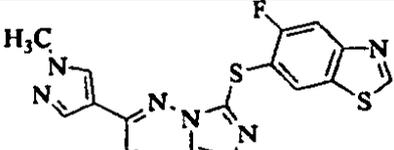
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
5	I	I	 <p>6-[6-(3-Fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,41, (dt, 1H), 7,54 (m, 2H), 7,70 (dt, 1H), 7,74 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,09 (d, 1H), 8,1,6 (d, 1H), 8,35 (dd, 1H), 8,61, (d, 1H), 8,89 (dd, 1H)	374
6	II	II	 <p>3-(Benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(3-fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,42 (dt, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,63 (dd, 1H), 7,75 (dt, 1H), 7,83 (d, 1H), 8,07 (d, 1H), 8,08 (d, 1H), 8,38 (d, 1H), 8,59 (d, 1H), 9,41, (s, 1H)	380
7	III	III	 <p>6-(3-Fluoro-fenil)-3-([1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,47 (m, 2H), 7,64 (m, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,87 (dt, 1H), 7,92(d, 1H), 8,09 (d, 1H), 8,58(d, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,23 (s, 1H)	364
8	I	I	 <p>3-(7-Metil-benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina (66%)</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,75 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 7,62 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,33 (d, 1H), 8,39 (s, 1H), 9,39 (s, 1H)	380

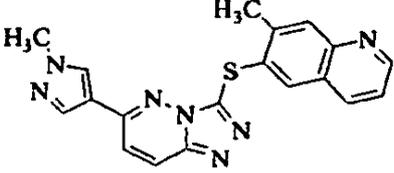
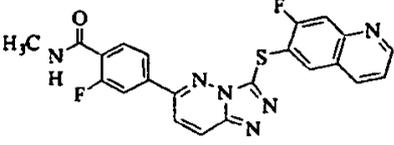
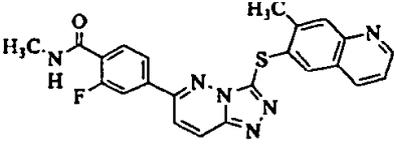
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
			 <p>3-(5-Metil-benzotiazol-6-il-sulfanil)-6(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina (34%)</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,55 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 7,69 (d, 1H), 7,98 (m, 2H), 8,25 (s, 1H), 8,34 (d, 1H), 8,40 (s, 1H), 9,30 (s, 1H)	
9	I	I	 <p>6-[6-(3-Fluoro-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,47 (dt, 1H), 7,56 (dd, 1H), 7,61 (dt, 1H), 7,79 (dd, 1H), 7,83 (dt, 1H), 7,89 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,17 (d, 1H), 8,33 (dd, 1H), 8,90 (dd, 1H), 9,48 (s, 1H)	375
10	I	I	 <p>7-Fluoro-6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,88 (s, 3H), 7,53 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,91, (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,22 (d, 1H), 8,38 (dd, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,45(d, 1H), 8,92 (dd, 1H)	378
11	I	II	 <p>2-Fluoro-<i>N</i>-metil-4-[3-(quinolin-6-il-sulfanil)-(1,2,4)triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-6-il]benzamida</p>	(CD ₃ OD) δ: 2,95 (s, 3H), 7,56-7,59 (m, 1H), 7,70-7,72 (d, 1H), 7,81-7,85 (m, 3H), 8,01, (d, 2H), 8,21, (d, 1H), 8,34 (d, 1H), 8,40(d, 1H), 8,86 (d, 1H)	431

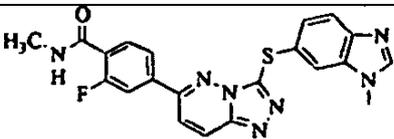
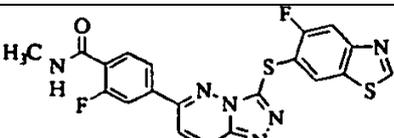
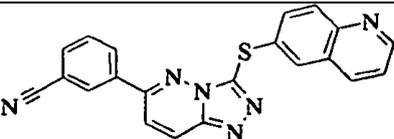
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
12	II	II	 <p>6-[6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinazolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,90 (s, 3H), 7,74 (d, 1H), 7,77 (dd, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,97 (d, 1H), 8,20 (d, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,41 (d, 1H), 8,84 (s ancho, 1H), 9,20 (d, 1H)	361
13	II	II	 <p>6-[6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-5-nitro-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,85 (s, 3H), 7,44 (d, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,86 (s, 1H), 8,1,0 (d, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,52 (d, 1H), 8,53 (d, 1H), 9,05 (dd, 1H)	405
14	I	I	 <p>3-(Benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,91 (s, 3H), 7,63 (dd, 1H), 7,77 (d, 1H), 8,05-8,07 (m, 2H), 8,40-8,47 (m, 3H), 9,41 (s, 1H)	366
15	I	I	 <p>3-(5-Fluoro-benzotiazol-6-il-sulfanil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,84 (s, 3H), 7,70 (d, 1H), 7,98 (s, 1H), 8,03(d, 1H), 8,36-8,39 (m, 3H), 9,43 (s, 1H)	384

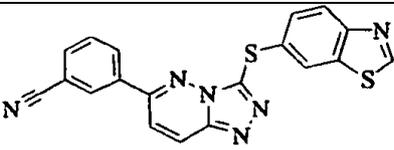
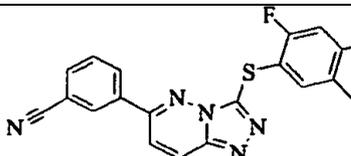
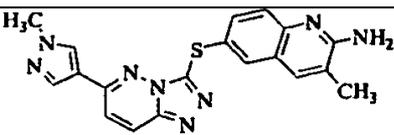
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
16	I	I	 <p>7-Metil-6-[6-(1-metil)-1H-pirazol-4-il]-[1,2,4]triazolo [4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,65 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 7,45 (dd, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 8,27 (dd, 1H), 8,43 (d, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,85 (dd, 1H)	374
17	I	I	 <p>2-Fluoro-4-[3-(7-fluoro-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il]-N-metil-benzamida</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,79 (d, 3H), 7,54-7,57 (m, 1H), 7,72 (t, 1H), 7,81 (dd, 1H), 7,85 (dd, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,1,2 (d, 1H), 8,29 (d, 1H), 8,39 (m, 2H), 8,63 (d, 1H), 8,93-8,95 (m, 1H)	449
18	I	I	 <p>2-Fluoro-N-metil-4-[3-(7-metil-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il]benzamida</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,64 (s, 3H), 2,79 (d, 3H), 7,46-7,49 (m, 1H), 7,74 (t, 1H), 7,82-7,85 (m, 1H), 7,87 (m, 1H), 8,00 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 8,1,1, (s, 1H), 8,27 (m, 1H), 8,39 (m ancho, 1H), 8,60 (d, 1H), 8,87 (m, 1H)	445

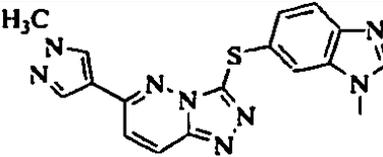
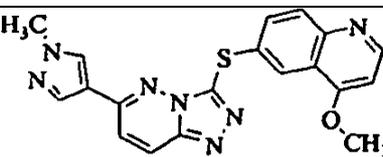
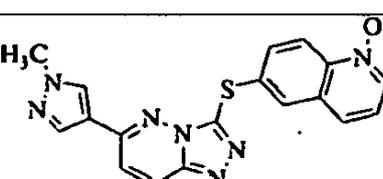
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
1,9	I	I(BaF ₃)	 <p>2-Fluoro-N-metil-4-[3-(3-metil-3H-benzoimidazol-5-il-sulfanil)[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il]-benzamida</p>	(DMSO-d ₆) δ: 2,80 (d, 3H), 3,82 (s, 3H), 7,38 (dd, 1H), 7,65 (d, 1H), 7,78 (t, 1H), 7,86-7,89 (m, 1H), 7,94-7,97 (m, 2H), 8,08 (d, 1H), 8,24 (s, 1H)	434
20	I	I(BaF ₃)	 <p>2-Fluoro-4-[3-(5-fluorobenzotiazol-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il]-N-metil-benzamida</p>	(DMSO-d ₆) δ: 3,11 (d, 3H), 8,06 (t, 1H), 8,15-8,21 (m, 2H) 8,42 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,70-8,74 (m ancho, 1H), 8,77 (d, 1H), 8,92 (d, 1H), 9,83 (s, 1H)	455
21	I	I (BaF ₃)	 <p>3-[3-(Quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il]-benzonitrilo</p>	(DMSO-d ₆) δ: 7,48 (dd, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,68 (dd, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,96 (dt, 1H), 8,08 (d, 1H), 8,1,2 (d, 1H), 8,1,8 (dt, 1H), 8,28 (dd, 1H), 8,33 (t, 1H), 8,58 (d, 1H), 8,83 (dd, 1H)	381

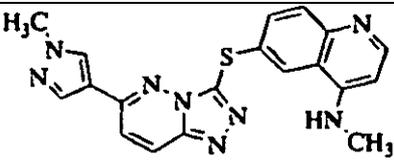
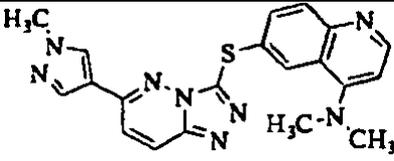
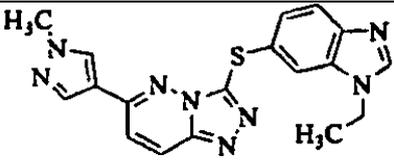
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
22	I	II (BaF ₃)	 <p>3-[3-(Benzotiazol-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-6-il]-benzonitrilo</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,65 (dd, 1H), 7,76 (t, 1H), 8,05 (dt, 1H), 8,08 (d, 1H), 8,1,5 (d, 1H), 8,28 (dt, 1H), 8,39(d, 1H), 8,44 (t, 1H), 8,64(d, 1H), 9,42 (s, 1H)	387
23	I	I(BaF ₃)	 <p>3-[3-(7-Fluoro-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,2-<i>b</i>]piridazin-6-il]-benzonitrilo[4,3-<i>b</i>]piridazin-6-il]-benzonitrilo</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,48 (dd, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,85(d, 1H), 7,98 (dd, 1H), 8,08 (d, 1H), 8,1,8 (dt, 1H), 8,23 (d, 1H), 8,32-8,36 (m, 2H), 8,58 (d, 1H), 8,86 (dd, 1H)	399
24	II		 <p>7-Metil-6-[6-(1-metil-1<i>H</i>-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolin-2-ilamina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,1,8 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 6,46 (s ancho, 2H), 7,41 (d, 1H), 7,53 (dd, 1H), 7,73 (d, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,90 (d, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,38 (d, 1H), 8,47 (s, 1H)	389

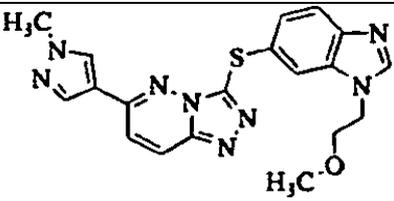
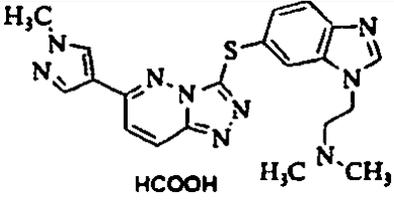
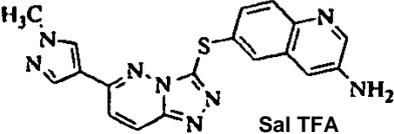
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
25	I	I	 <p>3-(3-Metil-3H-benzoimidazol-5-il-sulfanil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,81 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 7,39 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,96 (d, 1H), 8,1,1 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,39 (d, 1H), 8,51 (s, 1H)	363
26	I	I	 <p>4-Metoxi-6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,90 (s, 3H), 4,02 (s, 3H), 7,06 (d, 1H), 7,76-7,78 (m, 2H), 7,91, (d, 1H), 8,05 (s, 1H) 8,32 (d, 1H), 8,43 (d, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,73 (d, 1H)	390
27	III		 <p>N-óxido de 6-[6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,89 (s, 3H), 7,47 (dd, 1H), 7,75 (dd, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 8,00 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,46 (d, 1H), 8,49 (d, 1H), 8,55 (d, 1H)	376

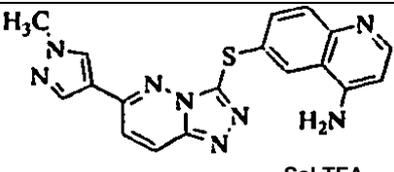
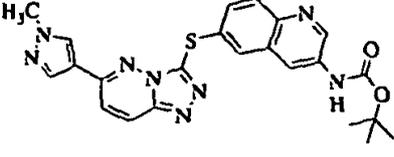
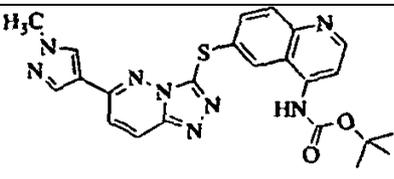
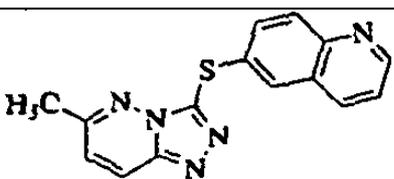
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
28	III		 <p>Metil-6-{6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil}quinolin-4-il)-amina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,96 (d, 3H), 3,98 (s, 3H), 6,48 (d, 1H), 7,60 (c ancho, 1H), 7,72 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,83 (d, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,60 (d, 1H)	389
29	II		 <p>Dimetil-6-{6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil}quinolin-4-il)-amina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,96 (s, 6H), 3,98 (s, 3H), 6,95 (d, 1H), 7,79 (dd, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,96 (d, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,1,6(d, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,54 (d, 1H), 8,65 (d, 1H)	403
30	I	I	 <p>3-(3-Etil-3H-benzoitridazol-5-il-sulfanil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 1,27 (t, 3H), 3,86 (s, 3H), 4,20 (c, 2H), 7,31 (d, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,33 (d, 1H), 8,47 (s, 1H)	377

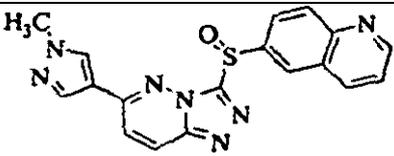
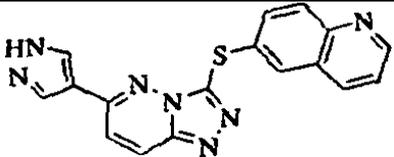
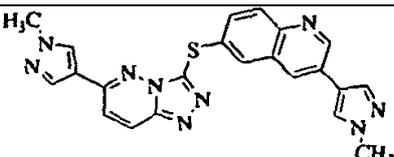
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
31	I	II	 <p>3-{3-(2-Metoxi-etil)-3H-benzoimidazol-5-il-sulfanil}-6-{1-metil-1H-pirazol-4-il}-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,05 (s, 3H), 3,51 (t, 2H), 3,86 (s, 3H), 4,34 (t, 2H), 7,32 (dd, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,94 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,1,5(s, 1H), 8,33 (d, 1H), 8,45 (s, 1H)	407
32	II	III	 <p>Dimetil-(2-{6-[6-{1-metil-1H-pirazol-4-il}-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-benzoimidazol-1-il}-etil)-amina, sal ácido fórmico</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,06 (s, 6H), 2,52 (t, 2H), 3,93 (s, 3H), 4,30 (t, 2H), 7,38 (dd, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,20 (s ancho, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,52 (s, 1H)	420
33	I	I	 <p>Sal TFA</p> <p>6-{8-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil}-quinolin-3-ilamina, sal ácido triacético</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,89 (s, 3H), 7,30 (sa, 1H), 7,35 (dd, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,4 (dd, 3H)	375

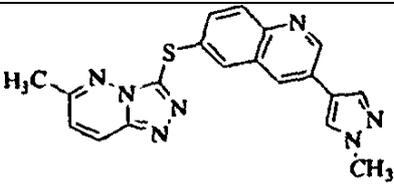
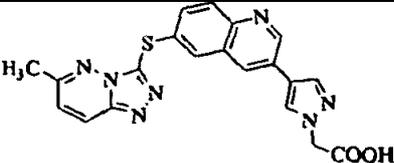
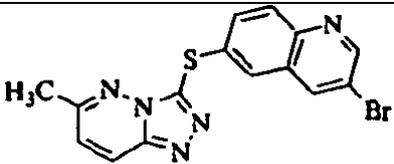
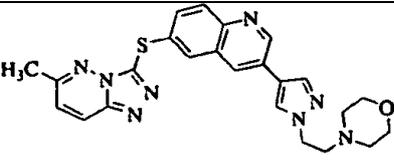
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
34	II		 <p>Sal TFA</p> <p>6-[6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfonil]-quinolin-4-ilamina, sal ácido trifluoroacético</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,90 (s, 3H), 6,76 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,83(d, 1H), 7,95 (dd, 1H), 8,01 (s, 1H), 8,41, (t, 1H), 8,47 (d,2H), 8,62 (d, 1H), 9,04 (d, 2H)	375
35	I	I	 <p>Terc-butiléster de ácido {6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolin-3-il}-carbámico</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 1,50 (s, 9H), 3,89 (s, 3H), 7,52 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 8,01 (d, 2H), 8,45 (m, 3H), 8,79 (d, 1H), 9,95(sa, 1H)	475
36	III		 <p>Terc-butiléster de ácido {6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-il}-carbámico</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 1,52 (s, 9H), 3,88 (s, 3H), 7,76 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,01 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,46 (d, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,81 (d, 1H), 1,0,21 (s, 1H)	475
37	II		 <p>6-(6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,53 (s, 3H), 7,39 (d, 1H), 7,55 (dd, 1H), 7,65 (dd, 1H), 7,98 (d, 1H), 8,00 (d, 1H), 8,32 (dd, 1H), 8,39 (d, 1H), 8,89 (d, 1H)	294

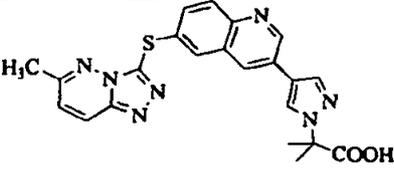
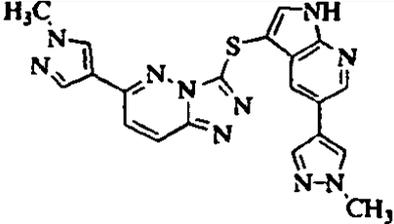
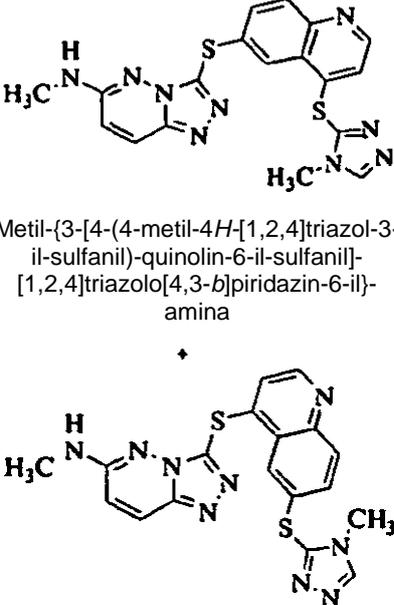
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
38	III		 <p>6-(6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina-3-sulfenil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,86 (s, 3H), 7,62 (dd, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,00 (dd, 1H), 8,1,1 (d, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,44(d, 1H), 8,63 (dd, 1H), 8,71, (d, 1H), 8,96 (dd, 1H)	376
39	I	II	 <p>6-(6-(1H-Piridazin-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfenil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 7,55 (1H, d), 7,75 (1H, dd), 7,83 (1H, d), 7,98 (1H, d), 8,01, (1H, s), 8,1,6 (1H, d), 8,35 (1H, d), 8,46 (1H, d), 8,47 (1H, s), 8,90 (1H, dd), 1,340 (1H, sa)	346
40	I	I	 <p>3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfenil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,88 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 7,67 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,95 (m, 2H), 8,03 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,43 (d, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,48 (d, 1H), 9,1,7(d, 1H)	440

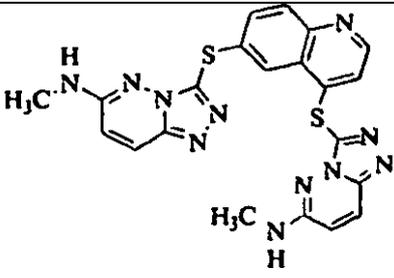
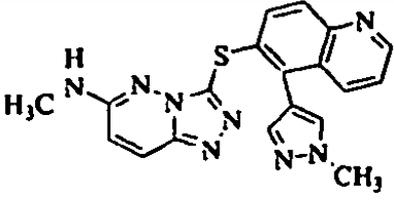
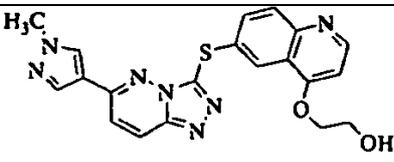
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
41	I	I	 <p>3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,47 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 7,33 (d, 1H), 7,51, (dd, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,33 (m, 2H), 9,1,0 (d, 1H)	374
42	I	III	 <p>Ácido {4-[6-{6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]pirazol-1-}acético</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,47 (s, 3H), 4,90 (s, 2H), 7,33 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,33 (m, 2H), 8,37 (d, 1H), 9,1,1, (d, 1H), 1,6,0 (s, 1H)	418
43	II		 <p>3-Bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,53 (s, 3H), 7,41 (d, 1H), 7,70 (dd, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,41 (d, 1H), 8,66 (d, 1H), 8,93 (d, 1H)	372, 374
44	I	I	 <p>6-(6-Metil-[1,2,4]triazolo[3,4-b]piridazin-3-il-sulfanil)-3-[1-(2-morfolin-4-il-etil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,35 (m, 4H), 2,46 (s, 3H), 2,68 (t, 2H), 3,48 (t, 4H), 4,20 (t, 2H), 7,33 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 8,01 (s, 1H), 8,33 (m, 2H), 8,37 (s, 1H), 9,1,0 (d, 1H)	473

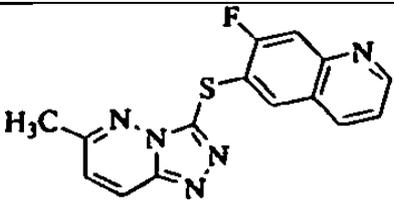
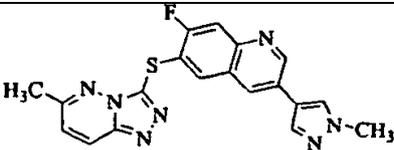
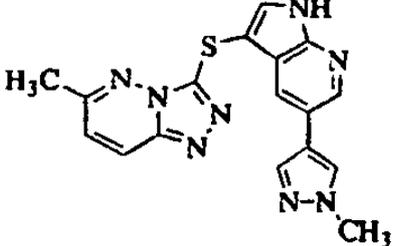
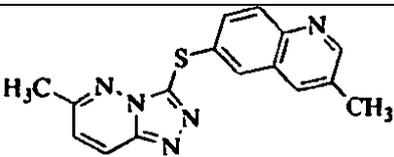
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
45	I	III	 <p>Ácido 2-metil-2-(4-[6-(6-metil-[1,2,4] triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il)-propiónico</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 1,70 (s, 6H), 2,44 (s, 3H), 7,33 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,34 (d, 1H), 8,38 (d, 1H), 8,54 (s, 1H), 9,17 (d, 1H)	446
46	I	I	 <p>6-(1-Metil)-1H-pirazol-4-il)-3-[5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,85 (3H, s), 3,92 (3H, s), 7,73 (1H, d), 7,88 (1H, d), 8,08 (1H, d), 8,1,4 (1H, d), 8,1,6 (1H, s), 8,1,9 (1H, s), 8,34 (1H, d), 8,53 (1H, s), 8,56 (1H, d), 12,26 (1H, s)	429
47	III		 <p>Metil-{3-[4-(4-metil-4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-quinolin-6-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il)-amina</p> <p>Metil-{3-[6-(4-metil-4H-[1,2,4] triazol-3-il-sulfanil)quinolin-4-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-il)amina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,45 (d, 3H), 2,59 (d, 3H), 3,51, (s, 3H), 3,55 (s, 3H), 6,73 (d, 1H), 6,79 (m, 2H), 7,00 (d, 1H), 7,48 (c, 2H), 7,55 (dd, 1H), 7,66 (dd, 1H), 7,93-7,98 (m, 4H), 8,04 (d, 1H), 8,1,0 (d, 1H), 8,59 (m, 2H), 8,74 (s, 1H), 8,83 (s, 1H)	422

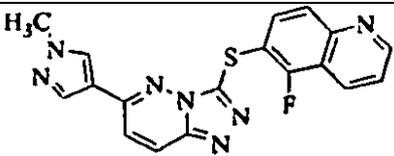
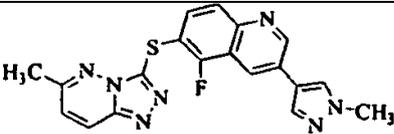
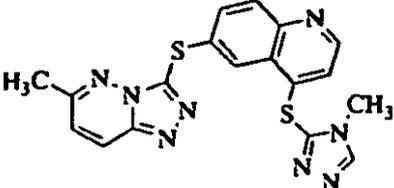
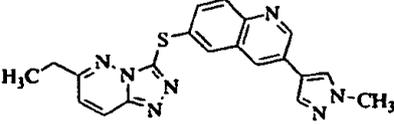
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
48	IV		 <p>4,6-bis(6-Metilamino-[1,2,4]triazolo [4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,58 (d, 3H), 2,75 (d, 3H), 6,94 (m, 2H), 7,08 (d, 1H), 7,61 (m, 2H), 7,79 (dd, 1H), 8,1,0 (m, 3H), 8,39 (s, 1H), 8,72 (d, 1H)	488
49	IV		 <p>Metil-3-[5-((1-metil-1<i>H</i>-pirazol-4-il)-quinolin-6-il-sulfanil)-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-6-il]amina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,56 (d, 3H), 3,99 (s, 3H), 6,82 (d, 1H), 7,21, (d, 1H), 7,46 (q, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,67 (s,1H), 7,85 (d, 1H), 7,98 (d, 1H), 8,04 (s, 1H), 8,09 (dd, 1H), 8,87 (dd, 1H)	389
50	I	I	 <p>2-(6-[8-(1-Metil-1<i>H</i>-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridin-3-il-sulfanil]-quinolin-4-iloxi)-etanol</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,86 (c, 2H), 3,91, (s, 3H), 4,26 (t, 2H), 5,1,2 (t, 1H), 7,06 (d, 1H), 7,72 (dd, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,89 (d, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,43 (s,1H), 8,46 (s,1H), 8,51, (d, 1H), 8,72 (d, 1H)	420

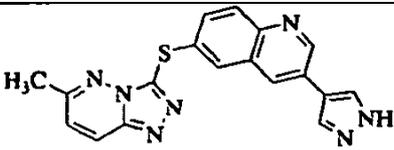
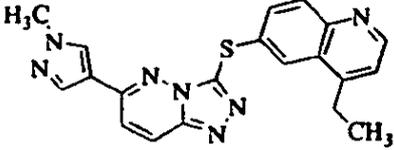
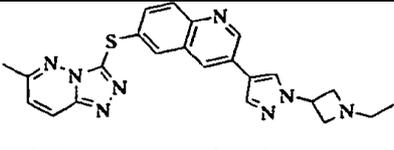
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
51	II		 <p>7-Fluoro-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo [4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,53 (s, 3H), 7,38 (d, 1H), 7,54 (dd, 1H), 7,92 (d, 1H), 8,03 (d, 1H), 8,34 (dd, 1H), 8,38 (d, 1H), 8,93 (dd, 1H)	312
52	I	I	 <p>7-Fluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo [4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,54 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 7,41 (d, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,89 (d, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,41 (d, 1H), 8,43 (d, 1H), 9,20 (d, 1H)	392
53	I	II	 <p>6-Metil-3-{5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol-2,3-b}piridin-3-il-sulfanil}-[1,2,4]triazolo [4,3-b]piridazina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,57 (3H, s), 3,86 (3H, s), 7,28 (1H, d), 7,90 (1H, d), 8,00 (1H, d), 8,1,4 (1H, d), 8,20 (1H, s), 8,21, (1H, d), 8,56 (1H, d), 12,27 (1H, s)	363
54	II		 <p>3-Metil-6-(6-metil-[1,2,4] triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,45 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 7,39 (d, 1H), 7,57 (dd, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,38 (d, 1H), 8,76 (d, 1H)	308

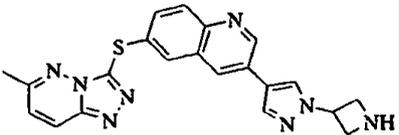
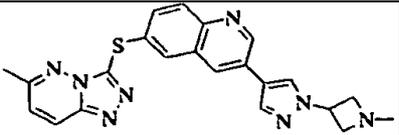
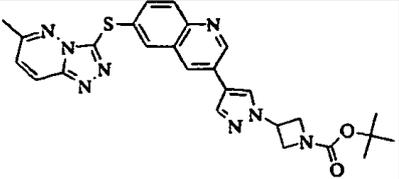
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
55	I	I	 <p>5-Fluoro-6-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo [4,3-b]piridazin-3-il sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 3,83 (s, 3H), 7,62 (dd, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,37 (d, 1H), 8,48 (d, 1H), 8,94 (dd, 1H)	378
56	I	I	 <p>5-Fluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,45 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 7,31, (d, 1H), 7,41, (dd, 1H), 7,73 (d, 1H), 8,1,6(s, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,50 (d, 1H), 9,22 (d, 1H)	392
57	IV		 <p>6-(6-Metil-1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-4-(4-metil-4H-[1,2,4]triazolo-3-il-sulfanil)quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 2,56 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 6,85 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,73 (dd, 1H), 8,03 (d, 1H), 8,1,9 (d, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,68 (d, 1H), 8,89 (s, 1H)	407
58	I	I	 <p>6-(6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-4-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 0,98 (t, 3H), 2,67 (m, 2H), 3,71, (s, 3H), 7,26 (d, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,76(d, 1H), 7,88 (s, 1H), 8,1,9(s, 1H), 8,23 (m, 2H), 8,99 (d, 1H)	388

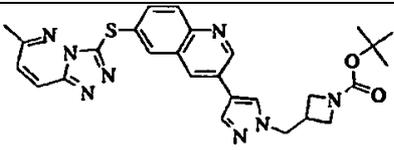
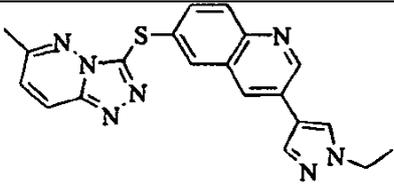
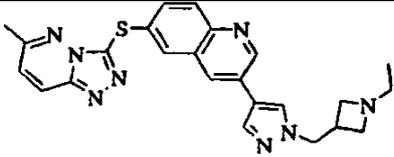
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
59	I	II	 <p>6-(6-Metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-3-(1H-pirazol-4-il)-quinolina</p>	(DMSO-d ₆) 8: 2,35 (s, 3H), 7,32 (d, 1H), 7,41 (m, 1H), 7,62 (d, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,95 (s, 1H), 8,23 (d, 1H), 8,27 (m, 2H), 9,05 (d, 1H)	360
60	I	I	 <p>4-Etil-6-[6-metil-1H-pirazol-4-il]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil]-quinolina</p>	(DMSO-d ₆) 8: 1,21 (t, 3H), 3,03 (c, 2H), 3,89 (s, 3H), 7,40 (d, 1H), 7,69 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,96 (d, 1H), 8,01 (s, 1H), 8,28 (d, 1H), 8,45 (m, 2H), 8,78 (d, 1H)	388
61	I	I	 <p>3-[1-(1-Etil-azetidín-3-il)-1H-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO-d ₆) 8: 2,53 (s, 3H), 3,35 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 4,99 (m, 1H), 5,71 (s, 2H), 7,39 (d, 1H), 7,59 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,1,4 (s, 1H), 8,41 (d, 1H), 8,43 (1H,d), 8,60 (1H, s), 9,19 (1H, d)	443

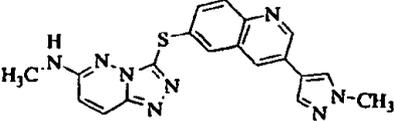
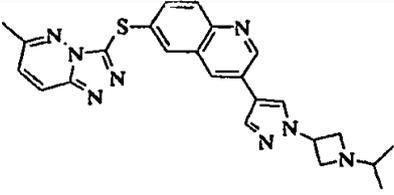
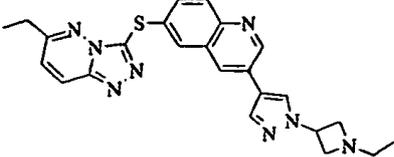
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
62	I	I	 <p>3-(1-Azetidin-3-il-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO-d ₆) δ: 2,50 (s, 3H), 3,84 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 5,23 (quint, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,61, (dd, 1H), 7,81, (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,1,8 (s, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,44 (d, 1H), 8,59 (s, 1H), 9,20 (d, 1H)	415
63	I	I	 <p>3-[1-(1-Metil-azedin-3-il)-1H-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO-d ₆) δ: 2,34 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 3,41, (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 4,98 (quint, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,60 (dd, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,1,5 (s, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,44 (d, 1H), 8,60 (s, 1H), 9,20 (d, 1H)	429
64	I	I	 <p>Terc-butiléster de ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-azetidin-1-carboxílico</p>	(DMSO-d ₆) δ: 1,42 (s, 9H), 2,54 (s, 3H), 4,1,7(ma, 2H), 4,34 (ma, 2H), 5,26 (m, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,60 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,45 (d, 1H), 8,63 (s, 1H), 9,21, (1H, d)	515

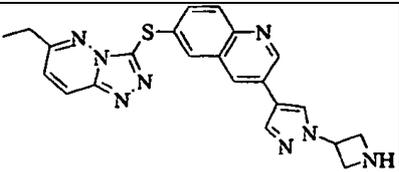
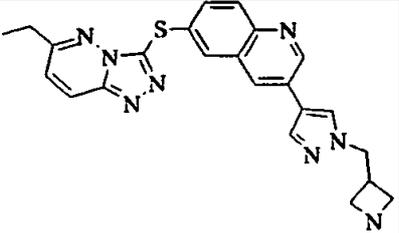
(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
65	I	I	 <p>Terc-butiléster de ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-ilmetil}-azetidín-1-carboxílico</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 1,35 (s, 9H), 2,52 (s, 3H), 3,00 (m, 1H), 3,70 (ma, 2H), 3,90 (ma, 2H), 4,37 (d, 2H), 7,39 (d, 1H), 7,60 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,1,0 (s, 1H), 8,39 (d, 1H), 8,40 (s, 1H), 9,1,6 (d, 1H)	529
66	I	I	 <p>3-(1-Etil-1<i>H</i>-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 1,42 (t, 3H), 2,53 (s, 3H), 4,1,8 (c, 2H), 7,39 (d, 1H), 7,58 (dd, 1H), 7,79(d, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,07 (s,1H), 8,38 (d, 1H), 3,39 (s, 1H), 8,43 (s,1H), 9,1,7 (d, 1H)	388
67	I	I	 <p>3-[1-(1-Etil-azetidín-3-ilmetil)-1<i>H</i>-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 0,84 (t, 3H), 2,37 (c, 2H), 2,52 (s, 3H), 2,81, (m, 1H), 2,93-3,00 (m, 2H), 3,1,9-3,25 (m, 2H), 4,32 (d, 2H), 7,40 (d, 1H), 7,59 (dd, 1H), 7,79(d, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,07 (d, 1H), 8,38-8,43 (m, 3H), 9,1,7 (d, 1H)	457

(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
68	I	I	 <p>Metil-[3-[3-(1-metil-1<i>H</i>-pirazolo-4-il)-quinolin-6-il-sulfanil]-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-6-il]amina</p>	(CD ₃ OD) δ: 2,72 (s,3H), 3,96 (s,3H), 6,83 (d, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,81, (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,02 (s, 1H),8,1,9(s, 1H), 8,35 (s, 1H), 9,06 (d, 1H)	389
69	I	I	 <p>3-[1-(1-Isopropil-azetidín-3-il)-1<i>H</i>-pirazolo-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 0,91, (d, 6H), 2,44 (m, 1H), 2,54 (s,3H), 3,36 (m, 2H), 3,69 (m, 2H), 4,94 (quintet, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,60 (dd, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,1,5 (s, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,44 (d, 1H), 8,61, (s, 1H), 9,21, (d, 1H)	457
70	I	I	 <p>3-[1-(1-Etil-azetidín-3-il)-1<i>H</i>-pirazol 4-il]-6-(6-etil-[1,2,4] triazolo[4,3-<i>b</i>]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>	(DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 0,86 (t, 3H), 1,09 (t, 3H), 2,77 (c, 2H), bajo pico de DMSO (c, 2H), bajo pico de H ₂ O (m, 2H), 3,63 (m, 3), 4,93 (quint, 1H), 7,37 (d, 1H), 7,54 (dd, 1H), 7,78(d, 1H), 7,88 (d, 1H), 8,08 (s, 1H), 8,34 (d, 1H), 8,38(d, 1H), 8,54 (s, 1H), 9,1,4 (d, 1H)	457

(Continuación)

Compuestos	Cl ₅₀ de c-Met del ensayo enzimático	Ensayo de XTT (GTL16) Cl ₅₀	Estructura	RMN de ¹ H (500 MHz)	EM (m/z) [M+H] ⁺
71			 <p>3-(-Azetidino-3-il-1H-pirazolo-4-il)-6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>		429
72			 <p>3-(1-Azetidin-3-ilmetil-1H-pirazolo-4-il)-6-(6-etil-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-3-il-sulfanil)-quinolina</p>		443
En la que: I Cl ₅₀ < 1,00nM; II 1,00nM < Cl ₅₀ < 1 μM; III 1mM < Cl ₅₀ < 1,0μM; y IV Cl ₅₀ > 10μM					

Ejemplo 24: Ensayos *in vitro*

Para analizar las actividades inhibitoras de los compuestos y de las composiciones de la presente revelación, se pueden usar los ensayos con quinasas conocidos por los expertos en la técnica. Los ensayos de quinasas incluyen, pero sin limitación, los siguientes ejemplos.

Los datos de rastreo se evaluaron con la ecuación: $Z' = 1 - [3 * (\sigma_+ + \sigma_-) / |\mu_+ - \mu_-|]$ (Zhang, *et al.*, 1,999, *J Biomol Screening* 4(2) 67-73), en la que μ indica la media y σ , la desviación estándar. El subíndice indica los controles positivo o negativo. La puntuación Z' para un análisis de rastreo potente debería ser $\geq 0,50$. El umbral típico = $\mu_+ - 3 * \sigma_+$. Cualquier valor por debajo del umbral se considera un "éxito". La respuesta a la dosis se analizó con la ecuación: $y = \min + \{(\max - \min) / (1 + 10^{[\text{compuesto}] - \log Cl_{50}})\}$, en la que y es la pendiente inicial observada; max = la pendiente en ausencia de inhibidor; min = la pendiente a un inhibidor infinito y Cl₅₀ es la concentración de compuesto que corresponde a 1/2 de la amplitud total observada (amplitud = max-min).

Ensayo enzimático basado en la luminiscencia de MET

Materiales: Sustrato Poly Glu-Tyr (4:1) (Sigma N.º de cat. P-0275), ATP (Sigma N.º de cat. A-3377, FW = 551), tampón de HEPES, pH 7,5, albúmina de suero bovino (ASB) (Roche 92423420), MgCl₂, Estaurosporina (*Streptomyces sp.* Sigma N.º de cat. 85660-1MG), placa blanca de fondo plano de 384 pocillos Costar (VWR N.º de cat. 29444-088). Quinasa MET (véase más adelante), Kinase-Glo™ (Promega N.º de cat. V6712).

Solución madre: 1,0 mg/ml de poly Glu-Tyr en agua, almacenado a -20°C; tampón HEPES 100mM, pH 7,5 (5 ml de solución madre 1M + 45 ml de miliQH₂O); ATP 10mM (5,51 mg/ml en H₂O) almacenado a -2°C (50 μl diluidos en un total de 10 ml de miliQH₂O al día = solución madre de trabajo de ATP 50μM); ASB al 1% (1 g de BSA en 100 ml HEPES 0,1M, pH 7,5, almacenada a -20°C), MgCl₂ 100mM; Estaurosporina 200μM, 2 x reactivo Kinase-Glo™ (recién preparado o almacenado a -20°C).

Configuración del ensayo estándar para el formato de 384 pocillos (20 μl de reacción de quinasa, 40 μl de reacción de detección): MgCl₂ 10mM; 0,3 mg/ml de poly Glu-Tyr; ABS al 0,1%; 1 μl de compuesto de prueba (en DMSO); 0,4 μg/ml de quinasa MET; ATP 10μM; tampón HEPES 100Mm. Los controles positivos contenían DMSO sin compuesto

de prueba. Los controles divergentes contenían estaurosporina 10 μ M,. La reacción de la quinasa se inició en el punto temporal t = 0 mediante la adición de ATP . Se incubaron las reacciones de las quinasas a 21°C durante 60 min, luego se añadieron 20 μ l de reactivo Kinase-Glo™ a cada pocillo para detener la reacción de la quinasa e iniciar la reacción de luminiscencia. Tras una incubación de 20 min, a 21°C, se detectó luminiscencia en un luminómetro de lectura de placas.

La purificación de Met:

Se volvieron a suspender nódulos celulares producidos a partir de la mitad de un cultivo de células de insecto Sf9 de 12 l que expresaba el dominio quinasa de Met humana en un tampón que contenía Tris-HCl 50mM, pH 7,7, y NaCl 250mM, en un volumen de aproximadamente 40 ml por cada litro de cultivo original. Se añadió un comprimido de cóctel de inhibidores de proteasa libres de EDTA completo de Roche (n.º de cat. 1873580) por cada litro de cultivo original. Se agitó la suspensión durante 1 h a 4°C. Se retiraron los restos celulares mediante centrifugación durante 30 min a 39.800 xg a 4°C. Se decantó el sobrenadante en un vaso de precipitados de 500 ml y se añadieron 10 ml de suspensión al 50% de agarosa de Ni-NTA Qiagen (N.º de cat. 30250) previamente equilibrada en Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 50mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM, y se agitó durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se vertió la muestra en una columna de goteo a 4°C y se lavó con 10 volúmenes de columna de Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM. Se eluyó la proteína con un gradiente por etapas con dos volúmenes de columna cada uno con el mismo tampón que contenía imidazol 50mM, 200mM y 500mM, secuencialmente. Se escindió el marcador de histidina x 6 durante una noche usando 40 unidades de proteasa de TEV (Invitrogen n.º de cat. 10127017) por cada mg de proteína, mientras se sometía a diálisis en Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM a 4°C. Se retiró el marcador de histidina x6 haciendo pasar la muestra sobre una columna IMAC de 5 ml Pharmacia (n.º de cat. 17-0409-01) cargada con níquel y equilibrada con Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM. La proteína escindida se unió a la columna de níquel a una baja afinidad, y se eluyó con el gradiente por etapas. El gradiente por etapas se efectuó con el 15% y luego el 80% del lado B (lado A = Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM; lado B = Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 500mM y metionina 10mM) para 4 volúmenes de columna cada vez. La proteína Met se eluyó en la primera etapa (15%), mientras que la Met no escindida y el marcador de histidina escindido se eluyeron en el 80% de las fracciones. Se mezcló el 15% de las fracciones cuando un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS confirmó la presencia de Met escindida; se realizó otra purificación mediante cromatografía en filtración en un Superdex 200 16/60 HiLoad de Amersham Biosciences de calidad prep. (n.º de cat. 17-1069-01) equilibrado en Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 150mM, glicerol al 10% y DTT 5mM. . Se combinaron las fracciones más limpias y se concentraron hasta ~10,4 mg/ml mediante centrifugación en una unidad de filtración centrífuga MWCO de 10.000 Da Ultra-15 de Amicon (n.º de cat. UFC901024).

Perfil de quinasas SelectScreen™ (Invitrogen Corp.)

SelectScreen™ es la marca comercial del protocolo de ensayos de rastreo para quinasas desarrollado por Invitrogen Corporation, Madison, Wis. En la página web de la compañía, se puede encontrar la información sobre las condiciones del ensayo.

La Tabla II resume el % de inhibición de los compuestos 4 y 41 contra un grupo de cinasas a una concentración 1 μ M.

Tabla II

Quinasa analizada	% de inhibición a 1 μ M	
	Compuesto 4	Compuesto 41
ABL1 T315I	11	47
ABL1 Y253F	20	30
AKT1 (PKB alfa)	5	-1
ALK	-10	23
AURKA (Aurora A)	18	49
AURKB (Aurora B)	7	61
BRAF V599E	36	7
CDK1/ciclina B	5	17
CSF1R (FMS)	1,9	79
EGFR (ErbB1)	-2	0
EPHA2	-23	2
FES (FPS)	5	1
FGFR3	-4	26

(continuación)

Quinasa analizada	% de inhibición a 1µM	
	Compuesto 4	Compuesto 41
FLT3 D835Y	8	35
FRAP1 (mTOR)		0
GRK4	2	-4
GSK3B (GSK3 beta)	5	1
HCK	8	9
IGF1R	-3	6
IKKB (IKK beta)	-5	1
JAK2 JH1 JH2 V617F	-11	9
KDR (VEGFR2)	5	16
KIT T670I	-12	4
MAP2K1 (MEK1)	16	3
MAP4K4 (HGK)	-1	27
MAPK1 (ERK2)	9	0
MERTK (cMER)	7	10
MET (cMet)	92	98
MET M1250T	64	89
MST1R (RON)	9	53
NTRK3 (TRKC)	7	85
PDGFRA T674I	-9	-1
PKD1	7	6
PIM1	4	0
PLK1	0	0
PRKCD (PKC delta)	4	5
PTK2B (FAK2)	6	12
RET	5	21
ROS1	7	41
RPS6KB1 (p70S6K)	3	5
(TEK (Tie2)	8	4
TYRO3 (RSE)	19	22

Ensayos celulares

Se mantuvieron células GTL16 en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF), L-glutamina 2mM y 100 unidades de penicilina/100 µg de esteptomicina a 37°C en CO₂ al 5%.

- 5 Se crearon células Ba/F3 TPR-MET transduciendo de manera estable el gen TPR-MET humano en células Ba/F3 con un sistema retroviral. Todas las líneas celulares se cultivaron en RPMI-1640 complementado con 1 x penicilina/estreptomicina y suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Carlsbad, CA). Se mantuvieron las células en una incubadora humidificada de CO₂ al 5% a 37°C.

Ensayos de supervivencia celular

- 10 Los compuestos se analizaron en los siguientes ensayos por duplicado.

Ensayo XTT de 96 pocillos (células GTL16): Un día antes del ensayo se aspiró el medio de crecimiento y se añadió el medio de ensayo a las células. El día del ensayo, se cultivaron las células en medio de ensayo que contiene diversas concentraciones de los compuestos (por duplicado) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 72 horas a 37°C en CO₂ al 5%. El número de células inicial fue de 5.000 células por pocillo, y el volumen fue de 120 µl. Al finalizar la incubación de 72 horas, se añadieron 40 µl de mezcla de marcaje XTT (solución 50:1 de ácido 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenosulfónico sódico hidratado y reactivo de acoplamiento electrónico: PMS (metilsulfato de N-metildibenzopirazina) a cada pocillo de la placa. Tras otras 5 horas más de incubación a 37°C, se leyó la absorbancia a 450 nm con una corrección de fondo de 650 nm con un espectrofotómetro.

15

Ensayo XTT de 96 pocillos (células Ba/F3): Las células se cultivaron en medio de crecimiento que contiene diversas concentraciones de los compuestos (por duplicado) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 72 horas a 37°C. El número inicial de células fue de 5.000-8.000 por pocillo y un volumen de 120 µl. Al finalizar la incubación de 72 horas, se añadieron 40 µl de mezcla de marcaje XTT (solución 50:1 de ácido 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenosulfónico sódico hidratado y reactivo de acoplamiento electrónico: PMS (metilsulfato de *N*-metildibenzopirazina) a cada pocillo de la placa. Tras otras 2-6 horas más de incubación a 37°C, se leyó la absorbancia a 405 nm con una corrección de fondo de 650 nm con un espectrofotómetro.

Ensayos de fosforilación

Ensayo de fosforilación de MET: Se sembraron células GTL16 a 1×10^6 células en 60 placas de 15 mm (Falcon) en 3 ml de medio de ensayo. Al día siguiente, se añadió el compuesto a diversas concentraciones en el medio de ensayo y se incubó durante 1 hora a 37°C y CO₂ al 5%. Tras 1 h, se aspiró el medio y se lavaron las células una vez con 1 x PBS. Se aspiró el PBS y se cosecharon las células en 100 µl de tampón de lisis de RIPA modificado (Tris-Cl pH 7,4, NP-40 al 1%, EDTA 5mM, NaPP 5mM, NaF 5mM, NaCl 150mM, cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), PMSF 1mM, NaVO₄ 2mM) y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,7 ml y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Tras la lisis, se centrifugaron los tubos (10 minutos, 14.000 g, 4°C). A continuación, se transfirieron los lisados a un nuevo tubo Eppendorf. Se diluyeron las muestras 1:2 (250.000 células/tubo) con 2 x tampón de carga de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, y se calentaron durante 5 minutos a 9°C. Se separaron los lisados sobre 12 pocillos de 1 mm de gel de Bis-Tris al 4-12% NuPage (Invitrogen) a 200 V y 400 mA durante aproximadamente 40 minutos. Luego se transfirieron las muestras a un sándwich de papel filtrante con membrana de nitrocelulosa de 0,45 micrómetros (Invitrogen) durante 1 hora a 75 V y 400 mA. Tras la transferencia, se colocaron las membranas en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, meciedo suavemente. Se retiró el tampón de bloqueo y se añadió una dilución 1:500 de anticuerpo anti-fosfo-Met (Tyr1234/1235) (Cell Signaling Technologies n.º de cat. 3126L) en ASB al 5%, Tween@20 al 0,05% en 1 x PBS, y se incubaron las transferencias durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron las transferencias tres veces con 1 x PBS, Tween@20 al 0,1%. Se añadió una dilución 1:3.000 de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP ((Jackson ImmunoResearch Laboratories n.º de cat. 111-035-003) en tampón de bloqueo, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, meciedo suavemente. Se lavó la transferencia 3 veces en PBS, Tween@20 al 0,1% y se visualizó mediante la quimioluminiscencia con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce n.º 34078).

Ejemplo 25: Modelo de xenoinjerto tumoral de GTL16

Materiales y procedimientos

Los ratones atímicos hembra (nu/nu de Harlan) tenían 6-8 semanas de vida y un intervalo de pesos corporales de 18-22 g al comenzar el estudio. Los animales tuvieron un acceso libre a comida y agua durante el estudio. Se introdujeron los ratones en jaulas con microaisladores estáticos con lechos para animales de laboratorio bed-o-cobs@ Alpha-dri@ radiadas en un ciclo de 12 horas de luz a 21-23°C y una humedad del 40-60%. Todos los procedimientos en los que participaron animales se realizaron conforme a las directrices del NIH para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y todos los protocolos estaban autorizados por el comité interno de uso y cuidado de animales (IACUC).

Implantación del tumor

Se iniciaron xenoinjertos a partir de células tumorales GTL-16 cultivadas y mantenidas por un departamento de biología celular interno. Cada ratón de prueba recibió una inyección subcutánea de 4×10^6 células suspendidas en 100 µl de medio RPMI libre de suero. Se aleatorizaron los tumores en los grupos de tratamiento el día 5 cuando el tamaño medio de los tumores alcanzaba aproximadamente 150 mm³. Cada grupo de dosis contenía n = 5 ratones. El volumen del tumor se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = a^2 \times l$$

2

en la que a = anchura y l = longitud en mm del tumor. El peso del tumor se estimó suponiendo que 1 mg equivale a 1 mm³ de volumen tumoral.

Análisis de la inhibición del crecimiento tumoral (ICT)

La ICT se calculó a partir de la diferencia entre los volúmenes medios de los tumores de los ratones tratados con vehículo y los ratones tratados con fármacos expresada en forma de un porcentaje.

% ICT = Volumen Tumoral Medio_{control} - Volumen Tumoral Medio_{tratado-con-fármaco} x 100

Volumen Tumoral Medio_{control}

El VTM se define como el volumen tumoral medio (VTM) para el número n de animales que quedaba en el estudio ese día.

Resultados

5 Los resultados del estudio de crecimiento de los tumores de GTL 16 para el compuesto 4 se muestran en la Figura 1, Figura 2 y Figura 3.

En la Figura 1, se administró el compuesto 4 oralmente (po) A 10, 20, 30 y 100 mg/kg dos veces al día (Q12H) y a 60 mg/kg una vez al día (Q24H) durante 14 días consecutivos. El tratamiento comenzó el día 4. El último día de tratamiento la dosis de 10, 20, 30, 100 mg/kg po Q12H y de 60 mg/kg po Q24H disminuyeron el volumen tumoral medio en un 65% (p<.0001), 75% (p<.0001), 81% (p<.0001), 87% (p<.0001) y 75% (p<.0001) respectivamente en comparación con el volumen tumoral medio del grupo tratado con vehículo. Se observó que el compuesto 4 tiene la autofosforilación de MET inhibida en más del 90% en los tumores de ratones tratados a estas dosis. El último día del tratamiento, se evaluó la autofosforilación de MET en los tumores escindidos mediante transferencia Western a diversos puntos temporales (1, 2, 6, 12 horas posteriores a la dosis) y se compararon con los controles de vehículo. En los tumores de los ratones tratados con 10, 30 y 100 mg/kg po Q12H, los niveles de MET fosforilada eran menores del 10% de los controles de vehículo en todos los puntos temporales.

La Figura 2 muestra los efectos de la administración oral e intraperitoneal del compuesto 4 sobre la inhibición del crecimiento tumoral (ICT) en tumores GTL 16 en ratones atímicos. Todos los tratamientos comenzaron al cuarto día de realizar el implante de las células tumorales. Al finalizar la pauta de dosificación del día 14, se calculó el % de ICT a partir de la diferencia entre los volúmenes medios de los tumores de los ratones tratados con vehículo y los ratones tratados con fármaco expresada en forma de un porcentaje del volumen tumoral medio del grupo control tratado con vehículo.

La Figura 3 muestra los efectos de la administración oral e intraperitoneal del compuesto 4 sobre el crecimiento de los tumores GTL 16. Se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho de ratones atímicos hembra 4 x 1,0⁶ células GTL16 en un volumen de administración de 100 µl. Se dejaron crecer los tumores durante cuatro días. Los ratones recibieron dosis orales de 10, 20, 30 y 100 mg/kg dos veces al día y una dosis oral de 60 mg/kg una vez al día durante 14 días consecutivos. El día que finalizó el estudio, se extirparon los tumores intactos inmediatamente y se pesaron, sirviendo el peso en húmedo final del tumor (miligramos) como la variable principal de la eficacia.

Los resultados del estudio de crecimiento de los tumores de GTL16 para el compuesto 41 se muestran en la Figura 4, Figura 5 y Figura 6.

En la Figura 4, se administró el compuesto 41 oralmente (po) A 1, 3, 10 y 30 mg/kg dos veces al día (Q12H) durante 13 días consecutivos. El tratamiento comenzó el día 6. El último día de tratamiento las dosis de 1, 3, 10, 30 mg/kg po Q12H disminuyeron el volumen tumoral medio en un 42% (p<.0030%), 67% (p<.0001), 80% (p<.0001) y 87% (p<.0001) respectivamente en comparación con el volumen tumoral medio del grupo tratado con vehículo.

La Figura 5 muestra los efectos de la administración oral e intraperitoneal del compuesto 41 sobre la inhibición del crecimiento tumoral (ICT) en tumores GTL16 en ratones atímicos. Todos los tratamientos comenzaron al sexto día de realizar el implante de las células tumorales. Al finalizar la pauta de dosificación del día 13, se calculó el % de ICT a partir de la diferencia entre los volúmenes medios de los tumores de los ratones tratados con vehículo y los ratones tratados con fármaco expresada en forma de un porcentaje del volumen tumoral medio del grupo control tratado con vehículo.

La Figura 6 muestra los efectos de la administración oral del compuesto 41 sobre el crecimiento de los tumores GTL 16. Se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho de ratones atímicos hembra 4 x 1,0⁶ células GTL16 en un volumen de administración de 100 µl. Se dejaron crecer los tumores durante seis días. Los ratones recibieron dosis orales de 1, 3, 1,10 y 30 mg/kg dos veces al día durante 13 días consecutivos. El día que finalizó el estudio, se extirparon los tumores intactos inmediatamente y se pesaron, sirviendo el peso en húmedo final del tumor (miligramos) como la variable principal de la eficacia.

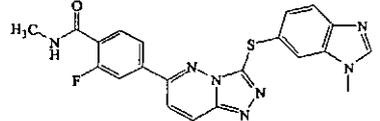
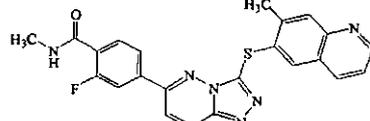
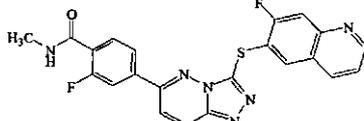
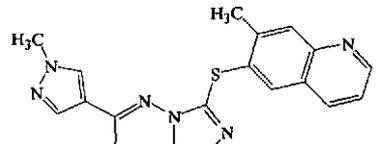
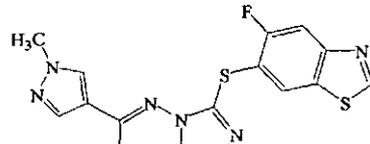
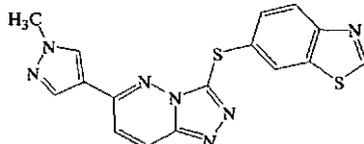
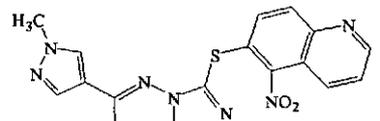
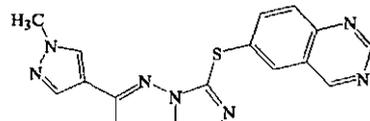
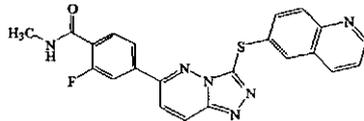
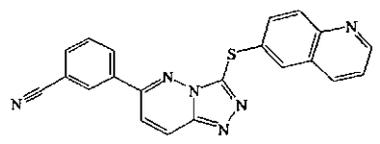
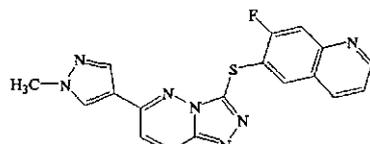
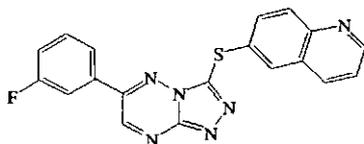
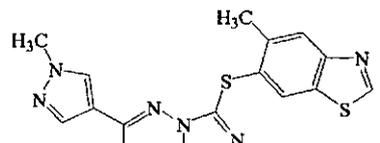
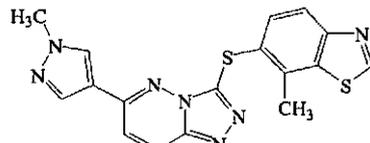
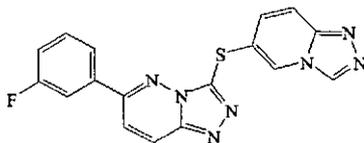
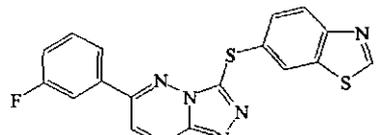
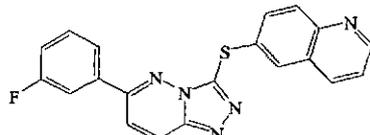
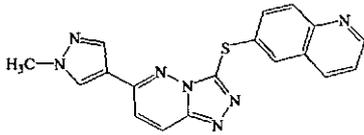
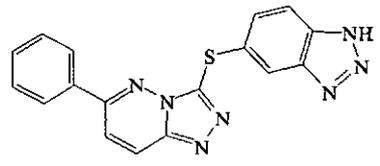
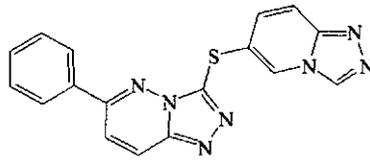
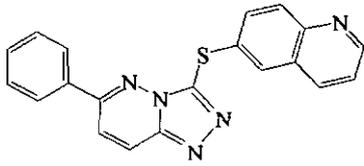
Abreviaturas

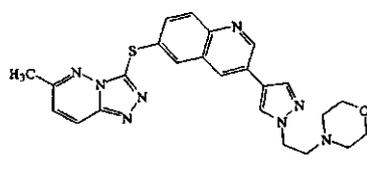
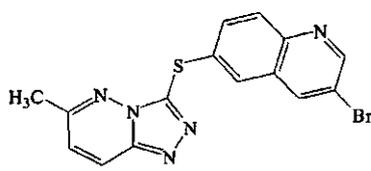
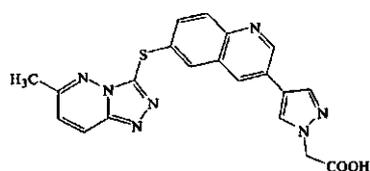
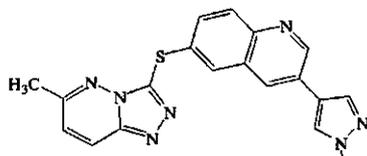
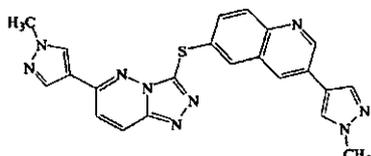
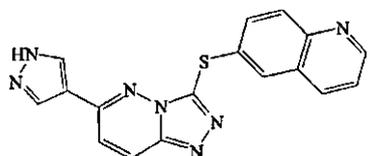
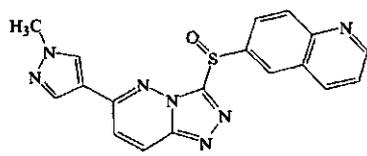
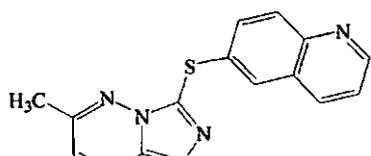
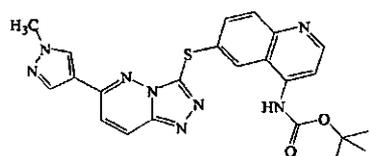
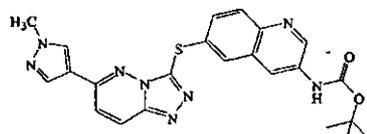
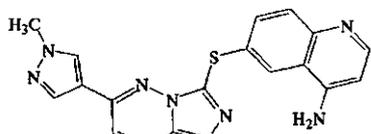
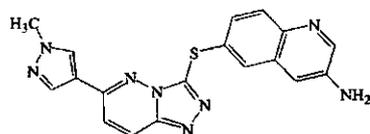
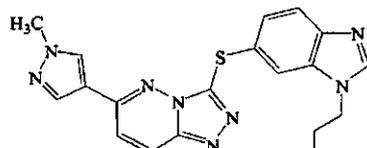
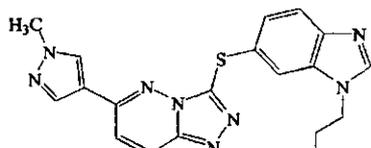
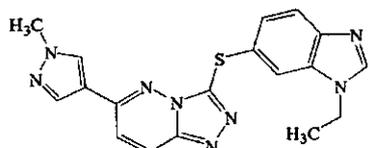
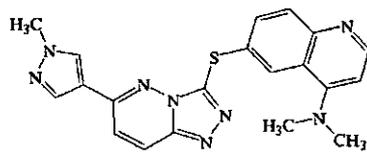
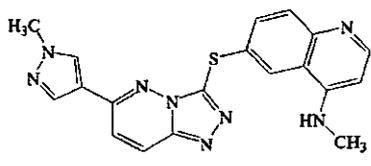
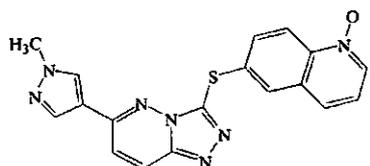
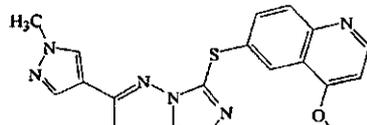
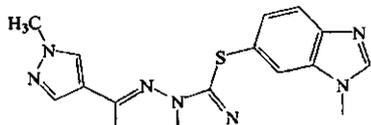
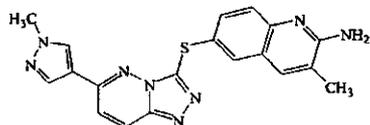
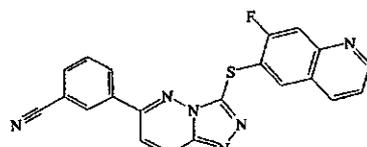
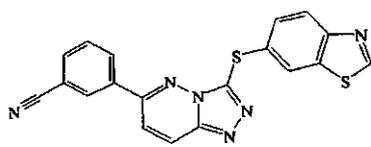
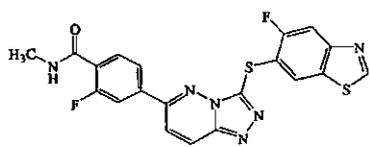
Ip	Intraperitoneal
po	Vía oral
BID	Dos veces al día
Q12H	Cada 12 horas
Q24H	Cada 24 horas

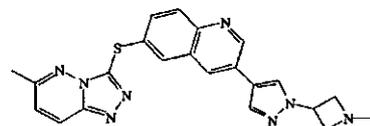
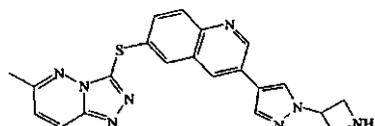
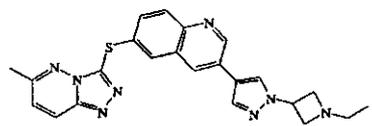
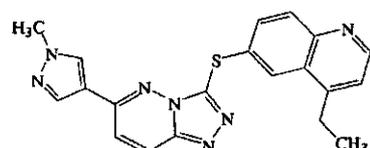
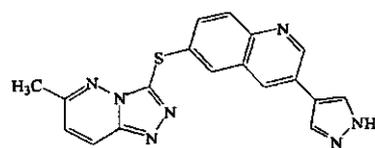
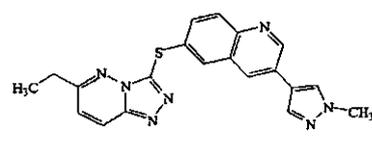
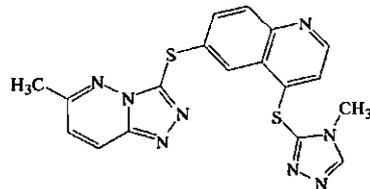
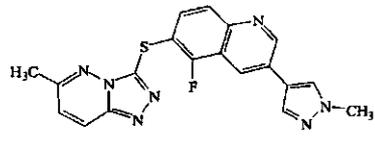
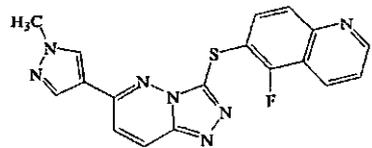
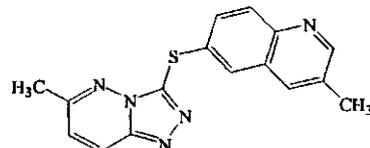
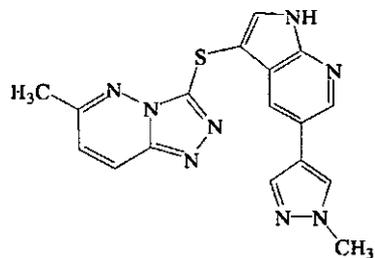
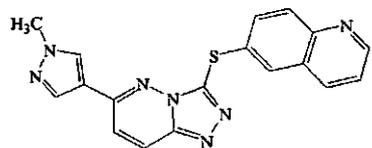
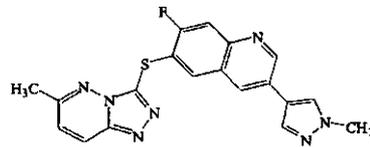
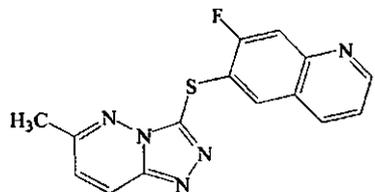
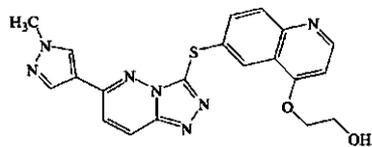
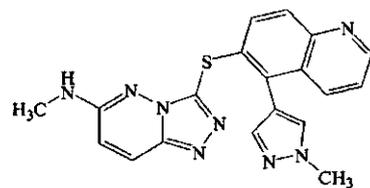
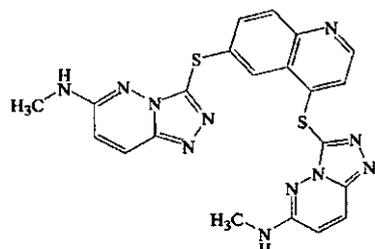
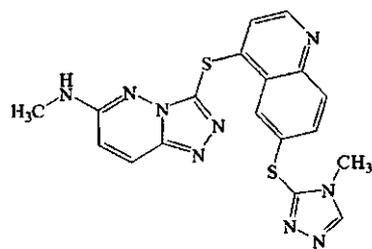
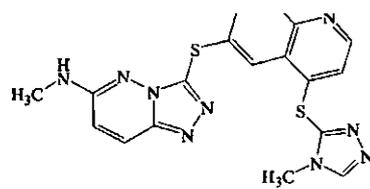
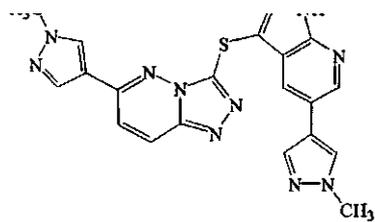
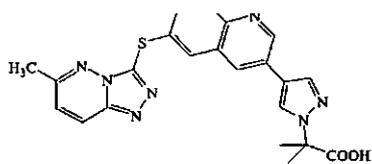
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
NIH	National Institute de Health
IACUC	Comité de uso y cuidado de animales
ICT	Inhibición del Crecimiento Tumoral
VTM	Volumen Tumoral Medio

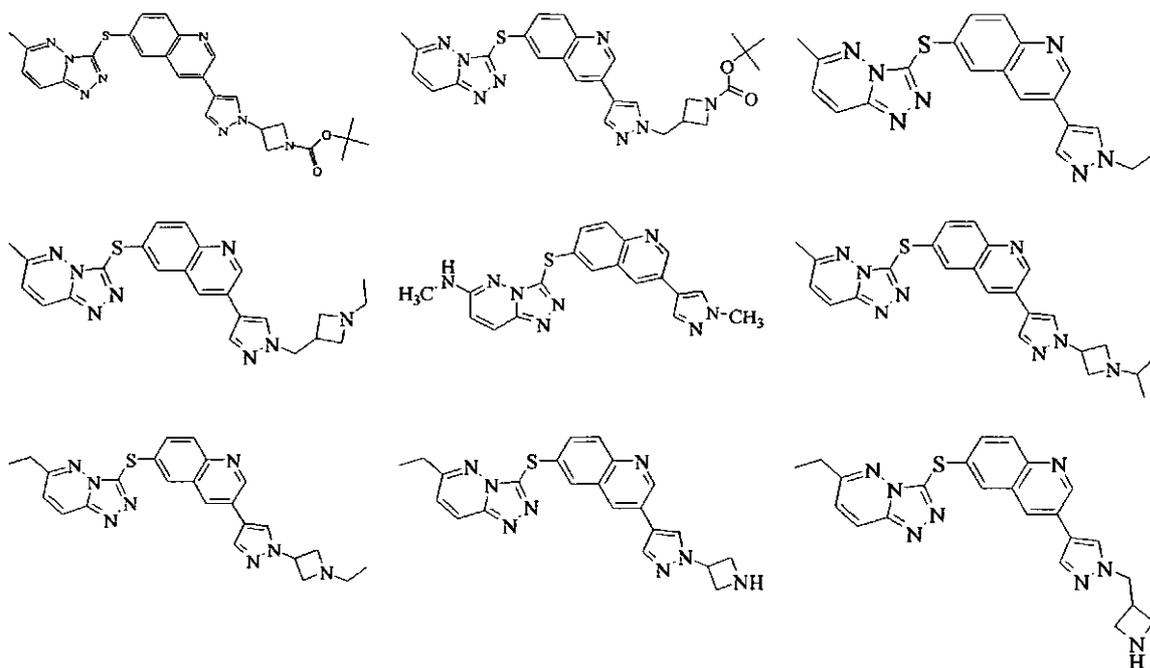
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



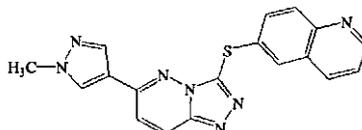




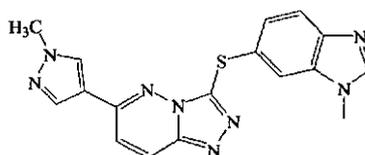


o un enantiómero, diastereómero, racemato, o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

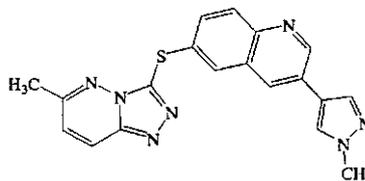
5 2. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



3. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:

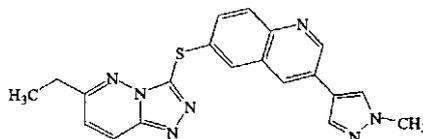


4. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



10

5. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, enantiómero, diastereómero, sal o solvato sal farmacéuticamente aceptable según las reivindicaciones 1-5 en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 7. Un compuesto, enantiómero, diastereómero, sal o solvato sal farmacéuticamente aceptable según las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento del cáncer.

8. Un compuesto, enantiómero, diastereómero, sal o solvato sal farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células escamosas, glioblastoma, cáncer pancreático, leiomiomasarcoma, mieloma múltiple, carcinoma de células renales papilares, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma o leucemia.
- 5

Figura 1

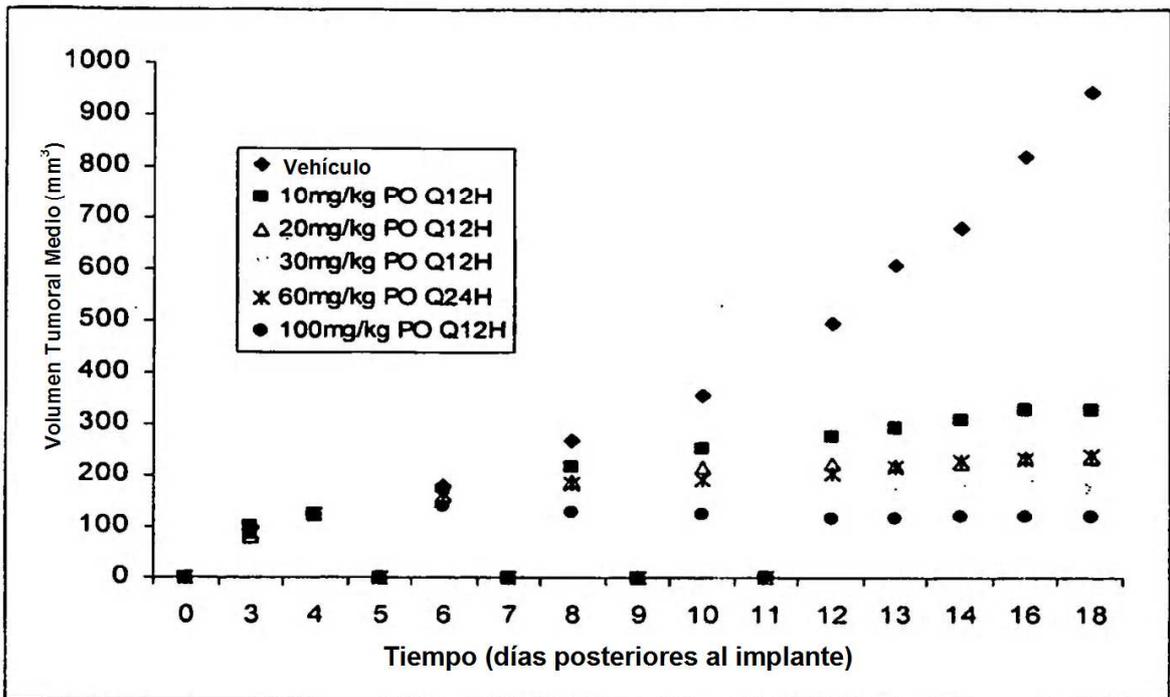


Figura 2

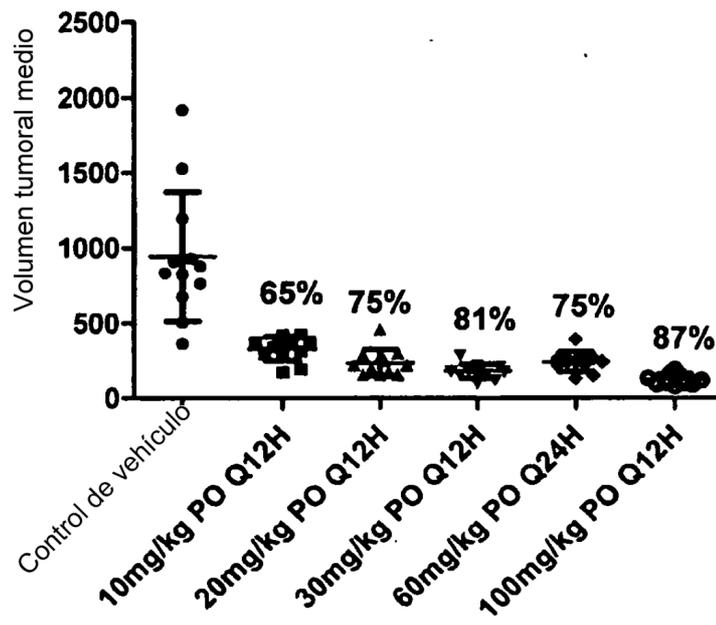


Figura 3

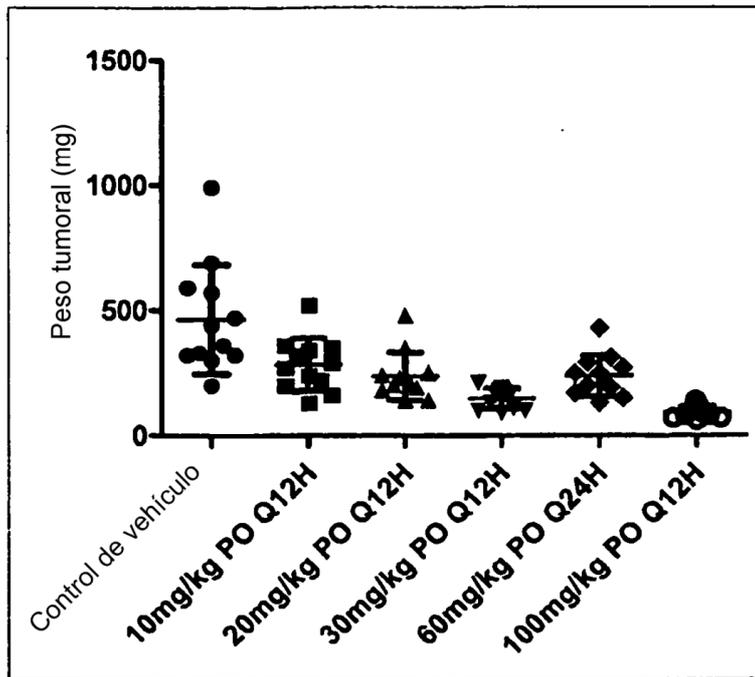


Figura 4

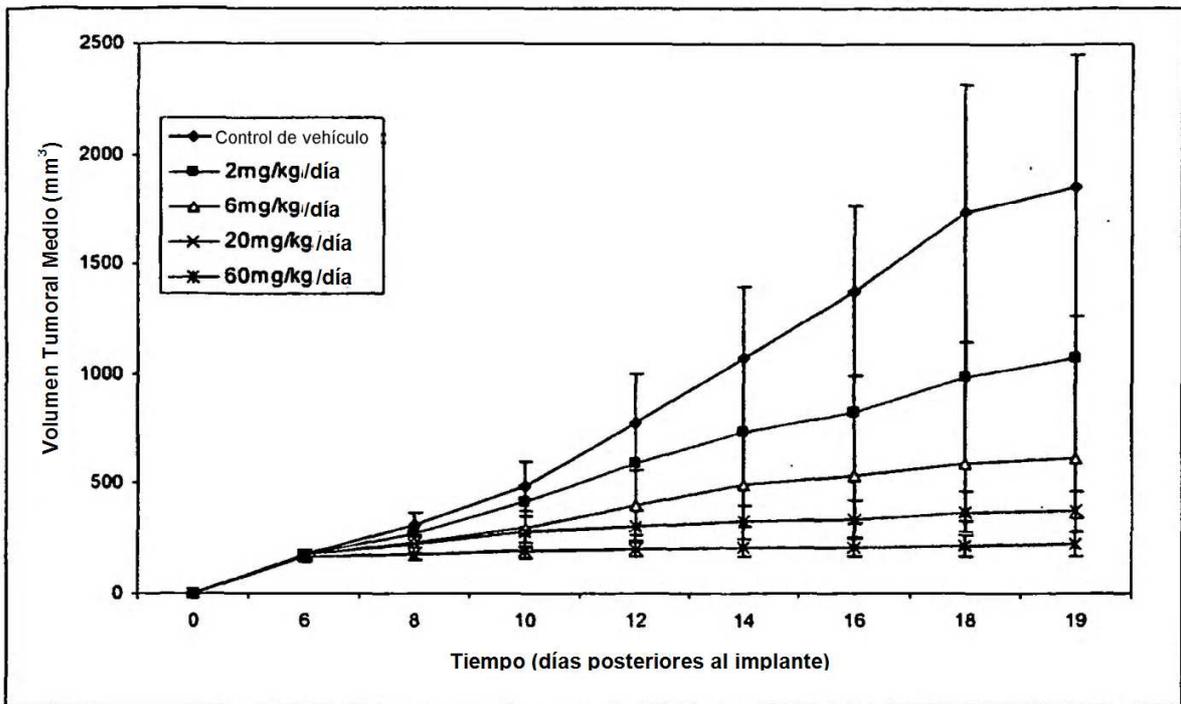


Figura 5

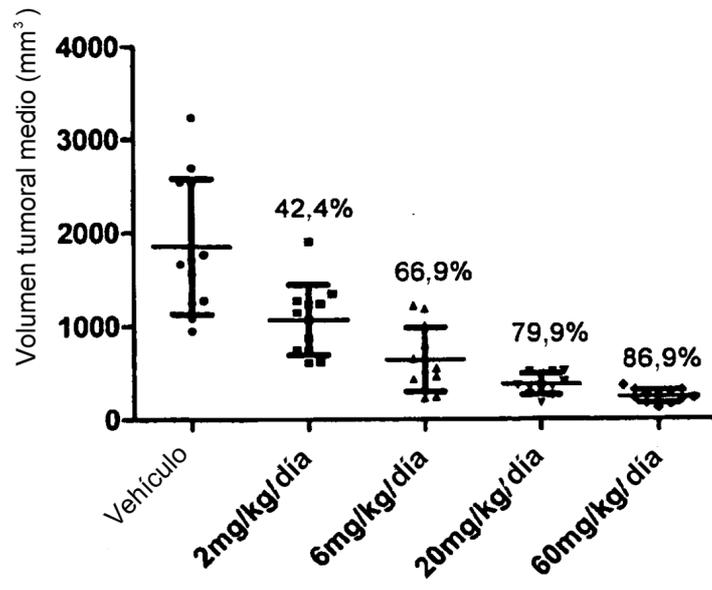


Figura 6

