(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 393 132**

(51) Int. Cl.:
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/5025 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07854193 .5**
(96) Fecha de presentación: **18.10.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2081937**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

(54) Título: **Moduladores de proteína quinasa de triazolopiridazina**

(30) Prioridad:
23.10.2006 US 862552 P
21.12.2006 US 871384 P
24.04.2007 US 913752 P
30.07.2007 US 952833 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:
SMITH, CHRISTOPHER RONALD;
BOUNAUD, PIERRE-YVES;
JEFFERSON, ELIZABETH ANNE;
LEE, PATRICK S. y
TORRES, EDUARDO

(74) Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

ES 2 393 132 T3

DESCRIPCIÓN

Moduladores de proteína quinasa de triazolopiridazina

Las proteína quinasas de mamífero son reguladores importantes de funciones celulares. Debido a que las disfunciones en la actividad de proteína quinasa han estado asociadas con varias enfermedades y trastornos, las proteína quinasas son dianas para desarrollo de fármaco. La familia de Tirosina quinasa y, particularmente el subconjunto de tirosina quinasas receptoras, está enriquecido con dianas de cáncer probadas y putativas. Las tirosina quinasas receptoras (TKR) tales como EGFR, HER2, KIT y KDR son proteínas bien caracterizadas con un papel claramente establecido en cáncer. Los fármacos que se dirigen a estas TKR, tales como Gleevac, Iressa y Tarceva, se han aprobado para el tratamiento de determinados cánceres. Otras TKR están menos bien caracterizadas pero también han estado implicadas en cáncer. Por ejemplo, datos recientes sugieren que los inhibidores de TRKC, ROS, CSF1R/FMS y ALK pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer. MET y RON son dos dianas de TKR particularmente atractivas para el desarrollo de nuevos agentes para tratar el cáncer.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión, es un factor del crecimiento multifuncional que potencia la transformación y el desarrollo de tumor induciendo mitogénesis y motilidad celular. Además, el HGF promueve la metástasis estimulando la motilidad celular y la invasión a través de diversas rutas de señalización. Con el fin de producir efectos celulares, el HGF se tiene que unir a su receptor, c-Met, una tirosina quinasa receptora. c-Met, una proteína heterodimérica expresada ampliamente que comprende una subunidad α de 50 kilodalton (kDa) y una unidad subunidad β de 145 kDa (Maggiora y col., J. Cell Physiol., 173: 183-186, 1997), está sobreexpresada en un porcentaje significativo de cánceres humanos y se encuentra amplificada durante la transición entre tumores primarios y metástasis. Los diversos cánceres en los cuales la sobreexpresión de c-Met está implicada, incluyen, pero sin limitación, gástrico, adenocarcinoma, cáncer renal, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer pancreático y cáncer mamario. c-Met también está implicada en aterosclerosis y fibrosis pulmonar.

MET se identificó en primer lugar como un rearreglo de ADN transformante (TPR-MET) en una línea de células de osteosarcoma humano que se habían tratado con N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (Cooper y col. 1984). La tirosina quinasa receptora MET (también conocida como receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, HGFR, MET o c-Met) y su ligando factor de crecimiento de hepatocitos ("HGF") tienen numerosas actividades biológicas incluyendo la estimulación de proliferación, supervivencia, diferenciación y morfogénesis, tubulogénesis de ramificación, motilidad celular y crecimiento invasivo. Patológicamente, MET ha estado implicado en el crecimiento, invasión y metástasis de muchas formas diferentes de cáncer incluyendo cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de hígado y cáncer mamario. Las mutaciones somáticas activadoras en *MET* se han encontrado en metástasis de carcinoma humano y cánceres esporádicos tales como carcinoma de células renales papilares. También existe evidencia de que la ruta de señalización de MET puede jugar un papel importante en la resistencia a terapias de cáncer. Por ejemplo, el gen *MET* se ha encontrado amplificado en pacientes con cáncer de pulmón que han recaído después de respuesta inicial a inhibidores de EGFR tales como gefitinib y erlotinib. Adicionalmente al cáncer existe evidencia de que la inhibición de MET también puede tener valor en el tratamiento de diversas indicaciones incluyendo: invasión de *Listeria*, osteólisis asociada con mieloma múltiple, infección de malaria, retinopatías diabéticas, psoriasis y artritis. Las mutaciones en la secuencia codificante de MET son relativamente poco comunes en cánceres humanos. Sin embargo, en base al precedente de la selección de mutaciones BCR-ABL en pacientes con leucemia mielógena crónica tratados con imatinib y mutaciones de EGFR en pacientes con cáncer tratados con erlotinib y gefitinib éstas y/o quizás mutaciones de *MET* adicionales que puedan conferir resistencia a fármaco se prevé que se vuelvan cada vez más frecuentes si los inhibidores de MET se usan ampliamente en cáncer. Por lo tanto, los fármacos que inhiben eficazmente algunas de estas mutaciones *MET* podrían convertirse en herramientas muy importantes en terapias de cáncer futuras.

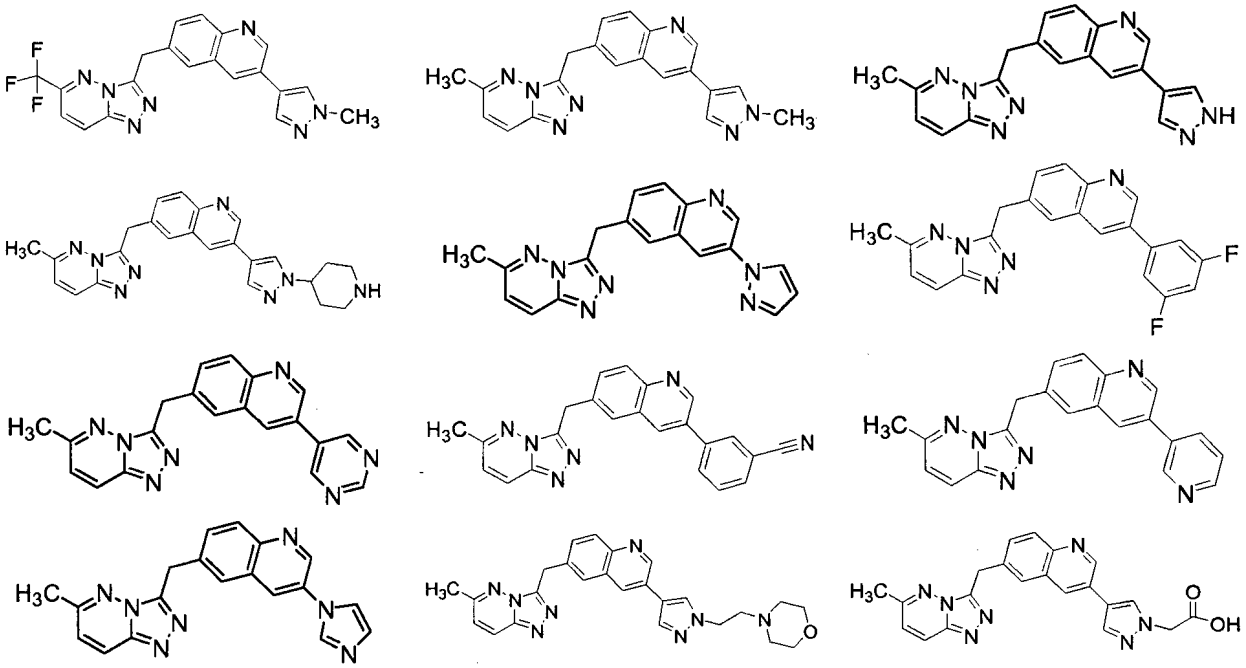
MET está relacionado de forma cercana con un grupo de cinco tirosina quinasas receptoras que no se han estudiado tan profundamente como la propia MET. Éstas incluyen Tyro3/Sky, MER, AXL, RYK y RON. La tirosina quinasa RON es el receptor de la proteína estimuladora de macrófagos y es el pariente más cercano de MET, que pertenece a la familia MET de tirosina quinasas receptoras. Al igual que MET, RON está implicada en el crecimiento, invasión y metástasis de varias formas diferentes de cáncer incluyendo cáncer colorrectal y cáncer de vejiga. También existe evidencia de que AXL y MER desregulados pueden jugar papeles importantes en el cáncer. MER tiene muchas propiedades consistentes con la actividad como un oncogén. Ratones transgénicos que expresan MER en el linaje hematopoyético desarrollan síntomas similares a leucemia/linfoma linfoblástico de células T y se expresa en la mayoría de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células T (TALL). Los estudios en modelos de ratón sugirieron que AXL es importante para el crecimiento de cáncer mamario donde parece que AXL regula los procedimientos tanto angiogénicos como tumorigénicos. Estudios adicionales con líneas de células de cáncer humano sugieren que AXL está implicada en metástasis de NSCLC y resistencia a fármaco. Aunque se conoce muy poco acerca de los papeles normal y patológico de Tyro3/Sky esta tirosina quinasa receptora comparte determinadas propiedades y funciona con sus parientes mejores estudiados y también puede demostrar eventualmente que tiene un papel importante en el cáncer. RYK también se expresa en determinados cánceres pero es una tirosina quinasa receptora huérfana atípica que carece de actividad quinasa detectable y por tanto su tratabilidad como una diana para agentes terapéuticos de cáncer de molécula pequeña es actualmente incierta.

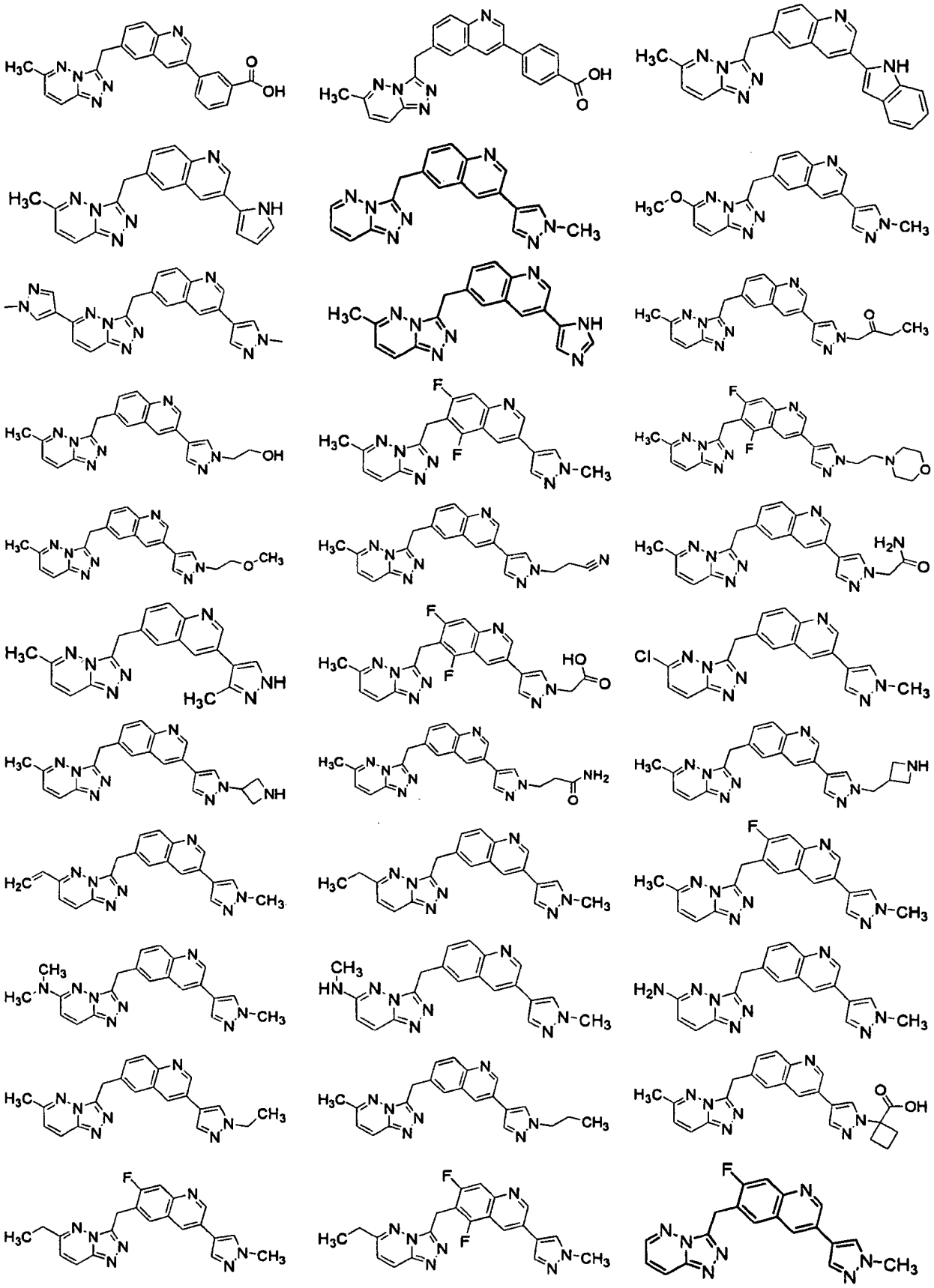
Debido a que las quinasas han estado implicadas en numerosas afecciones y enfermedades, tales como cáncer, existe una necesidad de desarrollar inhibidores de proteína quinasa nuevos y potentes que se puedan usar para el tratamiento. La presente invención satisface éstas y otras necesidades en la técnica. Aunque en el presente documento se nombran de forma específica determinadas proteína quinasas, la presente invención no está limitada a inhibidores de estas quinasas e incluye, dentro su alcance, inhibidores de proteína quinasas relacionadas e inhibidores de proteínas homólogas.

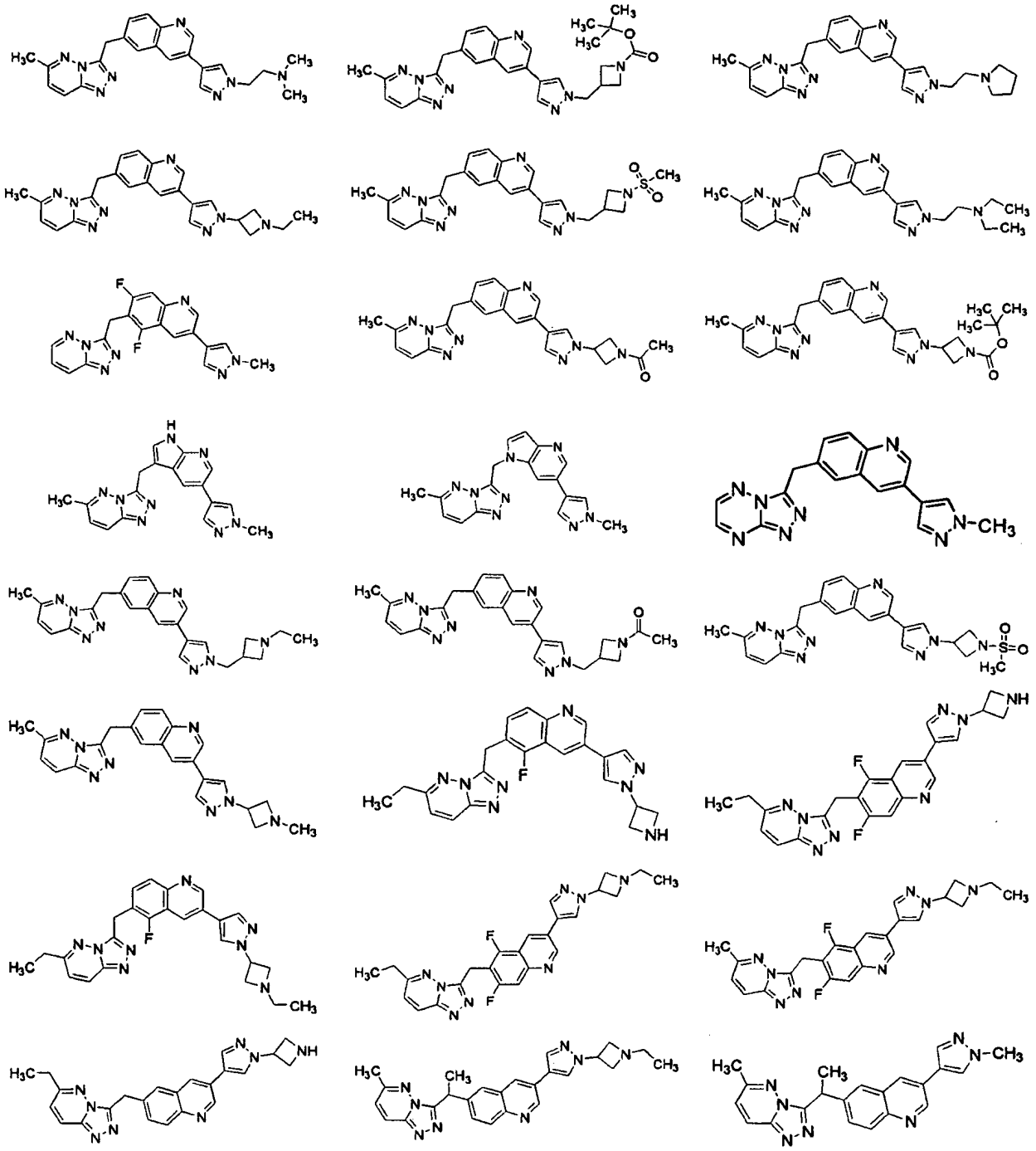
Se ha descubierto que los compuestos de triazalopiridazina de la presente divulgación se pueden usar para modular la actividad de quinasa y para tratar enfermedades mediadas por la actividad de quinasa. En particular, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para modular y/o inhibir tirosina quinasas, incluyendo MET. Además, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para reducir o inhibir actividad de quinasa de MET en una célula o sujeto y para modular expresión de MET en una célula o sujeto. Los compuestos divulgados también son útiles para prevenir o tratar en un sujeto un trastorno proliferativo celular y/o trastornos relacionados con MET. Los moduladores de quinasa de triazalopiridazina divulgados se describen con detalle más adelante. Adicionalmente, las actividades inhibidoras de compuestos seleccionados se divulgan en el presente documento.

El documento WO 02/083675 y el documento WO 02/083139 se refieren a restos de triazolo[4, 3-b]piridazina que se ha informado que inhiben la actividad de Akt, una serina/treonina proteína quinasa.

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos que tienen la fórmula:







En otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer y composiciones farmacéuticas que usan un compuesto de la presente invención.

La Figura 4 ilustra los efectos de fosforilación de MET administrando el compuesto 124 como una dosis aguda por vía oral (PO).

La Figura 6 ilustra los efectos sobre el volumen de tumor medio mediante la administración del compuesto 124 por vía oral (PO) dos veces al día (Q12H) durante 14,5 días consecutivos.

La Figura 7 ilustra los efectos sobre la inhibición del crecimiento de tumor (TGI) en tumores GTL16 en ratones desnudos mediante la del compuesto administración 124 por vía oral.

Los compuestos de la presente divulgación pueden existir como sales. La presente divulgación incluye tales sales. Los ejemplos de formas de sal 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 ácido glutámico. Estas

sales se pueden preparar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. También se incluyen sales de adición de base tales como sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien sea en solitario o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido aceptables incluyen aquellas obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogéno-fosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso y similares, así como también las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanolsulfónico y similares. También incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y similares y sales de ácidos orgánicos tales como ácidos glucurónico o galacturónico y similares. Determinados compuestos específicos de la presente divulgación contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

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

Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir en formas no solvatadas así como también en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a formas no solvatadas y están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir en formas cristalinas o amorfas múltiples. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente divulgación y tienen por objeto estar dentro del alcance de la presente divulgación.

Determinados compuestos de la presente divulgación poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; las formas de enantiómeros, racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos, estereoisométricas que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)- o, (D)- o (L)- para aminoácidos y los isómeros individuales están incluidos dentro del alcance de la presente divulgación. Los compuestos de la presente divulgación no incluyen aquellos que se conoce en la técnica que son demasiado inestables para sintetizarse y/o aislar. La presente divulgación tiene por objeto 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 resolverse usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica y a menos que especifique de otra manera, se tiene por objeto que los compuestos incluyan isómeros geométricos tanto E como Z.

El término “tautómero”, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y que se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra.

Será evidente para un experto en la materia que determinados compuestos de la presente divulgación puedan existir en formas tautoméricas, estando todas esas formas tautoméricas de los compuestos dentro del alcance de la presente divulgación.

A menos que se indique de otra manera, las estructuras representadas en el presente documento también tienen por objeto 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 únicos así como también las mezclas enantioméricas y diastereoméricas de los presentes compuestos están dentro del alcance de la divulgación.

La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” tiene por objeto incluir sales de compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los restos sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien sea en solitario o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien sea en solitario o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogéno-fosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso y similares, así como también las sales obtenidas a partir 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, metanolsulfónico y similares. También se incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y similares y sales de ácidos orgánicos tales como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge y

col., “Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos de la presente divulgación contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

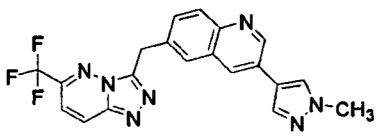
Además de las formas de sal, la presente divulgación se refiere a compuestos que están en una forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en el presente documentos son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente divulgación. Adicionalmente, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente divulgación mediante procedimientos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente divulgación cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o agente químico adecuado.

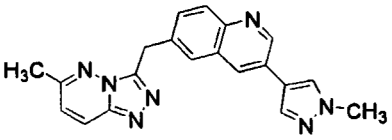
Los términos “tratar” o “tratamiento” con referencia a una enfermedad particular incluyen la prevención de la enfermedad.

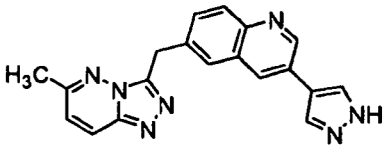
El símbolo $\sim\sim\sim$ indica el punto de unión de un resto a la parte restante de la molécula.

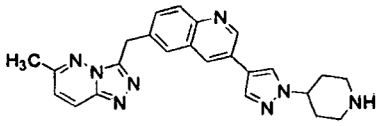
Moduladores Proteína Quinasa de Triazalopiridazina

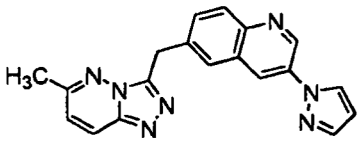
En un aspecto, la divulgación se refiere a compuestos que tienen una fórmula:

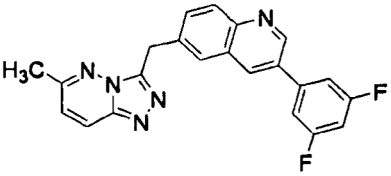


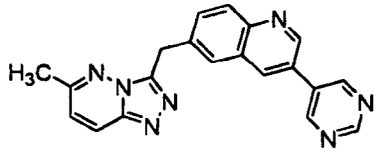


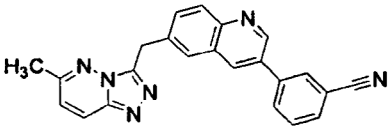


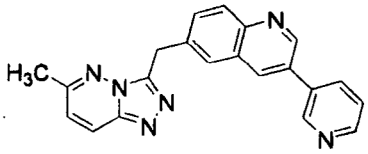


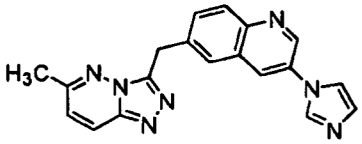


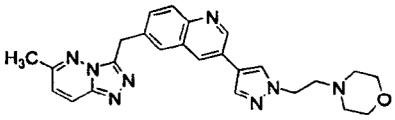


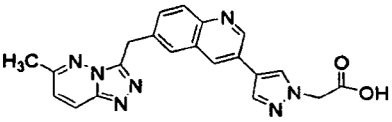


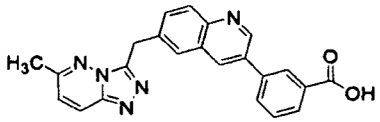


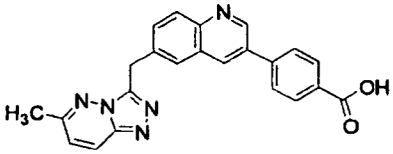


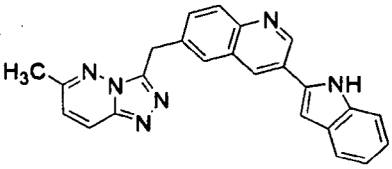


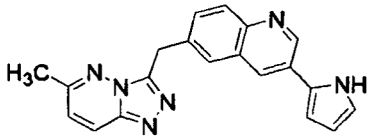


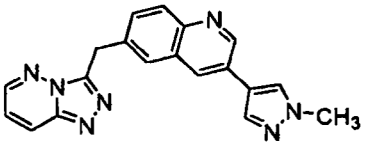


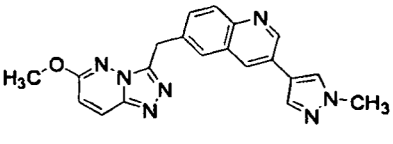


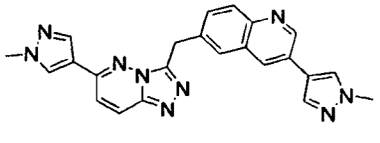


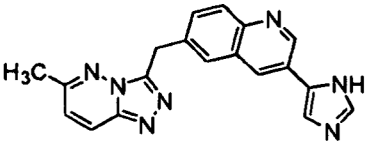


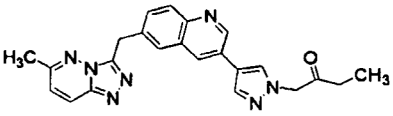


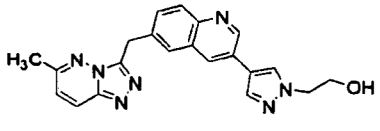


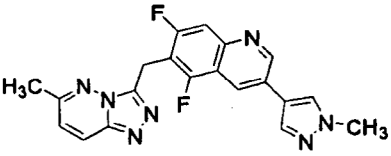


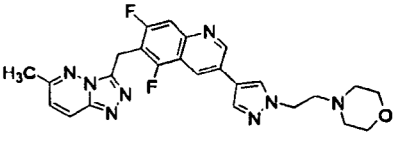


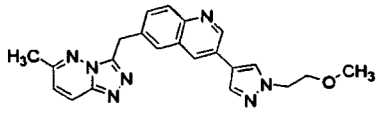


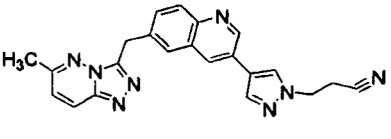


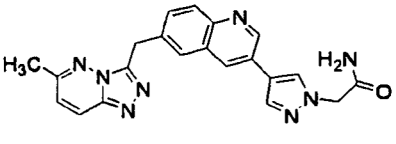


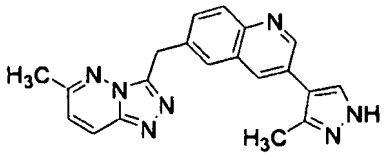
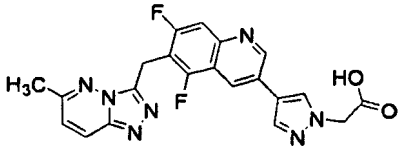
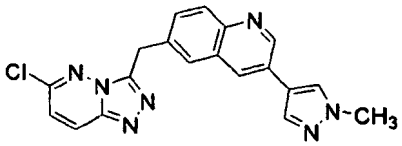
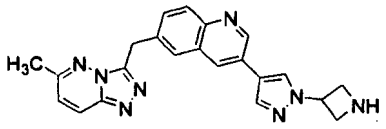
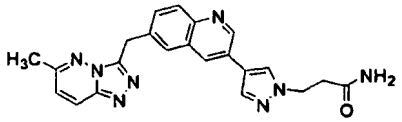
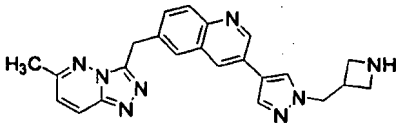
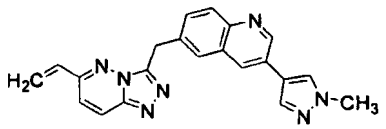
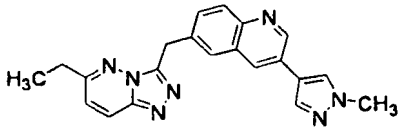
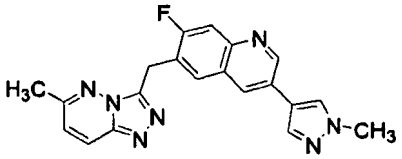
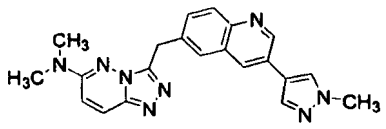
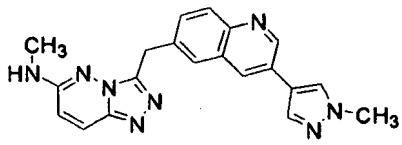
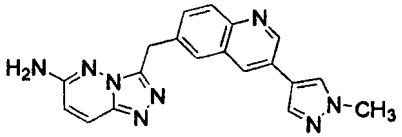
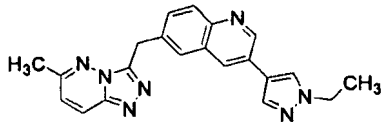
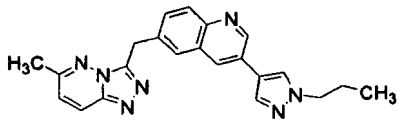
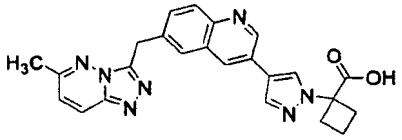
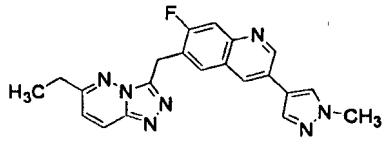
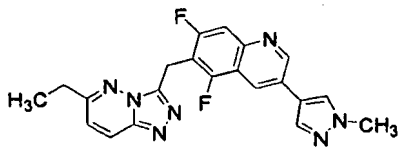
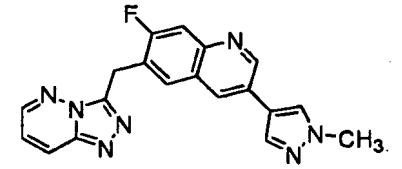
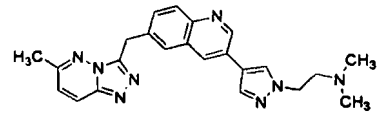
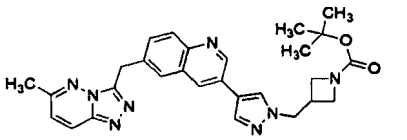
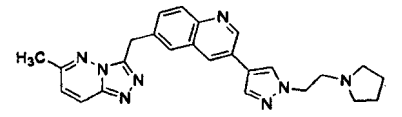
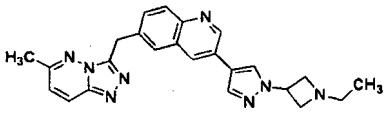
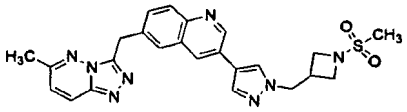
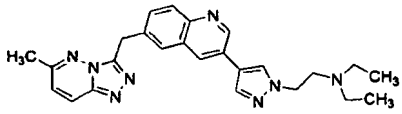
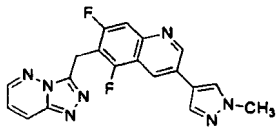
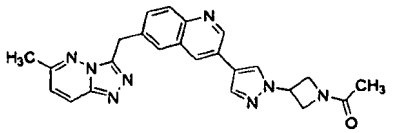
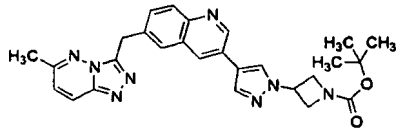
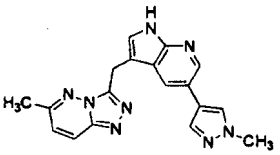
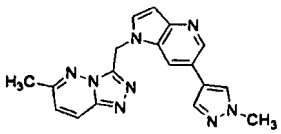
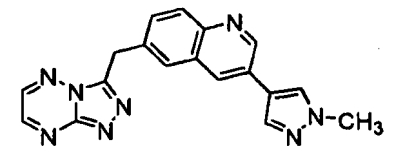
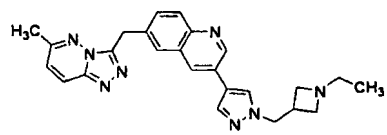
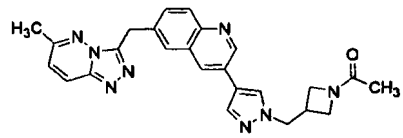
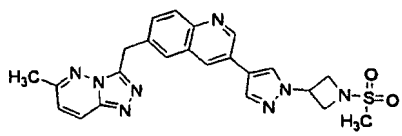


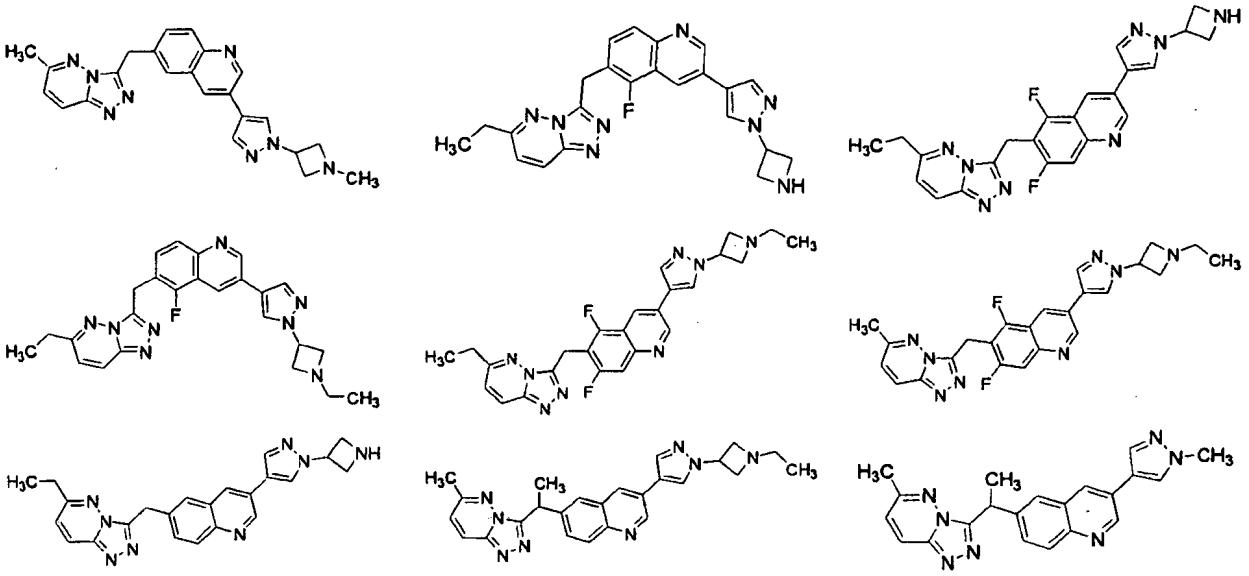










En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano, en el que el cáncer es cáncer mamario, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células escamosas, glioblastoma, cáncer pancreático, leiomiosarcoma, mieloma múltiple, carcinoma de células renales papilares, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma o leucemia (por ejemplo, cáncer mieloide, mieloide crónico, linfoblástico agudo, linfoblástico crónico, de Hogdkin y otras leucemias y cánceres hematológicos).

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

Síntesis ejemplares

Los compuestos de la divulgación se sintetizan mediante una combinación apropiada de procedimientos sintéticos bien conocidos de forma general. Las técnicas útiles para sintetizar los compuestos de la divulgación son tanto fácilmente aparentes como accesibles a los expertos en la materia pertinente. La descripción más adelante se ofrece para ilustrar determinados de los diversos procedimientos disponibles para su uso en el ensamblaje de los compuestos de la divulgación. Sin embargo, la descripción no tiene por objeto definir el alcance de reacciones o secuencias de reacción que son útiles para preparar los compuestos de la presente divulgación. Los compuestos de la presente divulgación se pueden preparar mediante procedimientos y técnicas divulgados en la sección de Ejemplos más adelante, así como también mediante técnicas de síntesis orgánica conocidas.

Grupos Protectores

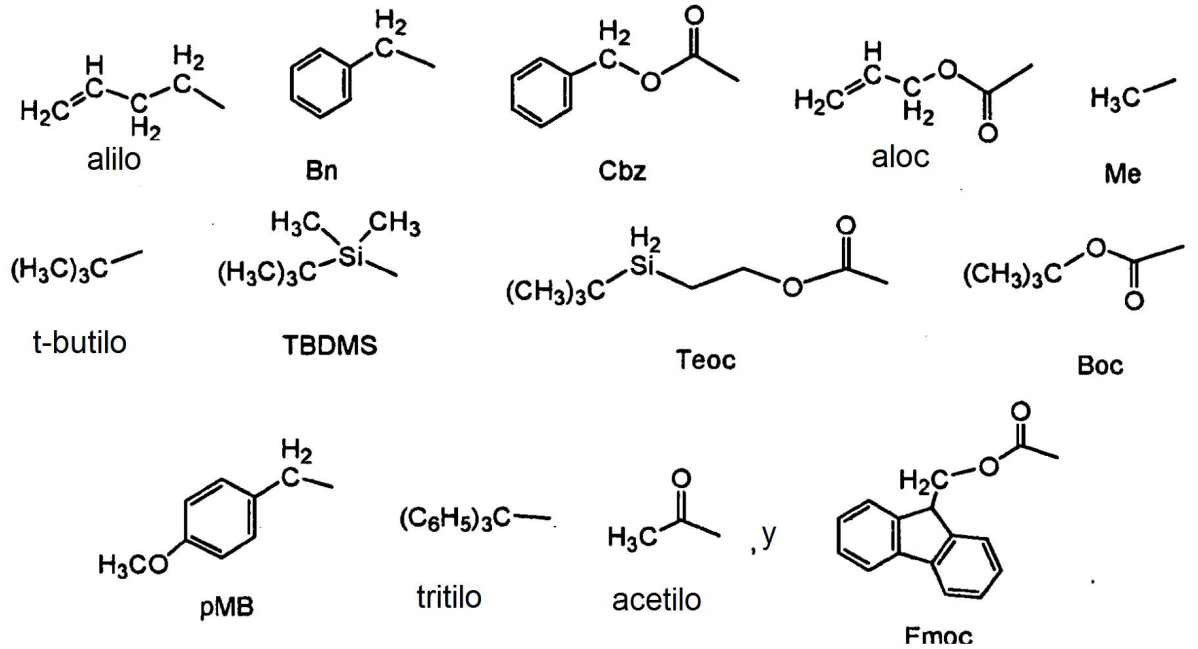
Los compuestos de la presente divulgación se pueden sintetizar usando uno o más grupos protectores conocidos de forma general en la técnica de síntesis química. El término “grupo protector” se refiere a restos químicos que bloquean algunos o todos los restos reactivos de un compuesto y previenen que tales restos participen en reacciones químicas hasta que el grupo protector se retira, por ejemplo, aquellos restos enumerados y descritos en Greene y col., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª ed. John Wiley & Sons (1999). Puede ser provechoso, cuando se emplean diferentes grupos protectores, que cada grupo protector (diferente) se pueda retirar mediante un medio diferente. Los grupos protectores que se escinden en condiciones de reacción completamente dispares permiten la eliminación diferencial de tales grupos protectores. Por ejemplo, los grupos protectores se pueden retirar mediante ácido, base e hidrogenólisis. Los grupos tales como tritilo, dimetoxitritilo, acetal y t-butildimetilsililo son lábiles a ácido y se pueden usar para proteger restos reactivos carboxi e hidroxi en presencia de grupos amino protegidos con grupos Cbz, que se pueden eliminar mediante hidrogenólisis y grupos Fmoc, que son lábiles a base. Los restos reactivos de ácido carboxílico e hidroxi se pueden bloquear con grupos lábiles a base tales como, sin limitación, metilo, etilo y acetilo en presencia de aminas bloqueadas con grupos lábiles a ácido tales como t-butil carbamato o con carbamatos que son estables tanto a ácido como a base pero hidrolíticamente eliminables.

Los restos reactivos de ácido carboxílico e hidroxi también se pueden bloquear con grupos protectores hidrolíticamente eliminables tales como el grupo bencilo, mientras que los grupos amina capaces de formar puentes de hidrógeno con ácidos se pueden bloquear con grupos lábiles a base tales como Fmoc. Los restos reactivos de

ácido carboxílico se pueden bloquear con grupos protectores eliminables oxidativamente tales como 2,4-dimetoxibencilo, mientras que los grupos amino co-existentes se pueden bloquear con silil carbamatos lábiles a fluoruro.

Los grupos bloqueantes 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 catálisis metálica o pi-ácida. Por ejemplo, un ácido carboxílico bloqueado con alilo se puede desproteger con una reacción catalizada por paladio(0) en presencia de grupos protectores de t-butil carbamato lábil a ácido o amina acetato lábil a base. Aún otra forma de grupo protector es una resina a la cual se puede unir un compuesto o intermedio. Siempre y cuando el resto se una a la resina, ese grupo funcional se bloquea y no puede reaccionar. Una vez liberado de la resina, el grupo funcional está disponible para reaccionar.

Los grupos bloqueantes o protectores típicos incluyen, por ejemplo:



Procedimientos de Tratamiento

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a compuestos para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por actividad de quinasa (enfermedad o trastorno mediado por quinasa) en un organismo (por ejemplo, mamíferos, tales como seres humanos). Enfermedades “mediadas por quinasa” o “asociadas a quinasa” significan enfermedades en las cuales la enfermedad o síntoma se puede aliviar inhibiendo la actividad de quinasa (por ejemplo, donde la quinasa está implicada en procedimientos de señalización, mediación, modulación o regulación de la enfermedad). “Enfermedades” significa enfermedades o síntomas de enfermedad.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con quinasa incluyen cáncer (por ejemplo, leucemia, tumores y metástasis), alergia, asma, inflamación (por ejemplo enfermedad de vías respiratorias inflamatorias), enfermedad obstructiva de vías respiratorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades metabólicas, infección (por ejemplo, bacteriana, viral, por levadura, fúngica), enfermedades de SNC, tumores cerebrales, enfermedades neuronales degenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades asociadas con angiogénesis, neovascularización y vasculogénesis. En una realización ilustrativa, los compuestos son útiles para tratar cáncer, incluyendo leucemia y otras enfermedades o trastornos que implican proliferación celular anormal, trastornos mieloproliferativos, trastornos hematológicos, asma, enfermedades inflamatorias u obesidad.

Los ejemplos más específicos de cánceres tratados con los compuestos de la presente divulgación incluyen cáncer mamario, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer renal, cáncer de células escamosas, glioblastoma, cáncer pancreático, leiomiosarcoma, mieloma múltiple, carcinoma de células renales papilares, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma y leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide, mieloide crónica, linfoblástica aguda, linfoblástica crónica, de Hogdkin y otras leucemias y cánceres hematológicos).

Otros ejemplos específicos de enfermedades o trastornos para los cuales el tratamiento por los compuestos o composiciones de la divulgación son útiles para el tratamiento o prevención incluyen, pero sin limitación rechazo del trasplante (por ejemplo, aloinjertos o xenoinjertos de riñón, hígado, corazón, pulmón, células de islote, páncreas, médula ósea, córnea, intestino delgado, piel y otros trasplantes), enfermedad de injerto frente a huésped,

osteoartritis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, retinopatía diabética, enfermedad de intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y otras enfermedades intestinales), enfermedad renal, caquexia, choque séptico, lupus, miastenia grave, psoriasis, dermatitis, eczema, seborrea, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, protección de células madre durante quimioterapia, selección *ex vivo* o purga *ex vivo* para trasplante de médula ósea autólogo o alogénico, enfermedad ocular, retinopatías (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética y otras retinopatías) enfermedad corneal, glaucoma, infecciones (por ejemplo, bacteriana, viral o fúngica), enfermedad cardíaca, incluyendo, pero sin limitación, reestenosis.

Terapia de combinación

En otro aspecto, la divulgación proporciona una terapia de combinación para tratar o inhibir la aparición de un trastorno proliferativo celular o un trastorno relacionado con c-Met en un sujeto. La terapia de combinación comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I y una o más terapias de antiproliferación celular diferentes incluyendo quimioterapia, terapia de radiación, terapia génica e inmunoterapia.

En otro aspecto, los compuestos de la divulgación se pueden administrar en combinación con quimioterapia. Como se usa en el presente documento, quimioterapia se refiere a una terapia que implica un agente quimioterapéutico. Se pueden usar una diversidad de agentes quimioterapéuticos en los procedimientos de tratamiento combinado divulgados en el presente documento. Los agentes quimioterapéuticos contemplados como ilustrativos, incluyen, pero sin limitación: compuestos de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino); compuestos de taxano (por ejemplo, paclitaxcel, docetaxol); compuestos de campototecina (irinotecán, topotecán); alcaloides de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina); derivados de nucleósido antitumoral (por ejemplo, 5-fluorouracilo, leucovorina, gemcitabina, capecitabina) agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, lomustina, tiotepa); epipodofilotoxinas/podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, tenipósido); inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, exemestano); compuestos anti-estrógeno (por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant), antifolatos (por ejemplo, disodio premetrexado); agentes hipometilantes (por ejemplo, azacitidina); agentes biológicos (por ejemplo, gemtuzamab, cetuximab, rituximab, pertuzumab, trastuzumab, bevacizumab, erlotinib); antibióticos/antracilinas (por ejemplo, idarrubicina, actinomicina D, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina C, dactinomicina, carminomicina, daunomicina); antimetabolitos (por ejemplo, clofarabina, aminopterina, citosina arabinósido, metotrexato); agentes de unión a tubulina (por ejemplo, combretastatina, colchicina, nocodazol); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina); agentes de diferenciación (por ejemplo, retinoides, vitamina D y ácido retinoico); agentes bloqueantes de metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) (por ejemplo, acutano); inhibidores de quinasa (por ejemplo, flavoperidol, mesilato de imatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, lapatinib, sorafinib, temsirolimus, dasatinib); inhibidores de farnesiltransferasa (por ejemplo, tipifamib); inhibidores de histona desacetilasa; inhibidores de la ruta de ubiquitina-proteasoma (por ejemplo, bortezomib, Yondelis).

Los agentes útiles adicionales incluyen verapamil, un antagonista de calcio que se ha encontrado que es útil en combinación con agentes antineoplásicos para establecer quimiosensibilidad en células tumorales resistentes a agentes quimioterapéuticos aceptados y para potenciar la eficacia de tales compuestos en malignidades sensibles a fármaco. Véase Simpson W G, The calcium channel blocker verapamil and cancer chemotherapy. Cell Calcium. Diciembre de 1985; 6(6): 449-67. Adicionalmente, agentes quimioterapéuticos que están por surgir se consideran útiles en combinación con el compuesto de la presente divulgación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona compuestos que se pueden administrar en combinación con terapia de radiación. Como se usa en el presente documento “terapia de radiación” se refiere a una terapia que comprende exponer al sujeto que lo necesita a radiación. Tal terapia se conoce por los expertos en la materia. El esquema apropiado de terapia de radiación será similar a los que ya se han empleado en terapias clínicas en las que la terapia de radiación se usa en solitario o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona compuestos que se pueden administrar en combinación con una terapia génica. Como se usa en el presente documento, “terapia génica” se refiere a una terapia que se dirige a genes particulares implicados en desarrollo tumoral. Las estrategias de terapia génica posibles incluyen la restauración de genes inhibidores del cáncer defectuoso, la transducción o transcripción celular con ADN antisentido correspondiente a genes que codifican factores del crecimiento y sus receptores, estrategias basadas en ARN tales como ribozimas, señuelos de ARN, ARN mensajero antisentido y moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip) y los genes denominados suicidas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto que se puede administrar en combinación con una inmunoterapia. Como se usa en el presente documento, “inmunoterapia” se refiere a una terapia que se dirige a proteína particular implicada en el desarrollo tumoral a través de anticuerpos específicos frente a tal proteína. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales frente a factores del crecimiento endotelial vascular se han usado en el tratamiento contra el cáncer.

Cuando se usa un segundo agente farmacéutico adicionalmente a un compuesto de la divulgación, los dos agentes farmacéuticos se pueden administrar simultáneamente (por ejemplo en composiciones separadas o unitarias)

secuencialmente en cualquier orden, a aproximadamente el mismo tiempo o en programas de dosificación separados. En el último caso, los dos compuestos se administrarán dentro de un periodo y en una cantidad y manera que sea suficiente para asegurar que se consiga un efecto provechoso o sinérgico. Se apreciará que el procedimiento preferido y el orden de administración de las cantidades de dosificación respectivas y los regímenes para cada componente de la combinación dependerán del agente quimioterapéutico particular que se esté administrando en conjunto con el compuesto de la presente invención, su vía de administración, el tumor particular que se esté tratando y el huésped particular que se esté tratando.

Como se comprenderá por los expertos en la materia, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos serán generalmente similares o menores que aquellas ya empleadas en terapias clínicas en las que los agentes quimioterapéuticos se administran en solitario o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

El procedimiento óptimo y el orden de administración de las cantidades y régimen de dosificación se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia usando procedimientos convencionales y en vista de la información expuesta en el presente documento.

A modo de ejemplo únicamente, los compuestos de platino se administran provechosamente en una dosis de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo 50 a 400 mg/m^2, particularmente para cisplatino en una dosis de aproximadamente 75 mg/m^2 y para carboplatino en aproximadamente 300 mg/m^2 por ciclo de tratamiento. El cisplatino no se absorbe por vía oral y por lo tanto se tiene que administrar a través de inyección por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intratumoral o por vía intraperitoneal.

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

A modo de ejemplo únicamente, los compuestos de camptotecina se administran provechosamente en una dosis de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo 1 a 300 mg/m^2, particularmente para irinotecán en una dosis de aproximadamente 100 a 350 mg/m^2 y para topotecán en aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

A modo de ejemplo únicamente, los alcaloides de vinca se pueden administrar provechosamente en una dosis de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, particularmente para vinblastina en una dosis de aproximadamente 3 a 12 mg/m^2, para vincristina en una dosis de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 y para vinorelbina en una dosis de aproximadamente 10 a 30 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

A modo de ejemplo únicamente, los derivados de nucleósido antitumor se pueden administrar provechosamente en una dosis de 200 a 2500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo 700 a 1500 mg/m^2. 5-fluorouracilo (5-FU) se usa comúnmente a través de administración intravenosa con dosis que varían desde 200 hasta 500 mg/m^2 (preferentemente desde 3 hasta 15 mg/kg/día). Gemcitabina se administra provechosamente en una dosis de aproximadamente 800 a 1200 mg/m^2 y capecitabina se administra provechosamente en aproximadamente 1000 a 2500 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

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

A modo de ejemplo únicamente, los derivados de podofilotoxina se pueden administrar provechosamente en una dosis de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo 50 a 250 mg/m^2, particularmente para etopósido en una dosis de aproximadamente 35 a 100 mg/m^2 y para tenipósido en aproximadamente 50 a 250 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

A modo de ejemplo únicamente, los derivados de antraciclina se pueden administrar provechosamente en una dosis de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo 15 a 60 mg/m^2, particularmente para doxorrubicina en una dosis de aproximadamente 40 a 75 mg/m^2, para daunorrubicina en una dosis de aproximadamente 25 a 45 mg/m^2 y para idarrubicina en una dosis de aproximadamente 10 a 15 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

A modo de ejemplo únicamente, los compuestos anti-estrógeno se pueden administrar provechosamente en una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg diariamente dependiendo del agente particular y la afección que se esté tratando. Tamoxifeno se administra provechosamente por vía oral en una dosis de 5 a 50 mg, preferentemente 10 a 20 mg dos veces al día, continuando la terapia durante tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. Toremifeno se administra provechosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día, continuando la terapia durante tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. Anastrozol se administra provechosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 1 mg una vez al día.

Droloxifeno se administra provechosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 20 a 100 mg una vez al día. Raloxifeno se administra provechosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día. Exemestano se administra provechosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 25 mg una vez al día.

A modo de ejemplo únicamente, las sustancias biológicas se pueden administrar provechosamente en una dosis de aproximadamente 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal o como se conoce en la técnica, si fuera diferente. Por ejemplo, trastuzumab se administra provechosamente en una dosis de 1 a 5 mg/m^2, particularmente 2 a 4 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

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

Los compuestos de la presente divulgación se pueden administrar a un sujeto por vía sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica o por vía parenteral. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar también a un sujeto por vía local. Los ejemplos no limitantes de sistemas de administración local incluyen el uso de dispositivos médicos intraluminales que incluyen catéteres de administración del fármaco intravasculares, cables, endoprótesis vasculares farmacológicas y revestimiento endoluminal.

Los compuestos de la presente divulgación se pueden administrar además a un sujeto en combinación con un agente de dirección para conseguir concentración local elevada del compuesto en el sitio diana. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden formular para liberación rápida o liberación lenta con el objetivo de mantener los fármacos o agentes en contacto con los tejidos diana durante un periodo que varía desde horas hasta semanas.

Composiciones farmacéuticas y administración

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que incluye un modulador de quinasa de triazalopiridazina en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia reconocerá que las composiciones farmacéuticas incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los moduladores de quinasa de triazalopiridazina descritos anteriormente.

En aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico, los compuestos de la divulgación se pueden formular para una diversidad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar en general en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000).

De acuerdo con otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen compuestos de fórmula I y un transportador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad del compuesto en las composiciones de la divulgación es tal que es eficaz para inhibir de forma detectable una proteína quinasa, particularmente c-Met en una muestra biológica o en un paciente.

Como se usan el presente documento, el término “c-Met” es sinónimo de “cMet”, “MET”, “Met” u otras designaciones conocidas por un experto en la materia. En un aspecto, una composición de la presente divulgación se formula para administración a un paciente que necesita tal composición. En otro aspecto, la composición de la divulgación se formula para administración oral a un paciente.

Los compuestos de acuerdo con la divulgación son eficaces a través de un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, en el tratamiento de seres humanos adultos, las dosis desde 0,01 hasta 10.000 mg, desde 0,5 hasta 1000 mg, desde 1 a 500 mg por día y desde 5 a 100 mg por día son ejemplos de dosis que se pueden usar. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en la cual se administre el compuesto, el sujeto que se tiene que tratar, el peso corporal del sujeto que se tiene que tratar y la preferencia y experiencia del médico tratante.

Las sales farmacéuticamente aceptables generalmente se conocen bien por los expertos en la materia y pueden incluir, a modo de ejemplo pero sin limitación, acetato, bencenosulfonato, besilato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, citrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, 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 en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª 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.

Dependiendo de las afecciones específicas que se estén tratando, tales agentes se pueden formular en formas de dosificación líquidas o sólidas y administrarse por vía sistémica o por vía local. Los agentes se pueden administrar, por ejemplo, en una forma de liberación temporalizada o sostenida lenta como se conoce por los expertos en la

materia. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Las vías adecuadas pueden incluir administración oral, bucal, mediante pulverización de inhalación, sublingual, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosal, nasal o intestinal; administración parenteral, incluyendo infecciones intramuscular, subcutánea, intramedular, así como también inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intra-articular, intraesternal, intrasinovial, intra-hepática, intralesional, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intraocular u otros modos de administración.

Para inyección, los agentes de la divulgación se pueden formular y diluir en soluciones acuosas, tal como en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para tal administración transmucosal, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se tiene que atravesar. Tales penetrantes se conocen en general en la técnica.

El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables inertes para formular los compuestos divulgados en el presente documento para la práctica de la divulgación en dosis adecuadas para administración sistémica está dentro del alcance de la divulgación. Con la elección apropiada de vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente divulgación, en particular, aquellas formuladas como soluciones, se pueden administrar por vía parenteral, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos se pueden formular fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración oral. Tales vehículos posibilitan que los compuestos de la divulgación se formulen como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral mediante un paciente que se tiene que tratar.

Para administración nasal o inhalación, los agentes de la divulgación también se pueden formular mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia 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.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente divulgación incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su fin pretendido. La determinación de las cantidades eficaces está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Adicionalmente a los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, grageas, cápsulas o soluciones.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando los compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después añadiendo auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o 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 disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato de sodio.

Los núcleos de gragea se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol (PEG) y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de gragea para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de las dosis del compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como también cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como bisfenol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquidos (PEG). Adicionalmente, se pueden añadir estabilizantes.

Dependiendo de la afección particular o patología que se tiene que tratar o prevenir, se pueden administrar agentes terapéuticos adicionales, que normalmente se administran para tratar o prevenir esa afección, junto con los inhibidores de la presente divulgación. Por ejemplo, agentes quimioterapéuticos u otros agentes antiproliferativos se pueden combinar con los inhibidores de la presente divulgación para tratar enfermedades proliferativas y cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos conocidos incluyen, pero sin limitación, adriamicina, dexametasona, vincristina, ciclofosfamida, fluorouracilo, topotecán, taxol, interferones y derivados de platino.

Otros ejemplos de los agentes con los cuales se pueden combinar también los inhibidores de la presente divulgación, incluyen, sin limitación, agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides, bloqueantes de TNF, IL-1

RA, azatioprina, ciclofosfamida y sulfasalazina; agentes inmunomoduladores e inmunosupresores tales como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, micofenolato mofetil, interferones, corticosteroides, ciclofofamida, azatioprina y sulfasalazina; factores neutróficos tales como inhibidores de acetilcolinesterasa, inhibidores de MAO, interferones, anticonvulsivos, bloqueantes de canales de iones, riluzol y agentes anti-Parkinson; agentes para tratar enfermedad cardiovascular tales como bloqueantes beta, inhibidores de ACE, diuréticos, nitratos, bloqueantes de canal de calcio y estatinas; agentes para tratar enfermedad hepática tales como corticosteroides, colestiramina, interferones y agentes antivirales; agentes para tratar trastornos sanguíneos tales como corticosteroides, agentes anti-leucémicos y factores del crecimiento; agentes para tratar diabetes tales como insulina, análogos de insulina, inhibidores de alfa glucosidasa, biguanidas y sensibilizantes de insulina; y agentes para tratar trastornos de inmunodeficiencia tales como gamma globulina.

Estos agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de un régimen de dosificación múltiple, de la composición que contiene inhibidor. Como alternativa, estos agentes pueden ser parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con el inhibidor en una composición única.

La presente divulgación no está limitada en su alcance por las realizaciones ilustradas, que tienen por objeto ser ilustraciones de aspectos únicos de la divulgación. De hecho, diversas modificaciones de la divulgación además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones tienen por objeto estar dentro del alcance de la presente divulgación. Además, una cualquiera o más de las características de cualquier realización de la divulgación se pueden combinar con una cualquiera o más de otras características de cualquier otra realización de la divulgación, sin alejarse del alcance de la divulgación. Por ejemplo, los moduladores de quinasa de triazalopiridazina descritos en la sección de modulador de quinasa de triazalopiridazina son aplicables de igual manera a los procedimientos de tratamiento y procedimientos para inhibir quinasas descritos en el presente documento. Las referencias citadas a través de la presente solicitud son ejemplos del nivel de especialidad en la materia y se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los fines, bien se hayan incorporado previamente específicamente o no.

Ensayos

Los compuestos de la presente divulgación se pueden ensayar fácilmente para determinar su capacidad de modular proteína quinasas, unirse a proteína quinasas y/o prevenir el crecimiento o la proliferación celular. Algunos ejemplos de ensayos útiles se presentan más adelante.

Ensayos de inhibición y unión a quinasa

La inhibición de diversas quinasas se mide mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como los diversos presentados en el presente documento y aquellos descritos en la publicación Upstate KinaseProfiler Assay Protocols de junio de 2003.

Por ejemplo, cuando se realizan ensayos *in vitro*, la quinasa típicamente se diluye hasta la concentración apropiada para formar una solución de quinasa. Se añade un sustrato de quinasa y un donador de fosfato, tal como ATP, a la solución de quinasa. Se permite que la quinasa transfiera un fosfato al sustrato de quinasa para formar un sustrato fosforilado. La formación de un sustrato fosforilado se puede detectar directamente mediante cualquier medio apropiado, tal como radiactividad (por ejemplo, [γ-^{32}**P**-ATP]) o el uso de anticuerpos secundarios detectables (por ejemplo ELISA). Como alternativa, la formación de un sustrato fosforilado se puede detectar usando cualquier técnica apropiada, tal como la detección de concentración de ATP (por ejemplo, sistema de ensayo Kinase-Glo® (Promega)). Los inhibidores de quinasa se identifican detectando la formación de un sustrato fosforilado en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo (véase la sección de Ejemplos más adelante).

La capacidad del compuesto de inhibir una quinasa en una célula también se puede ensayar usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, células que contienen una quinasa se pueden poner en contacto con un agente activador (tal como un factor de crecimiento) que activa la quinasa. La cantidad de sustrato fosforilado intracelular formado en ausencia y presencia del compuesto de ensayo se puede determinar lisando las células y detectando la presencia de sustrato fosforilado mediante cualquier procedimiento apropiado (por ejemplo ELISA). Cuando la cantidad de sustrato fosforilado producida en presencia del compuesto de ensayo se reduce con relación a la cantidad producida en ausencia del compuesto de ensayo, se indica la inhibición de quinasa. En la sección de Ejemplos más adelante se describen ensayos celulares de quinasa más detallados.

Para medir la unión de un compuesto a una quinasa, se puede usar cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede usar un kit de ensayo fabricado por Discoverx (Fremont, CA), ED-Staurosporine NSIP™ Enzyme Binding Assay Kit (véase Patente de Estados Unidos Nº 5.643.734). La actividad de quinasa también se puede ensayar como en la Patente de Estados Unidos Nº 6.589.950, expedida el 8 de julio de 2003.

Los inhibidores de quinasa adecuados se pueden seleccionar a partir de los compuestos de la divulgación a través de exploración cristalográfica de proteína, como se divulga en, por ejemplo Antonysamy y col., Publicación PCT Nº WO03087816A1.

Los compuestos de la presente divulgación se pueden explorar informáticamente para ensayar y visualizar su capacidad de unirse y/o inhibir diversas quinasas. La estructura explorar informáticamente con una pluralidad de compuestos de la presente divulgación para determinar su capacidad de unirse a una quinasa en diversos sitios. Tales compuestos se pueden usar como dianas o candidatos en esfuerzos de química medicinal para identificar, por ejemplo, inhibidores de importancia terapéutica potencia (Travis, Science, 262: 1374, 1993). Las tres estructuras dimensionales de tales compuestos se pueden superponer en una representación tridimensional de quinasas o un sitio activo o un bolsillo de unión de las mismas para evaluar si el compuesto se ajusta espacialmente a la representación y por lo tanto a la proteína. En esta exploración, la calidad de ajuste de tales entidades o compuestos al bolsillo de unión se puede juzgar mediante la complementariedad de forma o mediante la energía de interacción estimada (Meng y col., J. Comp. Chem. 13: 505-24, 1992).

La exploración de compuestos de la presente divulgación que se unen a y/o modulan quinasas (por ejemplo, inhiben o activan quinasas) de acuerdo con la presente divulgación generalmente implica la consideración de dos factores. En primer lugar, el compuesto tiene que ser capaz de asociarse físicamente y estructuralmente, covalentemente o no covalentemente con quinasas. Por ejemplo, las interacciones covalentes pueden ser importantes para diseñar inhibidores irreversibles o suicidas de una proteína. Las interacciones moleculares no covalentes importantes en la asociación de quinasas con el compuesto incluyen enlace de hidrógeno, interacciones iónicas, van der Waals e interacciones hidrófobas. En segundo lugar, el compuesto tiene que ser capaz de asumir una conformación y orientación en relación con el bolsillo de unión, que permita que el mismo se asocie con quinasas. Aunque determinadas partes del compuesto no participarán directamente en esta asociación con quinasas, esas porciones pueden aún influir sobre la conformación global de la molécula y pueden tener un impacto significativo sobre la potencia. Los requerimientos conformacionales incluyen la estructura tridimensional global y la orientación del grupo químico del compuesto en relación con todo o una parte del bolsillo de unión o la separación entre grupos funcionales de un compuesto que comprende varios grupos químicos que interaccionan directamente con quinasas.

Los programas de acoplamiento descritos en el presente documento, tales como, por ejemplo, DOCK o GOLD, se usan para identificar compuestos que se unen al sitio activo y/o al bolsillo de unión. Los compuestos se pueden explorar frente a más de un bolsillo de unión de la estructura de proteína o más de un grupo de coordenadas para la misma proteína, teniendo en cuenta diferentes conformaciones dinámicas moleculares de la proteína. Después se puede usar una puntuación de consenso para identificar los compuestos que tienen el mejor ajuste para la proteína (Charifson, P.S. y col., 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 de acuerdo con los procedimientos descritos en Klingler y col., Solicitud de Utilidad de los Estados Unidos, presentada el 3 de mayo de 2002, titulada “Computer Systems and Methods for Virtual Screening of Compounds”. Los compuestos que tienen el mejor ajuste se obtienen posteriormente a partir del productor de la biblioteca química o se sintetizan y se usan en ensayos de unión y bioensayos.

Las técnicas de modelado por ordenador se pueden usar para evaluar el efecto modular o de unión potencial de un compuesto químico sobre las quinasas. Si el modelado por ordenador indica una interacción fuerte, la molécula entonces se puede sintetizar y ensayar para determinar su capacidad de unirse a quinasas e influir sobre su actividad (inhibir o activar).

Los compuestos moduladores u otros compuestos de unión de quinasas se pueden evaluar informáticamente por medio de una serie de etapas en las que grupos químicos o fragmentos se exploran y seleccionan según su capacidad de asociarse con los bolsillos de unión individuales u otras áreas de quinasas. Este proceso puede comenzar mediante inspección visual de, por ejemplo, el sitio activo en la pantalla del ordenador en base a las coordenadas de quinasas. Los fragmentos o grupos químicos seleccionados después se pueden posicionar en una diversidad de orientaciones o acoplarse, dentro de un bolsillo de unión individual de quinasas (Blaney, J.M. y Dixon, J.S., Perspectives in Drug Discovery and Design, 1: 301, 1993). El acoplamiento manual se puede conseguir usando software tal como Insight II (Accelrys, San Diego, CA) MOE (Chemical Computing Group, Inc., Montreal, Quebec, Canadá); y SYBYL (Tripos, Inc., St. Louis, MO, 1992), seguido por minimización de energía y/o dinámica molecular con campos de fuerza de mecánica molecular convencional, tales como CHARMM (Brooks y col., J. Comp. Chem. 4: 187-217, 1983), AMBER (Weiner y col., J. Am. Chem. Soc. 106: 765-84, 1984) y C^2 MMFF (Merck Molecular Force Field; Accelrys, San Diego, CA). El acoplamiento más automatizado se puede conseguir usando programas tales como DOCK (Kuntz y col., J. Mol. Biol., 161: 269-88, 1982; DOCK está disponible en la Universidad de California, San Francisco, CA); AUTODOCK (Goodsell & Olsen, Proteins: Structure, Function, and Genetics 8: 195-202, 1990; AUTODOCK está disponible en Scripps Research Institute, La Jolla, CA); GOLD (Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC); Jones y col., J. Mol. Biol. 245: 43-53, 1995); y FLEXX (Tripos, St. Louis, MO; Rarey, M. y col., J. Mol. Biol. 261: 470-89, 1996). Otros programas apropiados se describen en, por ejemplo, Halperin y col.

Durante la selección de compuestos mediante los procedimientos anteriores, la eficacia con la cual ese compuesto se puede unir a las quinasas se puede evaluar y optimizar mediante evaluación computacional. Por ejemplo, un compuesto que se ha diseñado o seleccionado para funcionar como un inhibidor de quinasas puede ocupar un volumen que se sobrepone al volumen ocupado por los restos en el sitio activo cuando el sustrato nativo se une, sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que existe alguna flexibilidad, que permite el rearreglo de las cadenas principales y las cadenas laterales. Adicionalmente, un experto en la materia puede diseñar compuestos que podrían aprovechar el reordenamiento de proteína tras la unión, tal como, por ejemplo, dar como resultado un

ajuste inducido. Un inhibidor de quinasa eficaz puede demostrar una diferencia relativamente pequeña en energía entre sus estados unido y libre (es decir, tiene que tener una pequeña energía de deformación de enlace y/o tensión conformacional baja tras la unión). Por tanto, los inhibidores de quinasa más eficaces deberían, por ejemplo, diseñarse con una energía de deformación de enlace de no más de 10 kcal/mol, no más de 7 kcal/mol, no más de 5 kcal/mol o no más de 2 kcal/mol. Los inhibidores de quinasa pueden interaccionar con la proteína en más de una conformación que es similar en la energía de unión global. En esos casos, la energía de deformación de enlace se considera que es la diferencia entre la energía del compuesto libre y la energía promedio de las conformaciones observadas cuando el inhibidor se une a la enzima.

Está disponible software informático específico en la técnica para evaluar energía de deformación e interacción electrostática de compuesto. Los ejemplos de programas diseñados para tales usos incluyen: Gaussian 94, revisión C (Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA. ©1995); AMBER, versión 7. (Kollman, Universidad de California en 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, Indiana University). Estos programas se pueden implementar por ejemplo, usando una estación de trabajo informática, como se conoce bien en la técnica, por ejemplo, una estación de trabajo LINUX, SGI o Sun. Los expertos en la materia conocerán otros sistemas de hardware y paquetes de software.

Los expertos en la materia pueden expresar proteína quinasa usando procedimientos conocidos en la técnica y los procedimientos divulgados en el presente documento. Los polipéptidos de quinasa nativos y mutados descritos en el presente documento se pueden sintetizar químicamente en su totalidad o en parte usando técnicas que se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., NY, 1983).

Los sistemas de expresión génica se pueden usar para la síntesis de polipéptidos nativos y mutados. Se pueden construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante del polipéptido nativo o mutado y señales de control transcripcional/traduccional apropiadas, que se conocen por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2001 y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989.

Se pueden usar sistemas de huésped-vector de expresión para expresar quinasa. Éstos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen la secuencia codificante; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia codificante; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformarse con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmidos Ti) que contienen la secuencia codificante; o sistemas de células animales. La proteína también se puede expresar en sistemas de terapia génica humana, incluyendo, por ejemplo, expresar la proteína para aumentar la cantidad de la proteína en un individuo o para expresar una proteína terapéutica sometida a ingeniería genética. Los elementos de expresión de estos sistemas varían en su fuerza y especificidad.

Los vectores diseñados específicamente permiten el transporte de ADN entre huéspedes tales como bacteria-levadura o bacteria-células animales. Un vector de expresión construido de forma apropiada puede contener: un origen de replicación para replicación autónoma en células huésped, uno o más marcadores seleccionables, un número limitado de sitios de enzimas de restricción útiles, un potencial para alto número de copias y promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige ARN polimerasa para unirse a ADN e iniciar la síntesis de ARN. Un promotor fuerte es uno que provoca que los ARNm se inicien a frecuencia elevada.

El vector de expresión también puede comprender diversos elementos que afectan la transcripción y la traducción, incluyendo, por ejemplo, promotores constitutivos e inducibles. Estos elementos con frecuencia son dependientes de huésped y/o vector. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tales como el promotor T7, pL de bacteriólogo λ, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. Cuando se clona en sistemas de células de insecto, se pueden usar promotores tales como el promotor de polihedrina de baculovirus; cuando se clona en sistemas de células vegetales, se pueden usar promotores obtenidos a partir 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 clorofila a/b) o a partir de virus de planta (por ejemplo, el promotor 35S RNA de CaMV; el promotor de proteína de cubierta de TMV); cuando se clonan en sistemas de células de mamífero, se pueden usar promotores de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o promotores virales de mamífero (por ejemplo, promotor tardío de adenovirus; promotor de virus vaccinia 7.5K, promotor de SV40; promotor del virus del papiloma bovino; y promotor del virus de Epstein-Barr).

Se pueden usar diversos procedimientos para introducir el vector en las células huésped, por ejemplo, transformación, transfección, infección, fusión de protoplastos y electroporación. Las células que contienen vector de

expresión se propagan clonalmente y se analizan individualmente para determinar si las mismas producen los polipéptidos apropiados. Se pueden usar diversos procedimientos de selección, incluyendo, por ejemplo, resistencia a antibiótico para identificar células huésped que se han transformado. La identificación de clones de células huésped que expresan polipéptidos se puede realizar mediante varios medios, incluyendo pero sin limitación reactividad inmunológica con anticuerpos anti-quinasa y la presencia de actividad asociada a células huésped.

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

Para determinar la secuencia o secuencias de ADNc que producen niveles óptimos de actividad y/o proteína, se construyen moléculas de ADNc modificadas. Un ejemplo no limitante de una ADNc modificado es cuando el codón de uso en el ADNc se ha optimizado para la célula huésped en la cual se expresará el ADNc. Las células huésped se transforman con las moléculas de ADNc y se miden los niveles de ARN quinasa y/o proteínas.

Los niveles de proteína quinasa en células huésped se cuantifican mediante una diversidad de procedimientos tales como inmunoafinidad y/o técnicas de afinidad a ligando, perlas de afinidad especifica a quinasa o anticuerpos específicos se usan para aislar proteína marcada con ^{35}S-metionina o no marcada La proteína marcada o no marcada se analiza mediante SDS-PAGE. La proteína no marcada se detecta mediante transferencia de Western, ELISA o RIA empleando anticuerpos específicos.

A continuación de la expresión de quinasa en una célula huésped recombinante, los polipéptidos se pueden recuperar para proporcionar la proteína en forma activa. Están disponibles varios procedimientos de purificación y son adecuados para su uso. La quinasa recombinante se puede purificar a partir de lisados celulares o a partir de medios de cultivo acondicionados, mediante diversas combinaciones de o aplicación individual de etapas de fraccionamiento o cromatografía que se conocen en la técnica.

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

Como alternativa, los polipéptidos se pueden recuperar a partir de una célula huésped en una forma no plegada inactiva, por ejemplo, a partir de cuerpos de inclusión de bacterias. Las proteínas recuperadas de esta forma se pueden solubilizar usando un desnaturalizante, por ejemplo, clorhidrato de guanidinio y después plegarse nuevamente en una forma activa usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como diálisis.

Ensayos de crecimiento celular

En la técnica se conoce una diversidad de ensayos de crecimiento celular y son útiles para identificar compuestos de triazalopiridazina (es decir “compuestos de ensayo”) capaces de inhibir (por ejemplo reducir) crecimiento y/o proliferación celular.

Por ejemplo, se conoce una diversidad de células necesitan quinasas específicas para crecimiento y/o proliferación. La capacidad de una célula de este tipo de crecer en presencia de un compuesto de ensayo se puede evaluar y comparar con el crecimiento en ausencia del compuesto de ensayo identificando de ese modo las propiedades antiproliferativas del compuesto desarrollo. Un procedimiento común de este tipo es medir el grado de incorporación del marcador, tal como timidina tratada con tritio, en el ADN de células en división. Como alternativa, la inhibición de la proliferación celular se puede ensayar determinando la actividad metabólica total de células con un marcador sustituto que se correlaciona con el número de células. Las células se pueden tratar con un indicador metabólico en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Las células viables metabolizan el indicador metabólico formando de ese modo un producto metabólico detectable. Cuando los niveles de producto metabólico detectable se reducen en presencia del compuesto de ensayo con relación a la ausencia del compuesto de ensayo, la inhibición del crecimiento y/o proliferación celular se indica. Los indicadores metabólicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, sales de tetrazolio y AlamorBlue® (véase la sección de Ejemplos más adelante).

Un ensayo para quinasas que estimula la migración celular es el ensayo de raspado. Este ensayo se usa para evaluar inhibidores de quinasas mimetizando acontecimientos tales como curación de heridas. En una variante de este ensayo usada para ensayar inhibidores de MET, se permite que una monocapa confluyente de células se forme en una placa celular. Después de la formación de la monocapa, se genera una herida lineal en la monocapa raspando mecánicamente la monocapa formando de ese modo un canal sin células. Se añade un factor de crecimiento necesario para la quinasa para el crecimiento celular en presencia o ausencia del compuesto de ensayo. El cierre del canal en presencia del compuesto de ensayo indica un fallo del compuesto de ensayo para inhibir la quinasa permitiendo de ese modo que la migración y el crecimiento celular cierren el canal. De forma inversa, la presencia del canal después de añadir el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo inhibió la quinasa evitando de ese modo el crecimiento celular. La selección de las células apropiadas, las condiciones de

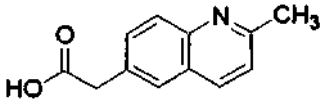
crecimiento y los factores de crecimiento están dentro de las capacidades de un experto en la materia (véase la sección de Ejemplos más adelante).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero sin limitar, la invención reivindicada. La preparación de las realizaciones de la presente invención se describe en los siguientes ejemplos. El experto en la materia comprenderá que las reacciones químicas y los procedimientos sintéticos proporcionados se pueden modificar para preparar muchos de los otros compuestos de la presente invención. Allí donde los compuestos de la presente invención no se hayan ilustrado, el experto en la materia reconocerá que estos compuestos se pueden preparar modificando los procedimientos de síntesis presentados en la presente invención y utilizando procedimientos de síntesis conocidos en la técnica.

Síntesis de los intermedios

Intermedio 1: Ácido (2-metil-quinolin-6-il)-acético



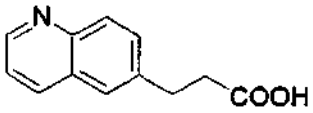
Etapa 1: Éster etílico del ácido (2-metil-quinolin-6-il)-acético

Se cargó un vial bajo atmósfera de nitrógeno con 6-bromo-quinaldina (500 mg, 2,25 mmol), bis(pinacolato) diboro (1,14 g, 4,5 mmol), aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)-ferroceno]paladio (II) diclorometano (92 mg, 0,112 mmol), acetato sódico (547 mg, 6,75 mmol) y dimetilformamida (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a 100ºC durante 18 h , a continuación se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó dos veces con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se absorbió sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con un gradiente de 0-8% de metanol en diclorometano dio 432 mg de un aceite oscuro. El aceite se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml) y se añadió a un vaso, bajo atmósfera de nitrógeno, que contiene acetato de paladio (II) (7 mg, 0,03 mmol), tri-1-naftilfosfina (37 mg, 0,09 mmol) y fosfato potásico tribásico (1 g, 5 mmol). A continuación se añadió 2-bromoacetato de etilo (167 mg, 1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 h. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se absorbieron en gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con gradiente de 0-80% de acetato de etilo en hexano dio 105 mg del producto como un aceite amarillo. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 1,19 (t, 3H), 2,65 (s, 3H), 3,85 (s, 2H), 4,10 (c, 2H), 7,40 (d, 1H), 7,61 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 8,20 (d, 1H); MS (m/z) 230 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Ácido (2-metil-quinolin-6-il)-acético

A una solución de éster etílico del ácido (2-metil-quinolin-6-il) acético (100 mg, 0,436 mmol) en metanol (2 ml) se añadió una solución acuosa 4M de hidróxido de litio (0,55 ml, 2,18 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 h, después se concentró *in vacuo,* se diluyó con agua y se trató con ácido clorhídrico acuoso 1 N hasta alcanzar pH 5, La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x) y las capas orgánicas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron *in vacuo* dando 19 mg del producto como un sólido beige claro. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 2,65 (s, 3H), 3,76 (s, 2H), 7,40 (d, 1H), 7,60 (dd, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 8,20 (d, 1H); MS (m/z) 202 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 2: Ácido 3-quinolin-6-il-propiónico



Etapa 1: Éster etílico del ácido 3-quinolin-6-il-acrílico

Se cargó un vial bajo atmósfera de nitrógeno con 6-bromo-quinolina (1 g, 4,8 mmol) y dimetilformamida (15 ml), seguido de acrilato de etilo (2,1 ml, 19,2 mmol), trietilamina (6,7 ml, 48 mmol) y acetato de paladio (II) (32 mg, 0,142 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100ºC durante 5 h, a continuación la mezcla caliente se filtró sobre celite y el filtrado se concentró *in vacuo.* El residuo se repartió entre agua y acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con

una solución acuosa saturada de cloruro amónico, una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y a continuación salmuera. La capa orgánica se absorbió a continuación sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con un gradiente 10-80% de acetato de etilo en hexano dio 952 mg del producto como un aceite amarillo. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 1,28 (t, 3H), 4,20 (c, 2H), 6,82 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,84 (d, 1H), 8,01 (d, 1H), 8,16 (dd, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,37 (dd, 1H), 8,93 (dd, 1H); MS (m/z) 228 $[M+H^+]^+$.

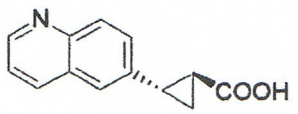
Etapa 2: Éster etílico del ácido 3-quinolin-6-il-propiónico

Una mezcla de éster etílico del ácido 3-quinolin-6-il-acrílico (200 mg, 0,881 mmol) y Pd/C al 10% en peso (93 mg, 0,088 mmol) en metanol (3 ml) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 3 h. La mezcla se filtró a través de celite y el filtrado se absorbió sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con un gradiente de 0-65% de acetato de etilo en hexano dio 100 mg del producto como un aceite transparente. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 1,13 (t, 3H), 2,74 (t, 2H), 3,05 (t, 2H), 4,04 (c, 2H), 7,50 (dd, 1H), 7,67 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,29 (dd, 1H), 8,84 (dd, 1H); MS (m/z) 230 $[M+H^+]^+$.

Etapa 3: Ácido 3-quinolin-6-il-propiónico

A una solución de éster etílico del ácido 3-quinolin-6-il-propiónico (100 mg, 0,437 mmol) en metanol (2 ml) se añadió una solución acuosa 4M de hidróxido de litio (0,55 ml, 2,18 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h después se concentró *in vacuo,* se diluyó con agua y se trató con ácido clorhídrico acuoso 1 N hasta alcanzar pH 5, La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x) y las capas orgánicas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron *in vacuo* dando 18 mg del producto como un sólido blanco. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 2,67 (t, 2H), 3,02 (t, 2H), 7,50 (dd, 1H), 7,67 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,29 (dd, 1H), 8,84 (dd, 1H); MS (m/z) 202 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 3: Ácido *trans*-2-Quinolin-6-il-ciclopropanocarboxílico



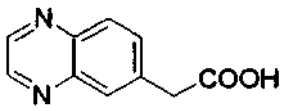
Etapa 1: Éster etílico del ácido *trans* 2-quinolin-6-il-ciclopropanocarboxílico

A una suspensión de hidruro sódico (71 mg, 1,76 mmol) en DMSO (3 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de trimetilsulfoxonio (261 mg, 2,03 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió gota a gota una solución de éster etílico del ácido 3-quinolin-6-il-acrílico (200 mg, 0,881 mmol) en DMSO (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h y se neutralizó con una solución acuosa saturada de cloruro amónico. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2x) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3x) y se absorbieron a continuación sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con un gradiente de 0-80% de acetato de etilo en hexano dio 126 mg del producto como un sólido blanco. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 1,22 (t, 3H), 1,55 (m, 2H), 2,10 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 4,13 (c, 2H), 7,50 (dd, 1H), 7,58 (dd, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,26 (dd, 1H), 8,84 (dd, 1H); MS (m/z) 242 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Ácido *trans* 2-quinolin-6-il-ciclopropanocarboxílico

A una solución del éster etílico del ácido *trans*-2-quinolin-6-il-ciclopropanocarboxílico (125 mg, 0,523 mmol) en metanol (2 ml), se añadió una solución acuosa 4M de hidróxido de litio (0,65 ml, 2,62 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, después se concentró *in vacuo,* se diluyó con agua y se trató con ácido clorhídrico acuoso 1 N hasta alcanzar pH 4-5. El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y se secó *in vacuo* dando 102 mg del producto como un sólido blanco. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 1,50 (m, 2H), 1,96 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 7,50 (dd, 1H), 7,57 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,26 (dd, 1H), 8,83 (dd, 1H); MS (m/z) 214 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 4: Ácido quinoxalin-6-il-acético



Etapa 1: Éster etílico del ácido quinoxalin-6-il-acético

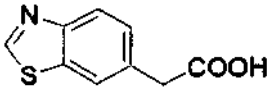
Se cargó un vial bajo atmósfera de nitrógeno con clorhidrato del ácido benzopirazin-6-borónico (500 mg, 2,38 mmol),

acetato de paladio (II) (16 mg, 0,071 mmol), tri-1-naftilfosfina (88 mg, 0,214 mmol), fosfato potásico tribásico (2,52 g, 11,9 mmol) y tetrahidrofurano (10 ml). A continuación se añadió 2-bromoacetato de etilo (0,315 ml, 2,85 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 6 h. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x). Las capas orgánicas combinadas se absorbieron a continuación sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con un gradiente de 0-100% de acetato de etilo en hexano dio 96 mg del producto como un aceite amarillo oscuro. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 1,20 (t, 3H), 3,99 (s, 2H), 4,11 (c, 2H), 7,79 (dd, 1H), 8,01 (d, 1H), 8,06 (d, 1H), 8,94 (d, 2H); MS (m/z) 217 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Ácido quinoxalin-6-il-acético

A una solución de éster etílico del ácido quinoxalin-6-il-acético (95 mg, 0,44 mmol) en metanol (2 ml) se añadió hidróxido de litio acuoso 4 M (0,55 ml, 2,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 h después se concentró *in vacuo,* se diluyó con agua y se extrajo con éter dietílico (3x). La capa acuosa se trató con ácido clorhídrico acuoso 1 N hasta alcanzar pH 2 y se extrajo con acetato de etilo (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron *in vacuo,* dando 64 mg del producto como un sólido beige. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 3,90 (s, 2H), 7,78 (dd, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,06 (d, 1H), 8,93 (dd, 2H); MS (m/z) 189 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 5: Ácido benzotiazol-6-il-acético



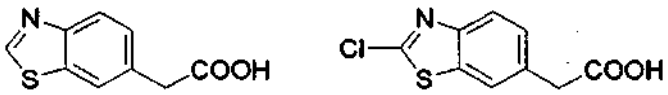
Etapa 1: Ácido (2-amino-benzotiazol-6-il)-acético

Se disolvieron ácido (4-Amino-fenil)-acético (20 g, 132,5 mmol) y NH_4SCN (20g, 263,2 mmol) en 300 ml de ácido acético y la mezcla se enfrió hasta 15ºC, se trató con Br_2 (21,2 g, 6,8 ml) en ácido acético (10 ml) y la temperatura no excedió los 15ºC. A continuación, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtró y el residuo se volvió a disolver en agua, se ajustó el pH = 5. El precipitado se filtró y se secó obteniéndose ácido 2-amino-benzotiazol-6-il)-acético como un polvo amarillo claro (24 g, 87,1%).

Etapa 2: Ácido benzotiazol-6-il-acético

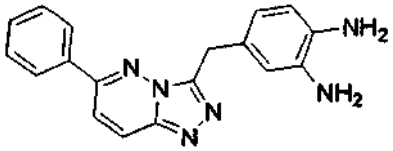
Se disolvió ácido (2-amino-benzotiazol-6-il)-acético (20 g, 96,2 mmol) en 1,4-dioxano (750 ml). Se añadió nitrito i-amílico (22,4 g, 192,4 mmol) gota a gota a la solución a temperatura ambiente. La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a reflujo durante 2 h. Después de finalizada la reacción, el disolvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Intermedio 5 e Intermedio 6: Ácido benzotiazol-6-il-acético y ácido (2-cloro-benzotiazol-6-il)-acético



A una solución de diclorhidrato de ácido (2-amino-benzotiazol-6-il)-acético (150 mg, 0,533 mmol) en dimetilformamida (3 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió gota a gota *terc*-butilnitrito (0,076 ml, 0,64 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50ºC durante 1,5 h y se concentró y se secó *in vacuo* como una mezcla (2:3) de ácido benzotiazol-6-il-acético y ácido (2-cloro-benzotiazol-6-il)-acético. La mezcla se usó tal cual en el procedimiento de acoplamiento/ciclización, como se describe en el método Y.

Intermedio 7: 4-(6-Fenil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-benceno-1,2-diamina



Etapa 1: Éster metílico del ácido 4-amino-fenil acético

A una suspensión de ácido 4-amino-fenil acético (5 g, 33 mmol) en metanol (20 ml) se añadió gota a gota ácido sulfúrico concentrado (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1,5 h, y después se concentró *in vacuo.* El residuo se repartió entre carbonato potásico acuoso 1 M y éter dietílico. La capa orgánica se lavó con carbonato potásico acuoso 1 M, agua, a continuación se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El filtrado se concentró y se secó *in vacuo* dando 4,65 g del producto como un aceite amarillo oscuro. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 3,43 (s, 2H), 3,57 (s, 3H), 4,97 (s, 2H), 6,49 (d, 2H), 6,88 (d, 2H); MS (m/z) 166 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Éster metílico del ácido (4-acetilamino-3-nitro-fenil)-acético

Una solución de éster metílico del ácido 4-amino-fenil acético (3 g, 18,2 mmol) en anhídrido acético (16 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta una temperatura de 0ºC y se añadió gota a gota ácido nítrico fumante (2,3 ml). El baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó durante otros 20 minutos antes de verterla en agua helada. El precipitado amarillo resultante se filtró, se lavó con agua y se secó *in vacuo* a 50ºC dando 3,7 g del producto. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 2,05 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,81 (s, 2H), 7,54 (d, 1H), 7,58 (dd, 1H), 7,87 (d, 1H), 10,2 (s, 1H).

Etapa 3: Clorhidrato del ácido (4-amino-3-nitro-fenil)-acético

Una solución de éster metílico del ácido (4-acetilamino-3-nitro-fenil)-acético (1,3 g, 5,15 mmol) en ácido clorhídrico acuoso 6 N (10 ml) se agitó a reflujo durante 1,5 h y a continuación se concentró *in vacuo* hasta la sequedad. El residuo se trituró con éter dietílico, se filtró, se lavó con éter dietílico y se secó *in vacuo* dando 978 mg del producto como un sólido naranja-amarillo oscuro. ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 3,49 (s, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,30 (dd, 1H), 7,86 (d, 1H); MS (m/z) 197 $[M+H^+]^+$.

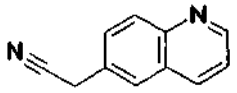
Etapa 4: 2-Nitro-4-(6-fenil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-fenilamina

El compuesto del título se puede preparar de acuerdo con el procedimiento descrito en el método D como un sólido amarillo (91 mg, 0,263 mmol, rendimiento 23%). ^{1}HNMR (DMSO) δ 4,50 (s, 2H), 6,97 (d, 1H), 7,43 (s, 2H), 7,45 (dd, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,95 (d, 1H), 8,14 (m, 3H), 8,42 (d, 1H); MS (m/z) 347 (M+H).

Etapa 5: 4-(6-Fenil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-benceno-1,2-diamina

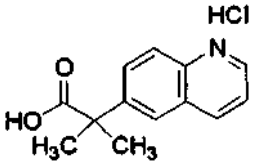
Una mezcla de 2-nitro-4-(6-fenil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-fenilamina (89 mg, 0,257 mmol) y Pd/C al 10% en peso (27 mg, 0,026 mmol) en metanol (4 ml), tetrahidrofurano (2 ml) y dimetilformamida (2 ml) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 4 h. El catalizador se filtró a través de celite y el filtrado se concentró y se secó *in vacuo* dando 81 mg del producto como un sólido beige. ^{1}HNMR (DMSO) δ 4,30 (s, 2H), 4,32 (s, 2H), 4,43 (s, 2H), 6,43 (m, 2H), 6,50 (s,1H), 7,60 (m, 3H), 7,93 (d,1H), 8,11 (m,2H), 8,39 (d, 1H); MS(m/z) 317$[M+H^+]^+$.

Intermedio 8: Quinolin-6-il-acetonitrilo



Se calentó hasta reflujo una suspensión de 6-metilquinolina (21,48 g, 150 mmol) y *N*-bromosuccinimida (27,6 g, 155 mmol) en CCl_4 (430 ml). Una vez alcanzado el reflujo, se añadió peróxido de benzoílo (1,4 g, 5,1 mmol) de una sola vez. La mezcla se agitó a reflujo durante otras 2 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 3 horas y el precipitado formado se eliminó por filtración. El filtrado se lavó con NaOH acuoso al 5% (2 x 150 ml), agua (200 ml), se secó (Na_2SO_4) y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, hexano/acetato de etilo 100:0 - 35/65). Las fracciones que contenían el compuesto de bromo deseado se diluyeron con dimetilformamida (400 ml) y la mezcla se concentró *in vacuo* para eliminar el hexano y el acetato de etilo. A esta mezcla se añadió después $KHCO_3$ (15 g, 150 mmol) seguido de cianuro sódico (7,34 g, 150 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a 40°C durante otras 2 horas. Pasado este tiempo la mezcla se concentró *in vacuo* y el residuo se vertió sobre $KHCO_3$ acuoso al 5% (600 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron sobre gel de sílice. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, hexano:acetato de etilo 80/20 - 30/70) dio lugar al compuesto del título como un sólido blanco (4,8 g, 28,6 mmol, rendimiento 20%). ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO-d6); δ 4,28 (2H, s), 7,56 (1H, dd), 7,11 (1H, dd), 7,97 (1H, d), 8,01 (1H, d), 8,40 (1H, dd), 8,92 (1H, dd); MS (m/z) 169 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 9: Clorhidrato del ácido 2-metil-2-quinolin-6-il-propiónico



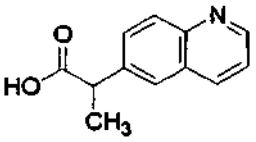
Etapa 1: 2-Metil-2-quinolin-6-il-propionitrilo

Una solución de quinolin-6-il-acetonitrilo (Intermedio 8) (200 mg, 1,2 mmol) en tetrahidrofurano (12 ml) se enfrió hasta -78ºC y se le añadió yoduro de metilo (2,5 mmol, 157 μl) seguido de *terc*-butóxido potásico (2,5 mmol, 280 mg). La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante la noche. Pasado este tiempo la mezcla se concentró *in vacuo* y se absorbió en $NaHCO_3$ (30 ml) acuoso y se extrajo con diclorometano (3x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, hexano:acetato de etilo 90/10 - 50/50) dio el compuesto del título como un aceite incoloro transparente (214 mg, rendimiento 91%). ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO-d6) δ 1,80 (6H, s), 7,58 (1H, dd), 7,94 (1H, dd), 8,08 (1H, d), 8,11 (1H, d), 8,45 (1H, dd), 8,93 (1H, dd); MS (m/z) 197 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Clorhidrato del ácido 2-metil-2-quinolin-6-il-propiónico

A una mezcla de 2-metil-2-quinolin-6-il-propionitrilo (760 mg, 3,88 mmol) en agua (3 ml) se añadió ácido clorhídrico concentrado (7 ml) y se calentó a 160ºC en un microondas durante 5 minutos. Pasado este tiempo la mezcla se concentró *in vacuo* y el residuo se secó mediante destilación azeotrópica en tolueno (3 x 5 ml) para dar el compuesto del título como un sólido blanco (949 mg, 3,77 mmol, rendimiento 97%). ^{1}H-RMN 500 MHz (D_2O) δ 1,54 (6H, s), 7,89 (1H, dd), 8,03-7,96 (2H, m), 8,11 (1H, d), 8,95-8,85 (2H, m).

Intermedio 10: Ácido 2-quinolin-6-il-propiónico



Etapa 1: Éster metílico del ácido quinolin-6-il-acético

A una solución agitada de ácido quinolin-6-il-acético (10 g, 53,0 mmol) en 100 ml de metanol se añadieron 2,5 ml de H_2SO_4 concentrado La mezcla se calentó hasta reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró dando un residuo marrón, el cual se diluyó con 100 ml de diclorometano, se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, a continuación la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró dando el compuesto del título como un aceite marrón (7,9 g, 73,6%).

Etapa 2: Éster metílico del ácido 2-quinolin-6-il-propiónico

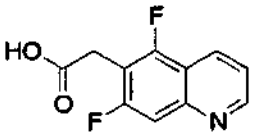
Se añadió una solución de n-butil-litio en hexano (1,6 M, 50,9 ml) a una solución agitada de diisopropilamina (5,32 g, 52,6 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (100 ml), enfrió a -40ºC bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió hasta -78ºC, a esta solución se añadió una solución de éster metílico del ácido quinolin-6-il-acético (7,9 g, 39,3 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano y HMPA (10,0 g, 55,8 mmol). La mezcla se agitó at -78ºC durante 1 hora y a continuación a -30˚C durante 30 min. A esta mezcla de reacción se añadió una solución de yoduro de metilo (8,0 g, 56,3 mmol) en tetrahidrofurano anhidro a -78ºC y la mezcla se agitó a -78ºC durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se diluyó con una solución saturada acuosa de NH_4Cl (100 ml) y agua (80 ml). La mezcla se extrajo con éter terc-butilmetilo, las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron dando un aceite marrón, el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con éter de petróleo y acetato de etilo (20:1) dando un aceite amarillo pálido (7,7 g, 91,1%). ^{1}H-RMN y el análisis reveló el compuesto del título se contaminó con éster metílico del ácido 2-metil-2-quinolin-6-il-propiónico al 10%.

Etapa 3: Ácido 2-quinolin-6-il-propiónico

El éster metílico del ácido 2-quinolin-6-il-propiónico que contiene éster metílico del ácido 2-metil-2-quinolin-6-il-

propiónico al 10% (7,7 g, 35,8 mmol) y NaOH (27 ml) ac. 2 N se calentó hasta reflujo durante 4 horas hasta que la mezcla de reacción se volvió transparente. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se extrajo con diclorometano y la capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 4-5, se añadió acetato de etilo (30 ml) y se agitó durante 10 min, el sólido resultante se filtró obteniéndose el producto, el cual recristalizó dos veces en metanol dando el compuesto del título (5,3 g, 73,7%): ^{1}H-RMN 300 MHz (DMSO-d6) δ 12,43(s, 1H), 8,86 (d, 1H), 8,33 (d, 1H), 7,99-7,86 (m, 2H), 7,72-7,49 (m, 2H), 3,92 (c, 1H), 1,48 (d, 3H). ES-MS m/z: 200 $[M-H^+]^-$, 400 (dímero).

Intermedio 11: Ácido (5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético



Etapa 1: 6-Bromo-5,7-difluoro-quinolina

Una mezcla de 4-bromo-3,5-difluoro-fenilamina (6,0 g, 28,8 mmol), sulfato ferroso (1,82 g), glicerol (8,6 ml), nitrobenceno (1,79 ml) y se añadieron lentamente 5,0 ml de ácido sulfúrico concentrado (5 ml). Después de la primera reacción vigorosa, la mezcla se calentó hasta reflujo durante cinco horas. El nitrobenceno se eliminó por destilación *in vacuo.* La solución acuosa se acidificó con ácido acético glacial y se separó un precipitado de color marrón, el cual se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo= 12/1) dando el compuesto del título como un sólido blanco (3,5 g, 49,8%).

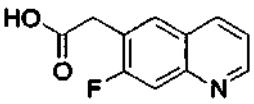
Etapa 2: Éster dietílico del ácido 2-(5,7-difluoro-quinolin-6-il)-malónico

Se añadió gota a gota malonato de etilo (9,28 g, 8,8 ml, 58,0 mmol) a una mezcla de hidruro sódico (60 por ciento en aceite mineral, 2,32 g, 58,0 mmol) en 1,4-dioxano (29 ml) a 60ºC. A continuación se añadieron CuBr (4,176 g, 29,0 mmol) y 6-bromo-5,7-difluoro-quinolina (7,07 g, 29,0 mmol) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 16 h. Pasado este tiempo se añadió ácido clorhídrico concentrado enfriando con hielo y se añadieron a continuación éter *terc*-butil metilo y agua. La capa orgánica separada se lavó secuencialmente con ácido clorhídrico (10%) y agua. Se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (3,13 g, 35,4%).

Etapa 3: Ácido (5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético

A un matraz de fondo redondo que contenía éster dietílico del ácido 2-(5,7-difluoro-quinolin-6-il)-malónico (2,48 g, 7,68 mmol) se añadió etanol (77 ml) y NaOH (103,2 ml) acuoso al 10%. La solución se sometió a reflujo durante 3 h. Pasado este tiempo el etanol se retiró a presión reducida formando una suspensión amarilla y se añadió tetrahidrofurano (50 ml) dando una solución amarilla transparente que se colocó en un baño de hielo y se agitó. Se añadió lentamente ácido clorhídrico 6N (50 ml) a la solución hasta alcanzar pH 1. La solución naranja clara se sometió a reflujo durante otra hora, tras lo cual se formaron dos capas. La capa superior de tetrahidrofurano se recogió y la solución acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron con sulfato sódico anhidro. La solución se filtró a continuación y el filtrado se concentró obteniéndose el compuesto del título (1,20 g, 70,1%). ^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d6) δ 12,82 (s, 1H), 8,98~9,00 (m, 1H), 8,47~8,50 (d, 1H), 7,61~7,74 (m, 2H), 3,86 (s, 2H). ES-MS m/z: 224,2 (M^++1).

Intermedio 12: Ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético



Etapa 1: 6-bromo-7-fluoro-quinolina

Se calentó suavemente una mezcla de 4-bromo-3-fluoro-fenilamina (2,85 g, 15 m mol), sulfato ferroso (0,95 g), glicerol (5,658 g, 4,5 ml), nitrobenceno (1,125 g, 0,93 ml) y ácido sulfúrico concentrado (2,61 ml). Después de la primera reacción vigorosa, la mezcla se calentó hasta reflujo durante 7 horas. El nitrobenceno se evaporó *in vacuo.* La solución acuosa se acidificó con ácido acético glacial y se separó el precipitado marrón oscuro, el cual se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo= 8/1) dando el compuesto del título como cristales blancos (1,44 g, 42,5%).

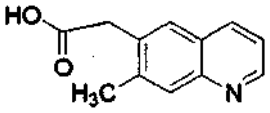
Etapa 2: Éster terc-butílico del ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético

A una solución de 6-bromo-7-fluoro-quinolina (1,04 g, 4,6 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml) se añadió una solución de acetato de bromuro de terc-butil-zinc (20 ml, 10,4 M en tetrahidrofurano) seguido de $Pd(PPh_3)_4$ (0,58 g, 0,5 mmol). La mezcla se calentó en un reactor de microondas durante 35 min a 120ºC. La mezcla de reacción se neutralizó con cloruro amónico saturado (60 ml) y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (0,75g, 63%).

Etapa 3: Ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético

Una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético (3,67 g) e hidróxido sódico acuoso 4N (14,8 ml) se calentó a 90ºC durante 3 h. La solución se extrajo con acetato de etilo. La capa acuosa se ajustó hasta pH ácido con ácido acético, se filtró y se secó dando el compuesto del título (2,3 g, 79,8%). ^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d6) δ 12,52 (1H, s), 8,88~8,90 (d, 1H), 8,34~8,38 (d, 1H), 7,97~7,99 (d,1H), 7,73~7,76 (d,1H), 7,50~7,54 (m, 1H), 3,85 (s, 2H). ES-MS m/z: 206,2 (M+1).

Intermedio 13: Ácido (7-metil-quinolin-6-il)-acético



Etapa 1: 6-Bromo-7-metil-quinolina

Se calentó suavemente una mezcla de 20 g de 4-bromo-3-metil-fenilamina, 6,6 g de sulfato ferroso, 40,8 g de propano-1,2,3-triol, 8,12 g de nitrobenceno y 23 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de la primera reacción vigorosa, la mezcla se calentó hasta reflujo durante 3h y a continuación se evaporó hasta retirar el nitrobenceno en exceso. A la solución se añadió $NaHCO_3$ saturado hasta pH 8 y la solución se filtró y se extrajo con diclorometano. Las capas de diclorometano se combinaron y se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El sólido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida dando un sólido amarillo que se lavó con éter de petróleo dando el compuesto del título (7,5 g, 65%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8,89 (m, 1H), 8,04 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,36 (m, 1H), 2,60 (s, 3H).

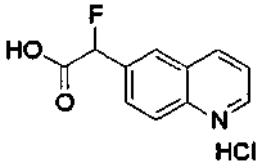
Etapa 2: Éster terc-butílico del ácido (7-metil-quinolin-6-il)-acético

A 1,02 g de 6-bromo-7-metil-quinolina se añadió una solución de 20 ml de acetato de bromuro de *terc*-butil-zinc y 0,58 g de $Pd(PPh_3)_4$. La mezcla se colocó en el reactor de microondas durante 30 min hasta alcanzar una temperatura de 120ºC (repetido durante 3 veces). La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida dio el compuesto del título (3,2 g, 68%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8,84 (m, 1H), 8,07 (m, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,31 (m, 1H), 3,72 (s, 2H), 2,51 (s, 3H), 1,46 (s, 9H).

Etapa 3: Ácido (7-metil-quinolin-6-il)-acético

Se calentaron 3,2 g de éster *terc*-butílico del ácido (7-metil-quinolin-6-il)-acético en 25 ml de NaOH acuoso (4N) hasta reflujo durante 4h. La mezcla se lavó con acetato de etilo y se añadió ácido clorhídrico concentrado hasta pH 7. Se formó un sólido, el cual se filtró y se secó dando el compuesto del título (1,5 g, 71,1%). ^{1}H-RMN (DMSO-d6, 300 MHz) δ 12,46 (s, 1H), 8,82 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,44 (m, 1H), 3,80 (s, 2H), 2,44 (s, 3H) ES-MS m/z: 202 (M^++H).

Intermedio 14: Clorhidrato del ácido fluoro-quinolin-6-il-acético



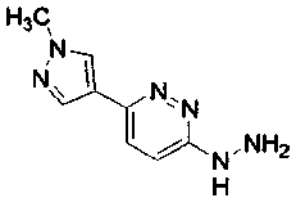
Etapa 1: Fluoro-quinolin-6-il-acetonitrilo

Una solución de quinolin-6-il-acetonitrilo (1,06 g, 6,3 mmol) en tetrahidrofurano (40 ml) se enfrió hasta -78ºC, a la cual se añadió *terc*-butil-litio (0,8 M en pentano, 7,6 mmol, 7,9 ml) gota a gota durante 10 minutos. Después de finalizada la adición, la mezcla se agitó a -78ºC durante 30 min antes de añadir una solución de N-fluorodi(benzenesulfonil)-amina (1,5 eq., 9,45 mmol, 3,0 g) en tetrahidrofurano (10 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a -78ºC antes de añadir agua seguido de $NaHCO_3$ acuoso. La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 80 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, hexano:acetato de etilo 100/0 - 50/50) dando el compuesto del título como un sólido rojo (520 mg, 2,8 mmol, 44%). ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO-d6) δ 6,05 (1H, d), 7,66 (1H, dd), 7,95 (1H, dd), 8,19 (1H, d), 8,32 (1H, t), 8,55 (1H, d), 9,03 (1H, dd); MS (m/z) 187 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Clorhidrato del ácido fluoro-quinolin-6-il-acético

Se absorbió fluoro-quinolin-6-il-acetonitrilo (370 mg, 2,0 mmol) en ácido clorhídrico concentrado (4 ml) y se calentó hasta 145ºC durante 8 min en un microondas. Pasado este tiempo la mezcla se concentró *in vacuo* dando el compuesto del título como un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo. ^{1}H-RMN 500 MHz (D_2O) δ 6,05 (1H, d), 7,99-6,93 (1H, m), 8,14-8,05 (2H, m), 8,26 (1H, s), 9,05-8,95 (2H, m). MS (m/z) 204 $[M-H^+]^-$.

Intermedio 15: [6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-piridazin-3-il]-hidrazina



Etapa 1 Método 1.1: 3-Cloro-6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-piridazina

Una mezcla de 3,6-dicloropiridazina (5,37 g, 33,5 mmol),éster pinacólico del ácido 1-metil-4-pirazolborónico (5 g, 24,0 mmol) y carbonato de cesio (23,44 g, 72 mmol) en 1,4-dioxano (150 ml) y agua (750 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se desgasificó burbujeando nitrógeno durante 15 min. A continuación se añadió el aducto cloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (1 g, 1,37 mmol) y se hizo burbujear nitrógeno en la muestra durante otros 10 min. La mezcla de reacción se agitó a 80˚C durante 2,5 h, a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró *in vacuo.* El residuo se repartió entre carbonato potásico acuoso 1 N y acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con carbonato potásico acuoso 1 N y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se absorbió a continuación sobre gel de sílice para su purificación. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de 0-50% acetato de etilo/hexano dio 2,8 g del compuesto del título como un sólido blanco (rendimiento 60%); MS (m/z) 195 $[M+H^+]^+$.

Paso 1 Método 1.2: 3-Cloro-6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-piridazina

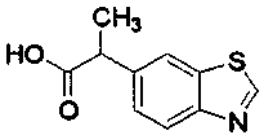
Una mezcla de 3,6-dicloropiridazina (20,1 g, 135 mmol), éster pinacólico del ácido 1-metil-4-pirazolborónico (25,46 g, 122 mmol) y carbonato potásico (50,7 g, 367 mmol) en 1,4-dioxano (500 ml) y agua (200 ml) se desgasificó bajo atmósfera de nitrógeno haciendo burbujear nitrógeno durante 15 min. A continuación se añadió diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (1,2%, 1 g, 1,4 mmol) y se hizo burbujear nitrógeno a través de la muestra durante otros 10 min. La mezcla de reacción se agitó a 90ºC durante 3 h, a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró *in vacuo* para eliminar la mayoría del 1,4-dioxano. El residuo se repartió entre carbonato potásico acuoso 1 N (400 ml) y acetato de etilo (400 ml) y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 300 ml) y diclorometano (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron in vacuo. El residuo se agitó en éter dietílico (150 ml) y el

precipitado naranja se filtró y se secó dando el compuesto del título (12,76 g, 65,6 mmol, rendimiento 54%). El filtrado se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de 0-50% acetato de etilo/hexano dando 3,6-dicloropiridazina como un sólido blanco (9,9 g, 66,4 mmol, rendimiento 49%).

Etapa 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 (1,0 g, 4,81 mmol) en etanol (20 ml) se añadió hidrazina monohidrato (2,33 ml, 48 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80ºC durante 3,5 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró *in vacuo.* El residuo se trituró con carbonato potásico acuoso 1 N triturado, se filtró, se lavó con agua y se secó *in vacuo* dando 2 g del compuesto del título como un sólido beige (670 mg, rendimiento 73%): ^{1}H-RMN (DMSO-*d6*) δ 3,92 (s, 3H), 4,28 (s, 1H) 7,02 (d, 1H), 7,59 (d, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,19 (d, 1H); MS (m/z) 191$[M+H^+]^+$.

Intermedio 16: Ácido 2-benzotiazol-6-il-propiónico



Etapa 1: Éster metílico del ácido benzotiazol-6-il-acético

Se añadió $SOCl_2$ (13,5 g, 114,0 mmol) gota a gota a una solución agitada de ácido benzotiazol-6-il-acético (20,0 g, 103,6 mmol) en 150 ml de metanol a 0ºC bajo atmósfera de N_2. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente el disolvente se evaporó y el residuo se diluyó con acetato de etilo (150 ml). La mezcla se lavó con solución saturada de carbonato sódico (100 ml x 3) y salmuera (100 ml) y a continuación se concentró in vacuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna eluyendo con acetato de etilo/éter de petróleo (1:5) dando el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (15,0 g, 71,5%).

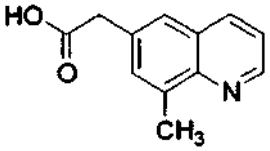
Etapa etapa2: Éster metílico del ácido 2-benzotiazol-6-il-propiónico

Se añadió una solución de n-BuLi (2,5M en hexano, 27,0 ml) a una solución agitada de diisopropilamina (7,08 g, 70,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (150 ml) enfriada a – 30ºC bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta -78ºC. A esta solución se añadió una solución de éster metílico del ácido benzotiazol-6-il-acético (10,4 g, 50,0 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano y hexametilfosforamida (13,5 g, 75,0 mmol). La mezcla se agitó at -78ºC durante 2 horas antes de la adición de una solución de yoduro de metilo (10,2 g, 72,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro at -78ºC. La mezcla se agitó durante otras 2 horas at -78ºC. La mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se diluyó con una solución saturada acuosa de NH_4Cl (200 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (x2) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron dando un aceite marrón. Este aceite se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con éter de petróleo y acetato de etilo (10:1) dando el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (4,5 g, 40,5%).

Etapa 5: Ácido 2-benzotiazol-6-il-propiónico

Una mezcla de éster metílico del ácido 2-benzotiazol-6-il-propiónico (6,6 g, 30,0 mmol) y NaOH 2N acuoso (23,0 ml) se calentó a reflujo durante 1 hora hasta que la mezcla de reacción se convirtió en una solución de color rojo oscuro. La mezcla se enfrió a continuación hasta temperatura ambiente y la mezcla se extrajo con diclorometano (x2) y la capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 4-5. El sólido resultante se filtró dando el producto bruto, el cual se agitó en acetato de etilo, se filtró y se secó *in vacuo* dando el compuesto del título (4,3 g, 69,2%) como un sólido blanco. (300 MHz, DMSO-d6): δ 12,41 (s,1H), 9,35 (s, 1H), 8,09-8,08 (d, J=1,5 Hz 2H), 8,05-8,02 (d, J=8,7 Hz, 2H), 7,48~7,45 (dd, J=1,5 Hz, 8,7 Hz, 1H), 3,89 (c, 1H), 1,45 (d, 3H). MS m/z 208 (M^++1).

Intermedio 17: Ácido (8-metil-quinolin-6-il)-acético



Paso 1: 6-Bromo-8-Metil-quinolina

Se calentó suavemente una mezcla de 10 g de 4-bromo-2-metilanilina, 3,3 g de sulfato ferroso, 20,4 g de glicerol, 4,06 g de nitrobenceno y 11,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de la primera reacción vigorosa, la mezcla se hirvió durante 3h a reflujo y después se evaporó para eliminar el nitrobenceno. A la solución se añadió $NaHCO_3$ ac. sat. y se extrajo con diclorometano, se secó con Na_2SO_4 y se concentró dando un sólido. El sólido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida dando el compuesto del título (9,5 g, 80%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8,92 (m, 1H), 8,01 (m, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 2,79 (s, 3H).

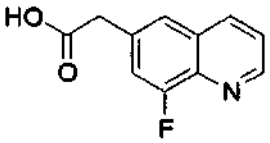
Etapa 2: Éster *terc*-butílico del ácido (8-metil-quinolin-6-il)-acético

Bajo una atmósfera de N_2, se añadieron 20 ml de tetrahidrofurano y 0,5 ml (3,9 mmol) de clorotrimetilsilano a (5,2 g, 80 mmol) de polvo de zinc. La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. Se añadió gota a gota una solución de (5,9 ml, 40 mmol) de 2-bromoacetato de *terc*-butilo en 50 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se agitó a 42ºC-45ºC durante 20 min. Esta se dejó enfriar hasta 25ºC obteniéndose 76 ml de una solución 0,52 M del reactivo terc-butil reformatsky. A 1,039 g de 6-bromo-8-metil-quinolina se añadió una solución del reactivo de Reformatsky previamente preparado 20 ml, seguido de la adición de 0,541 g de $Pd(PPh_3)_4$. La mezcla se colocó en el reactor de microondas durante 30 min hasta alcanzar una temperatura de 120ºC. El procedimiento anterior se repitió durante 4 veces más. Las mezclas de reacción combinadas se combinaron y se purificaron mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (3,5 g, 49%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8,92 (m, 1H), 8,11 (m, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 3,67 (s, 2H), 2,81 (s, 3H), 1,46 (s, 9H).

Etapa 3: Ácido (8-metil-quinolin-6-il)-acético

Se calentaron hasta reflujo 3,5 g de éster *terc*-butílico del ácido (8-metil-quinolin-6-il)-acético en 18 ml de NaOH (4N, ac.) durante 3h. La mezcla se lavó con acetato de etilo y la capa de agua se acidificó con ácido clorhídrico 1N hasta pH 4-5 y se extrajo con diclorometano. El disolvente se evaporó y el sólido resultante se lavó con agua y se secó *in vacuo* dando el compuesto del título como un sólido blanco (1,3 g, 48%). ^{1}H-RMN (DMSO-d6, 300 MHz) δ 12,42 (s, 1H), 8,90 (m, 1H), 8,30 (m, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,54 (m, 2H), 3,74 (s, 2H), 2,70 (s, 3H).

Intermedio 18: Ácido (8-fluoro-quinolin-6-il)-acético



Etapa 1: 6-Bromo-8-fluoro-quinolina

Se calentó suavemente una mezcla de 4-bromo-2-fluoroanilina (12,825 g, 67,5 mmol), 4,275 g de sulfato ferroso, 25,46 g (20,2 ml) de glicerol, 5,067 g (4,2 ml) de nitrobenceno y 11,79 ml de ácido sulfúrico. Después de la primera reacción vigorosa, la mezcla se hirvió durante 7 horas. El nitrobenceno se eliminó *in vacuo*. Se añadió agua. La solución acuosa se acidificó con ácido acético glacial y el precipitado marrón oscuro precipitado separado, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo=12/1) dando el compuesto del título como un sólido blanco (9,72 g, 63,7%).

Etapa 2: Éster *terc*-butílico del ácido (8-fluoro-quinolin-6-il)-acético

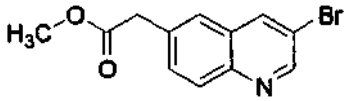
Bajo una atmósfera de N_2, se añadieron 20 ml de tetrahidrofurano y 0,5 ml (3,9 mmol) de clorotrimetilsilano a 5,2 g (80 mmol) de polvo de zinc. La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. Se añadió gota a gota una solución de 5,9 ml (40 mmol) de 2-bromoacetato de *terc*-butilo en 50 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se agitó a 42ºC-45ºC durante 20 min. Esta se dejó enfriar hasta 25ºC obteniéndose 76 ml de una solución 0,52 M del reactivo *terc*-butil reformatsky. A una solución de 6-bromo-8-fluoro-quinolina (1,04 g, 4,6 mmol) en 1 ml d tetrahidrofurano se añadió una solución del reactivo de zinc anterior (20 ml, 10,4 mmol), seguido de $Pd(PPh_3)_4$ (0,58 g, 0,5 mmol). La mezcla se colocó en un reactor de microondas durante 35 min hasta alcanzar una temperatura de 120ºC. A continuación, la reacción se neutralizó con NH_4Cl ac. sat. (60 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (0,78 g, 65%).

Etapa 3: Ácido (8-fluoro-quinolin-6-il)-acético

Se calentaron 0,5 g del éster *terc*-butílico (8-fluoro-quinolin-6-il)-acético con 2,0 ml de una solución de hidróxido sódico acuoso 4N aq. a 90ºC durante 3 h. Después de enfriar la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa acuosa se acidificó con ácido acético, se filtró dando el compuesto del título como un sólido blanco (0,24 g, 61%). ^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d6) δ 8,91~8,93 (m, 1H), 8,37~8,40 (m, 1H), 7,51~7,69 (m, 3H), 3,80 (s, 2H); ES-

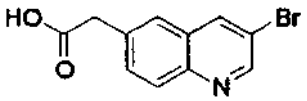
MS m/z: 206,2 (M^++1).

Intermedio 19: Éster metílico del ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético



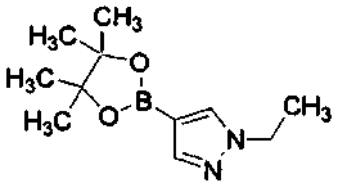
A una solución agitada de ácido quinolin-6-il-acético (Etapa 1, Intermedio 11) (21,6 g, 107 mmol) en 150 ml de tetracloruro de carbono se añadió bromo (34,4 g, 215 mmol) y se calentó hasta reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó a continuación con 17,0 g de piridina y se agitó 2 horas a reflujo. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se dividió entre diclorometano e hidrógenocarbonato sódico acuoso saturado. La capa orgánica se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico y después se evaporó a presión reducida dando un residuo marrón. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con éter de petróleo (60~90˚C) y después un disolvente combinado 30/1 de éter de petróleo y acetato de etilo dando el compuesto del título (13,6 g, 45,3%) como un sólido cristalino blanco. (300 MHz, DMSO-d6): 8,89 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,67~7,64 (m, 2H), 3,82(s, 2H), 3,72(s, 3H). ES-MS m/z: 280 ($M+H^+$). 360 ($M+H^+$).

Intermedio 20: Ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético



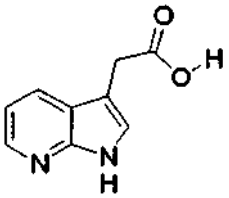
Una mezcla de éster metílico del ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético (14,8 g, 52,8 mmol) y NaOH acuoso 2 N (80 ml, 160 mmol) se calentó a reflujo durante 1,5 horas hasta que la mezcla de reacción pasó a ser transparente. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lavó con diclorometano, a continuación la capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 4. Se filtró un precipitado blanco de la reacción agitada en metanol a reflujo, se filtró y se secó *in vacuo* dando el compuesto del título como un sólido blanco (10,3 g, 73,5%). (300 MHz, DMSO-d6): 12,52 (a, 1H), 8,91 (d, 1H), 8,69 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 7,82~7,70 (m, 2H), 3,80 (s, 2H). ES-MS m/z: 266 ($M+H^+$).

Intermedio 21: 1-Etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol



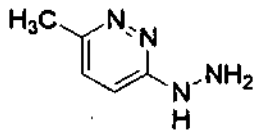
Preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en Journal of Heterocyclic Chemistry, (2004), 41(6), 931-939,

Intermedio 22: Ácido (1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-acético



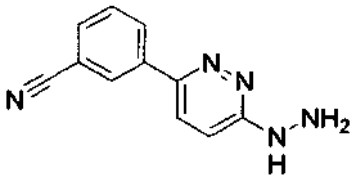
Preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en Journal of the American Chemical Society (1956), 78 1247-51.

Intermedio 23: (6-Metil-piridazin-3-il)-hidrazina



Preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en Australian Journal of Chemistry (1977), 30(10), 2319-22.

Intermedio 24: 3-(6-Hidrazin-piridazin-3-il)-benzonitrilo



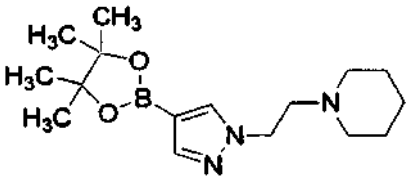
Etapa 1: 3-(6-Cloro-piridazin-3-il)-benzonitrilo

Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de ácido 3-cianofenil borónico (90,0 g, 612 mmol), 3,6-dicloro-piridazina (1,2 eq, 109,4 g, 735 mmol), carbonato potásico (3,0 eq, 253,5 g, 1,836 ml) en 1,4-dioxano (900 ml) y agua (360 ml) durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añadió el aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (0,06 eq, 26,8 g, 36,7 mmol). Se burbujeó nitrógeno durante otros 10 minutos y después la mezcla se calentó hasta 90ºC durante 3 horas. La reacción se enfrió y la mayor parte del 1,4-dioxano se eliminó in vacuo. La mezcla se absorbió en diclorometano y se lavó con agua tres veces. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (60 g, rendimiento 45,5%) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d6): δ 8,58~8,59 (m, 1H), 8,44~8,52 (m, 2H), 8,09~8,12 (d,1H), 8,02~8,05 (d,1H), 7,76~7,81 (m, 1H); MS(m/z) 216,1 (M^++1).

Etapa 2: 3-(6-Hidrazin-piridazin-3-il)-benzonitrilo

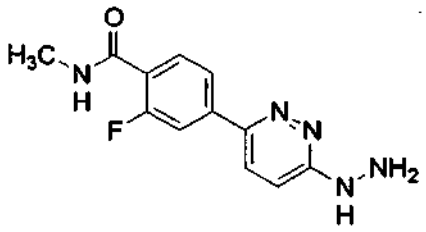
Una solución de 3-(6-cloro-piridazin-3-il)-benzonitrilo (75,6 g, 350 mmol) en 900 ml de piridina desecada se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 119,2 ml de hidrazina hidrato. Se continuó enfriando, manteniendo la temperatura por debajo de 30ºC, momento en el cual se separaron unas agujas amarillas. La mezcla se calentó a continuación hasta 65ºC y se agitó durante la noche. A continuación la mezcla se concentró y el residuo se lavó con agua y metanol dando el compuesto del título (60 g, 81%) como un sólido amarillo. ^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d6): δ 8,38~8,39 (m, 1H), 8,32~8,35 (m, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,97~8,00 (d,1H), 7,82~7,85 (m, 1H), 7,64~7,69 (m, 1H), 7,09~7,12 (d, 1H), 4,39 (s, 2H); MS(m/z) 212,1[M^++1].

Intermedio 25: 1-{2-[4-(4,4,5,5-Tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-pirazol-1-il]-etil}-piperidina



A un vial de microondas de 5 ml se añadieron 2 ml de dimetilformamida para disolver 150 mg (0,773 mmol) de 4-(4,4,5,5-Tetrametil-[1,2,3]dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol. Después de la adición de 2 eq. (1,546 mmol) de 1-(2-cloro-etil)-piperidina. La mezcla de reacción se calentó a 190ºC en un microondas (Personel Chemistry, Emrys Optimizer) durante una hora. A continuación se añadió agua (5 ml) a la mezcla de reacción y se extrajo con acetato de etilo (2 x 3 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secó sobre sulfato sódico. El disolvente se eliminó *in vacuo* dando el compuesto del título el cual se usó en el siguiente etapa sin purificación adicional.

Intermedio 26: 2-Fluoro-4-(6-hidrazin-piridazin-3-il)-N-metil-benzamida



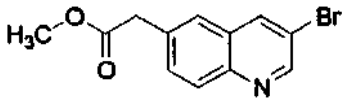
Etapa 1: 4-(6-Cloro-piridazin-3-il)-2-fluoro-N-metil-benzamida

Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de 2-fluoro-N-metil-benzamida del ácido 4-borónico (50 g, 254 mmol), 3,6-dicloropiridazina (1,02 eq, 38,6 g, 259 mmol), carbonato potásico (3,0 eq, 105,2 g ,761 mmol) en 1,4-dioxano (500 ml) y agua (200 ml) durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añadió el aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (0,06 eq, 15,0 mmol, 11,0 g). Se burbujeó nitrógeno durante otros 10 minutos, a continuación la mezcla se calentó hasta 90ºC durante 3 horas. Se enfrió y la mayor parte del dioxano se eliminó in vacuo. La mezcla se absorbió en diclorometano y se lavó con agua tres veces. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (27,1 g rendimiento 40%) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): δ 8,24~8,30 (m, 1H), 7,96~8,01 (m, 1H), 7,83~7,87 (m,2H), 7,61~7,64 (d,1H), 6,80~6,84 (m,1H), 3,06~3,08 (m, 3H); MS(m/z): 266,1[M^++1]

Etapa 2: 2-Fluoro-4-(6-hidrazin-piridazin-3-il)-N-metil-benzamida

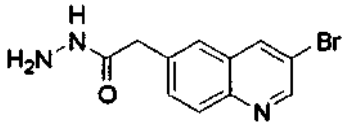
Una solución de 4-(6-cloro-piridazin-3-il)-2-fluoro-N-metil-benzamida 34 g (128 mmol) en 500 ml de piridina seca se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 43,5 ml de hidrazina hidrato. El enfriamiento se continuó manteniendo la temperatura por debajo de los 30ºC, momento en el que se separaron agujas amarillos. La mezcla se calentó a continuación hasta 65ºC y se agitó durante la noche. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con agua y metanol dando el compuesto del título (28,8 g, rendimiento 84%) como un sólido amarillo claro. ^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d6): δ (ppm): 8,27 (s, 2H), 7,96~7,99 (d, 1H), 7,86~7,92 (m, 2H), 7,69~7,75 (m, 1H), 7,09~7,12 (d, 1H), 4,42 (s, 2H), 2,78~2,80 (d, 3H); MS(m/z): 262,1[M^++1].

Intermedio 27: Éster metílico del ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético



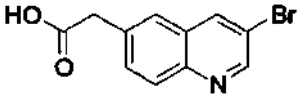
A una solución agitada de ácido quinolin-6-il-acético (21,6 g, 107 mmol) en 150 ml de tetracloruro de carbono se añadió bromo (34,4 g, 215 mmol) y se calentó hasta reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó a continuación con 17,0 g de piridina y se agitó durante 2 horas a reflujo. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se dividió entre diclorometano e hidrógenocarbonato acuoso saturado. La capa orgánica se lavó con agua y después salmuera, se secó sobre sulfato magnésico, después se evaporó a presión reducida dando un residuo marrón. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con éter de petróleo (60~90˚C) y a continuación una mezcla 30/1 de disolventes de éter de petróleo y acetato de etilo dando el compuesto del título (13,6 g, 45%) como un sólido cristalino blanco. (300MHz, DMSO-d6): 8,89 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,67~7,64 (m, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,72 (s, 3H). ES-MS m/z: 280 ($M+H^+$).

Intermedio 28: Hidrazida del ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético



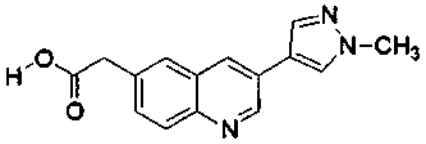
A una mezcla de ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético (5 g, 18,9 mmol) en metanol (100 ml) se añadió ácido sulfúrico concentrado (1 ml) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 16 horas. El calor se eliminó y se añadió sulfato sódico (20 g) y la mezcla se filtró. Al filtrado se añadió a continuación hidrazina monohidrato (3,2 ml) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante otras 16 horas. La mezcla se dejó a continuación alcanzar la temperatura ambiente y a continuación se añadió agua (60 ml) y el precipitado formado se recogió por filtración y se secó dando el compuesto del título como un sólido blanco (4,72 g, 16,9 mmol, rendimiento 90%). ^{1}H-NMR 500 MHz (DMSO-d6) 3,57 (2H, s), 4,26 (2H, d), 7,72 (1H, dd), 7,80 (1H, d), 7,97 (1H, d), 8,69 (1H, d), 8,90 (1H, d), 9,35 (1H, bs). ES-MS m/z: 280 ($M+H^+$).

Intermedio 29: Ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético



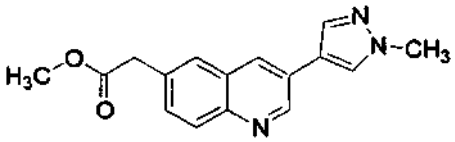
Una mezcla de éster metílico del ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético (14,8 g, 52,8 mmol) y NaO 2 N acuoso (80 ml, 160 mmol) se calentó a reflujo durante 1,5 horas hasta que la mezcla de reacción se volvió transparente. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lavó con diclorometano y a continuación la capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 4. Se filtró un precipitado blanco de la reacción agitada en metanol a reflujo, se filtró y se secó *in vacuo* dando el compuesto del título como un sólido blanco (10,3 g, 74%). (300 MHz, DMSO-d6): 12,52 (a, 1H), 8,91 (d, 1H), 8,69 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 7,82~7,70 (m, 2H), 3,80 (s, 2H). ES-MS m/z: 266 ($M+H^+$).

Intermedio 30: Ácido [3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



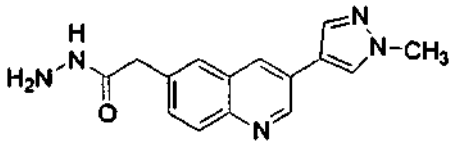
A un vial de microondas de 20 ml se añadió ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético (1 g, 3,77 mmol), éster pinacólico del ácido 1-metil-4-pirazolborónico y 1,4-dioxano (10 ml). Se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla durante 10 minutos. A continuación se añadió carbonato potásico (1,56 g, 11,3 mmol) y agua (5 ml) y se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla durante tres minutos más. Pasado este tiempo se añadió diclorobis(trifenilfosfina)paladio (138 mg, 0,19 mmol), el vial se selló y se calentó en un microondas durante 1250 segundos a 130ºC. La mezcla se filtró a continuación a través de celite, la cual se lavó con agua y bicarbonato sódico acuoso saturado. El 1,4-dioxano en la solución se eliminó *in vacuo* y la solución acuosa restante se lavó con diclorometano tres veces. La capa acuosa se acidificó hasta pH 6 usando ácido clorhídrico 4M y el precipitado formado se recogió por filtración y se secó dando el compuesto del título como un sólido blanco. (500 MHz, DMSO-d6): ES-MS m/z: 268 ($M+H^+$).

Intermedio 31: Éster metílico del ácido [3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



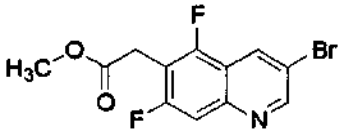
A una solución de ácido [3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (2,4 g, 8,6 mmol) y metanol (12 ml) a 0ºC se añadió gota a gota cloruro de tionilo (2 eq., 17,2 mmol). La mezcla de reacción se calentó a continuación hasta 60ºC durante una hora. El disolvente se eliminó in vacuo y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. MS m/z: 282 ($M+H^+$).

Intermedio 32: Hidrazida del ácido [3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



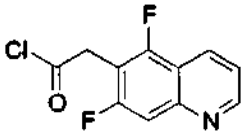
Una solución de éster metílico del ácido [3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (8,6 mmol) e hidrazina (80,6 mmol) en metanol (75 ml) se calentó a 55ºC durante una hora antes de una segunda adición de hidrazina (80,6 mmol) y la reacción se calentó hasta 55ºC durante 16 horas más. Pasado este tiempo la mezcla se enfrió hasta 0ºC y el precipitado resultante se recogió mediante filtración y se lavó con metanol frío y se secó dando el compuesto del título como un sólido blanco (1,74g, 70%). ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO-d6): ES-MS m/z: 282 ($M+H^+$).

Intermedio 33: Éster metílico del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético



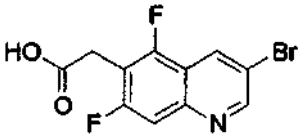
A una solución de ácido (5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético (18,6 g, 83,4 mmol) en metanol (200 ml) se añadió H_2SO_4 conc. (4,7 ml, 87,0 mmol). La mezcla de reacción se concentró dando un residuo marrón, el cual se diluyó con 200 ml de acetato de etilo, se lavó con. $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, a continuación la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró dando éster metílico del ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético como un sólido amarillo (17,7 g, rendimiento: 89,8%).

Intermedio 34: Cloruro de (5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acetilo:



Se añadió ácido (5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético (1 g, 4,48 mmol) a un matraz de fondo redondo secado en horno y se suspendió en diclorometano (18 ml). La suspensión se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió hasta 0ºC. A continuación se añadió lentamente el cloruro de oxalilo (470 µl, 5,38 mmol), seguido de una cantidad catalítica de dimetilformamida. La solución se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 2 horas. La solución se concentró a continuación *in vacuo* y se secó mediante destilación azeotrópica con tolueno dando el compuesto del título. ES-MS m/z: 238 ($M+H^+$) del éster metílico.

Intermedio 35: Ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético



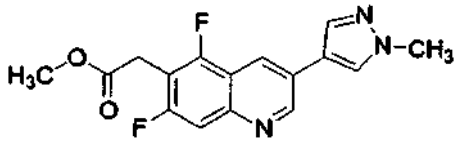
Etapa 1: Preparación del éster metílico del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético

A una mezcla del éster metílico del ácido (5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético (35,3 g, 148,9 mmol) y piridina (24 ml, 298 mmol) en 300 ml de tetracloruro de carbono se añadió gota a gota bromo (15,3 ml, 298 mmol). La mezcla se calentó hasta reflujo durante 2 horas antes de enfriar hasta temperatura ambiente. El líquido en el matraz se decantó y se lavó con $NaHCO_3$ y agua. El sólido oscuro en el fondo del matraz se trató con $NaHCO_3$ y diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron lavó con agua, se secaron (Na_2SO_4) y se evaporaron hasta sequedad. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (40/1~3/1) dando 31,5 g (rendimiento 67%) del compuesto del título como un sólido cristalino blanco. ^{1}H-RMN (DMSO-d6): δ 8,92 (d, 1H), 8,50 (d, 1H), 7,57~7,61 (m, 1H), 3,91 (s, 2H), 3,75 (s, 3H).

Etapa 2: Preparación del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético

Una suspensión de éster metílico del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético (10,0 g, 31,6 mmol) en 48 ml de NaOH (2N) acuoso se calentó hasta reflujo durante 2 horas, a continuación se enfrió hasta t.a. La mezcla se lavó con diclorometano (50 ml x 2) y la fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 5N hasta pH 4. El precipitado blanco se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó. Se obtuvieron 9,6 g del compuesto del título como un polvo blanco con un rendimiento del 100%. ^{1}H-RMN (DMSO-d6): δ 12,87 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 7,75~7,79 (d, 1H), 3,87 (s, 2H). LC-MS: 303 (M^++1).

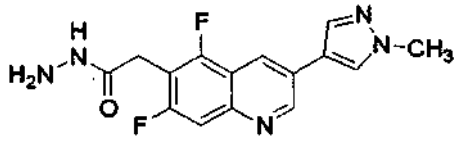
Intermedio 36: Éster metílico del ácido [5,7-difluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



A un vial de microondas de 20 ml se añadieron éster metílico del ácido (3-bromo-2,4-difluoro-quinolin-6-il)-acético (1g, 3,16 mmol), 1-Metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,2 eq. 3,79 mmol, 788 mg) y 1,4-dioxano (10 ml). Se hizo burbujear nitrógeno a través de una aguja y a continuación se añadió carbonato potásico (3 eq. 9,49 mmol) y agua (5 ml) y se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla durante 3 minutos. Se añadió diclorobis(trifenilfosfina)-paladio (138 mg, 0,19 mmol) y la mezcla se calentó durante 1250 segundos a 130ºC. La mezcla se filtró a través de celite y se lavó con agua y bicarbonato sódico acuoso saturado. El 1,4-dioxano se eliminó *in vacuo* y la capa acuosa se extrajo con diclorometano tres veces. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó *in vacuo*.

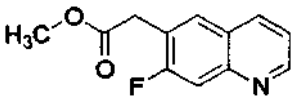
La sustancia bruta se cargó en sílice y después se purificó utilizando un gradiente de diclorometano, metanol (metanol 0 a 10%), obteniéndose 508 mg del material amarillo claro con un rendimiento del 50%. MS: *m/z* 318,0 ($M+H^+$).

Intermedio 37: Hidrazida del ácido [5,7-difluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



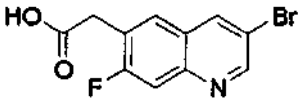
A un vial de 40 ml se añadió metanol (12 ml), éster metílico del ácido [5,7-difluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (508 mg, 1,6 mmol) e hidrazina anhidra (4 eq., 6,4 mmol). Después de 1 hora a 55ºC se añadió una segunda porción de hidrazina (4 eq., 6,4 mmol) y la reacción se calentó a 55ºC durante otra hora más. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtró y se lavó con metanol frío. El producto se secó dando el compuesto del título como un sólido blanco (425 mg, rendimiento 83%). MS: *m/z* 318,0 ($M+H^+$).

Intermedio 38: Éster metílico del ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético



A una solución de ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético (13,4 g, 65,36 mmol) en metanol (140 ml), se añadió H_2SO_4 conc. (3,5 ml, 68,63 mmol). La mezcla de reacción se concentró dando un residuo marrón, el cual se diluyó con 100 ml de acetato de etilo, se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, a continuación la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró dando éster metílico del ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético como un sólido amarillo (14,0 g, rendimiento: 98%).

Intermedio 39: Ácido (3-bromo-7-fluoro-quinolin-6-il)-acético



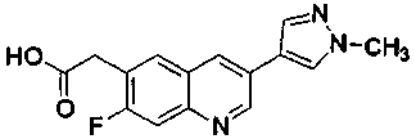
Etapa 1: Preparación del éster metílico del ácido (3-bromo-7-fluoro-quinolin-6-il)-acético

A una mezcla de éster metílico del ácido (7-fluoro-quinolin-6-il)-acético (14,0 g, 63,9 mmol) y piridina (10,4 ml, 127,8 mmol) en 200 ml de tetracloruro de carbono se añadió gota a gota bromo (6,6 ml, 127,8 mmol). La mezcla se calentó hasta reflujo durante 2 horas antes de enfriarla hasta temperatura ambiente. El líquido del matraz se decantó y se lavó con $NaHCO_3$ y agua. El sólido oscuro del fondo del matraz se trató con $NaHCO_3$ y diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron (Na_2SO_4) y se evaporó hasta sequedad. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (40/1~3/1) dando 13,9 g (rendimiento 75%) del compuesto del título como un sólido cristalino blanco. ^{1}H-RMN (DMSO-d6): δ 8,89 (s, 1H), 8,27 (m, 1H), 7,66~7,74 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,74 (s, 3H).

Etapa 2: Preparación del ácido (3-bromo-7-fluoro-quinolin-6-il)-acético.

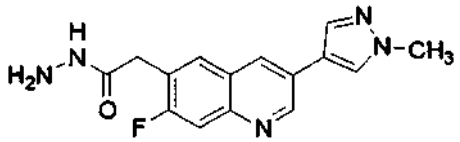
Una suspensión de éster metílico del ácido (3-bromo-7-fluoro-quinolin-6-il)-acético (13,9 g, 46,6 mmol) en 72 ml de NaOH (2N) acuoso se calentó hasta reflujo durante 2 horas, a continuación se enfrió hasta t.a. La mezcla se lavó con diclorometano (50 ml x 2) y la fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 5N hasta pH 4. El precipitado blanco se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó. Se obtuvieron 11,0 g del compuesto del título como polvo blanco con un rendimiento del 83,3%. ^{1}H-RMN(DMSO-d6): δ 12,64 (s, 1H), 8,94~8,95 (d, 1H), 8,72~8,72 (m, 1H), 7,94~7,97 (d, 1H), 7,77~7,81 (d, 1H), 3,85 (s, 2H). LC-MS: 283,9 (M^++1).

Intermedio 40: Ácido [7-fluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



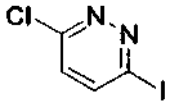
Se burbujeó nitrógeno a través de una suspensión de ácido (3-bromo-7-fluoro-quinolin-6-il)-acético (5 g, 17,7 mmol), éster pinacólico del ácido 1-metil-4-pirazolborónico (3,86 g, 18,6 mmol), carbonato potásico (7,3 g, 53 mmol) en 1,4-dioxano (50 ml) y agua (20 ml) durante 10 minutos. Pasado este tiempo se añadió diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (248 mg, 0,35 mmol) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 3 horas. La fase acuosa se eliminó con una pipeta, se diluyó con carbonato potásico 2N acuoso (15 ml) y se lavó con acetato de etilo (2 x 30 ml). La fase acuosa se acidificó seguidamente hasta pH 3 con ácido clorhídrico concentrado. El precipitado formado se recogió mediante filtración y se lavó con agua y se secó dando el compuesto del título como un sólido blanco (4,2 g, 14,7 mmol, rendimiento 83%). ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO-d6): δ 3,84 (2H, s), 3,92 (3H, s), 7,71 (1H, d), 7,90 (1H, d), 8,10 (1H, s), 8,39 (1H, s), 8,47 (1H, d), 9,18 (1H, d). ES-MS m/z: 286 ($M+H^+$).

Intermedio 41: Hidrazida del ácido [7-fluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético



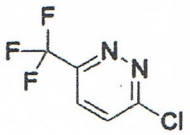
A una mezcla de ácido [7-fluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (4 g, 14,0 mmol) en metanol (80 ml) se añadió ácido sulfúrico concentrado (0,8 ml) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 16 horas. El calor se retiró y se añadió sulfato sódico (20 g) y se filtró la mezcla. Al filtrado se añadió hidrazina monohidrato (3,2 ml) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante otras 16 horas. La mezcla se dejó a continuación enfriar hasta temperatura ambiente y a continuación se añadió agua (60 ml) y el precipitado formado se recogió por filtración y se secó dando el compuesto del título como un sólido gris claro (3,51 g, 11,7 mmol, rendimiento 84%). ^{1}H-NMR 500 MHz (DMSO-d6) 3,63 (2H, s), 3,91 (3H, s), 4,28 (2H, d), 7,69 (1H, d), 7,88 (1H, d), 8,09 (1H, s), 8,38 (1H, s), 8,47 (1H, d), 9,16 (1H, d), 9,32 (1H, bs). ES-MS m/z: 300 ($M+H^{+}$).

Intermedio 42: 3-Cloro-6-yodo-piridazina



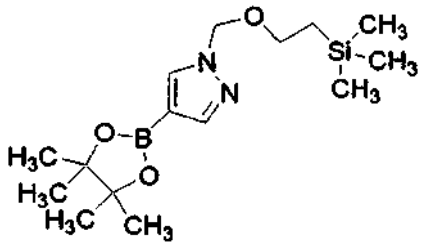
A un vial de a 40 ml se añadieron 2,5 g de 3,6-dicloropiridazina (16,9 mmol), seguido de 12,5 ml de ácido clorhídrico y 37,5 g de yoduro potásico. La mezcla de reacción se calentó hasta 40ºC durante tres horas, a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en hielo que contenía NaOH 10M y el precipitado formado se recogió por filtración y se secó dando el compuesto del título (2,36g, 60%). MS: *m/z* 340,9

Intermedio 43: 3-Cloro-6-trifluorometil-piridazina



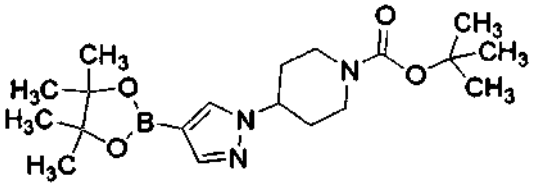
En un matraz de fondo redondo de 200 ml se mezcló un gramo (4,16 mmol) de 3-cloro-6-iodo-piridazina bajo atmósfera de nitrógeno con 1,5 eq. de yoduro cuproso (6,24 mmol), 2 eq. (8,32 mmol) de fluoruro potásico y 2eq. (8,32 mmol) de metil-dicloro-fluoro-acetato en 75 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción se calentó hasta 115°C durante 16 horas. El disolvente se eliminó *in vacuo* y el sólido se repartió entre diclorometano y agua (150 ml). La emulsión formada se filtró a través de celite y la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se cargó sobre gel de sílice y se purificó sobre gel de sílice eluyendo con 0% acetato de etilo hasta 50% de acetato de etilo en hexanos dando el compuesto del título (150 mg, 20%) MS: *m/z* 183,1.

Intermedio 44: 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol



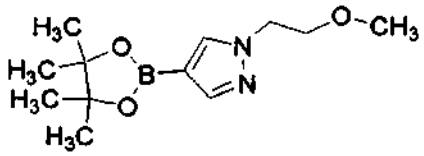
El compuesto del título se preparó mediante el método descrito por Guzi, Timothy J.; Paruch, Kamil; Dwyer, Michael P.; Labroli, Marc; Keertikar, Kartik M. Preparation of novel pyrazolopyrimidines as cyclin dependent kinase inhibitors. U.S. Pat. Appl. Publ. (2007), 144 pp., US2007072881 sin hacer cambios críticos.

Intermedio 45 : És ter *terc*-butílico del ácido 4-[4-(4,4,5, 5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-pirazol-1-il]-piperidin-1-carboxílico



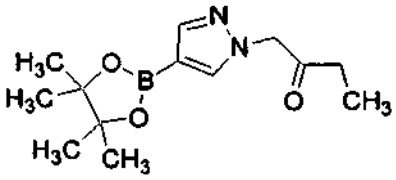
El compuesto del título se preparó mediante el método descrito por Cui, Jingrong Jean; Funk, Lee Andrew; Jia, Lei; Kung, Pei-Pei; Meng, Jerry Jialun; Nambu, Mitchell David; Pairish, Mason Alan; Shen, Hong; Tran-Dube, Michelle Bich. Preparation of pyrazole-substituted aminoheteroaryl compounds as c-Met protein kinase inhibitors for use against cancer and other abnormal cell growth disorders. PCT Int. Appl. (2006), 185 pp. WO2006021881, sin hacer cambios críticos.

Intermedio 46: 1-(2-metoxietill)-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol



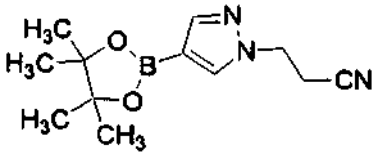
El compuesto del título se preparó mediante el método descrito por Ivachtchenko, Alexandre V ; Kravchenko, Dmitry V.; Zheludeva, Valentina I.; Pershin, Dmitry G. Synthesis of pinacol esters of 1-alkyl-1H-pyrazol-5-yl- and 1-alkyl-1H-pyrazol-4-ylboronic acids. Journal of Heterocyclic Chemistry (2004), 41(6), 931-939, sin hacer cambios críticos.

Intermedio 47: 1-[4-(4,4,5-trimetil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-pirazol-1-il]-butan-2-ona



Se disolvió éster pinacólico del ácido pirazol-4-borónico (1 g, 1 equiv, 5,15 mmol) en dimetilformamida (15 ml) seguido de la adición de Cs_2CO_3 (0,86 g, 1,5 equiv, 7,73 mmol) y 1-bromo-2-butanona (1,1 equiv, 5,67 mmol, 0,86 g). La mezcla se calentó a 90ºC durante la noche. La reacción se extrajo en acetato de etilo y se lavó con agua (3x) y salmuera (3x). El filtrado se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2: CH_3OH 100:0-80:20) dando el compuesto del título (0,19 g, rendimiento 14%). ^{1}H-RMN 500 MHz (DMSO) δ 0,97 (3H, t) 1,26 (12H, s), 2,50 (2H, q), 4,71 (2H, s), 7,65 (1H, s), 8,04 (1H, s). MS *m/z* 265 $(M+H^+)^+$.

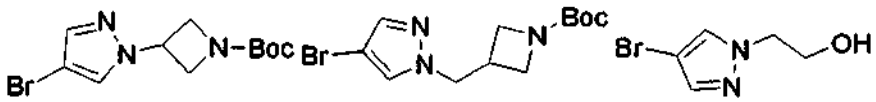
Intermedio 48: 3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-pirazol-1-il]-propionitrilo



Se disolvió éster pinacólico del ácido pirazol-4-borónico (1g, 1 equiv, 5,15 mmol) en dimetilformamida (15 ml) seguido de la adición de Cs_2CO_3 (0,86 g, 1,5 equiv, 7,73 mmol) y 3-cloropropionitrilo (1,1 equiv, 5,67 mmol, 0,44 ml). La mezcla se calentó a 90ºC durante la noche. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua (3x) y salmuera (3x). Las fases orgánicas se concentraron *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-90:10) dando el compuesto del título (0,11 g, 9%). ^{1}H-RMN (500 MHz, DMSO): δ 1,26 (12 H, s), 3,07 (2H, t), 4,40 (2H, t), 7,65 (1H, s), 8,04 (1H, s). MS *m/z* 248 $(M+H^+)^+$.

Intermedio 49: Éster *terc*-butílico del ácido 3-(4-bromo-pirazol-1-il)-azetidin-1-carboxílico;

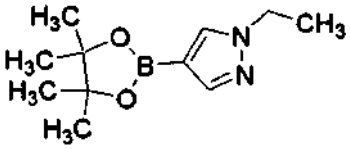
Intermedio 50: Éster *terc*-butílico del áci do 3-(4-bromo-pirazol-1-il metil)-azetidin-1-carboxílico; e Intermedio 51: 2-(4-Bromo-pirazol-1-il)-etanol



49 50 51

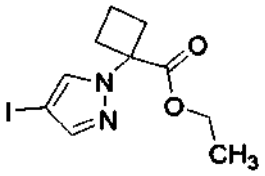
Los intermedios 49, 50, 51 se prepararon mediante los procedimientos descritos por Cui, Jingrong Jean; Funk, Lee Andrew; Jia, Lei; Kung, Pei-Pei; Meng, Jerry Jialun; Nambu, Mitchell David; Pairish, Mason Alan; Shen, Hong; Tran-Dube, Michelle Bich. Preparation of pyrazole-substituted aminoheteroaryl compounds as c-Met protein kinase inhibitors for use against cancer and other abnormal cell growth disorders. PCT Int. Appl. (2006), 185 pp. WO2006021881, sin hacer cambios críticos.

Intermedio 53: 1-Etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol



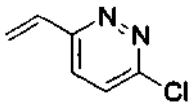
El compuesto del título se preparó mediante el método descrito por Ivachtchenko, Alexandre V.; Kravchenko, Dmitry V.; Zheludeva, Valentina I.; Pershin, Dmitry G. Synthesis of pinacol esters of 1-alkyl-1H-pyrazol-5-yl- and 1-alkyl-1H-pirazol-4-ylboronic acids. Journal of Heterocyclic Chemistry (2004), 41(6), 931-939, sin hacer cambios críticos.

Intermedio 54: Éster etílico del ácido 1-(4-yodo-pirazol-1-il)-ciclobutanocarboxílico



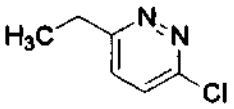
A una solución de yodopirazol (2,93 g, 15,09 mmol) en dimetilformamida (25 ml) se añadió NaH (60% en aceite, 724 mg, 30,18 mmol) burbujeando la solución con nitrógeno y la mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 30 min. Se añadió lentamente una solución de éster etílico del ácido 1-bromo-ciclobutanocarboxílico (1,95 ml, 12,07 mmol) y la solución se agitó durante la noche. Se añadió acetato de etilo a la reacción para extraer el producto. La capa de acetato de etilo se lavó con agua (3x) y salmuera (3x) y se secó sobre sulfato sódico. El filtrado se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, hexanos:acetato de etilo 100:0-75:25) dando el compuesto del título (0,71 g, rendimiento 15%). ^{1}H-RMN (DMSO): δ 1,15 (t, 3H), 1,90-2,04 (m, 2H), 2,69-2,77 (m, 2H), 4,10 (c, 2H), 7,59 (s, 1H), 8,13 (s, 1H). MS m/z=321 $(M+H^+)^+$.

Intermedio 55: 3-Cloro-6-vinil-piridazina



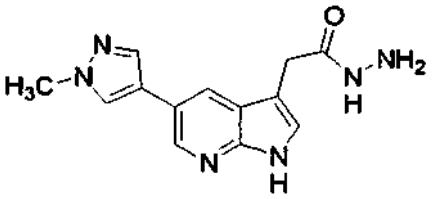
Una mezcla de 3,6-dicloropiridazina (6 g, 40,3 mmol), éster pinacólico del ácido borónico (6,21g, 6,83 ml, 40,3 mmol), carbonato potásico (120 mmol, 16,7 g), 1,4-dioxano (60 ml) y agua (24 ml) se desgasificó durante 15 min con gas nitrógeno. A continuación se añadió el aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (0,4 mmol, 292 mg) y la mezcla se calentó hasta 80ºC durante 4 horas. La fase acuosa se eliminó mediante una pipeta y la fase orgánica se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, hexano:acetato de etilo 100:0 - 60:40) dando el compuesto del título como un sólido blanco (5,2 g, rendimiento 92%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$): δ 5,75 (1H, d), 6,25 (1H, d), 7,05 (1H, dd), 7,49 (1H, d), 7,59 (1H, d). MS m/z=141 $(M+H^+)^+$.

Intermedio 56: 3-Cloro-6-etil-piridazina



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 se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite y el filtrado se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, hexano:acetato de etilo 90:10 - 50:50) dando el compuesto del título como un sólido blanco (627 mg, rendimiento 63%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$): δ 1,27 (3H, t), 2,93 (2H, c), 7,72 (1H, d), 7,83 (1H, d). MS m/z=143 $(M+H)^+$.

Intermedio 57: Hidrazida del ácido [5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético



Etapa 1: 5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina

Se introdujeron un matraz de fondo redondo cargado con N_2 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 $Pd(dppf)_2Cl_2$ (37 mg, 0,045 mmol). Se añadió DMA (6 ml) al vaso de reacción y la solución se burbujeó con N_2 durante 10 minutos. Se disolvió K_2CO_3 (978 mg, 7,07 mmol) en agua (6 ml), se burbujeó con N_2 y se añadió al vaso de reacción manteniendo la temperatura por debajo de la temperatura ambiente con un baño de hiel/agua. El vaso de reacción se burbujeó con una cantidad adicional de N_2 durante 10 minutos, se le adaptó una columna vigreux y una línea de N_2 y se calentó hasta 75ºC durante la noche. La reacción no se completó, por consiguiente, se añadió más 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,0 g) y $Pd(dppf)_2Cl_2$ (124 mg) a la reacción. La solución se calentó durante 4 horas más. Después de este período, se añadió agua (12 ml) al vaso de reacción y la solución se calentó durante 1 hora a 60ºC. La solución se transfirió a un embudo separador con diclorometano (300 ml) y se separó de la capa acuosa. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente 0-10% metanol/diclorometano) dando el compuesto del título (780 mg, rendimiento 78%). MS m/z=199 $[M+H^+]^+$

Etapa 2: Ácido [5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético

Se combinaron 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (780 mg, 3,94 mmol) y sal de Eschenmoser (1,46 g, 7,88 mmol) en acetonitrilo:ácido acético (19:1, 12,3 ml y 700 μl, respectivamente) y se calentaron durante 5 horas a 40ºC. A continuación, se añadió hidróxido potásico 4N hasta alcanzar pH>9. La solución se transfirió a un embudo separador y se extrajo con una cantidad abundante de acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. A continuación se añadió yoduro de metilo (246 μl, 3,94 mmol) en etanol (11 ml) a la gramina bruta y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se concentró *in vacuo* y se volvió a disolver en dimetilformamida (10 ml) y agua (2 ml). Esta se calentó hasta 70ºC durante 3 horas. La reacción se dejó volver de nuevo a la temperatura ambiente, se transfirió a un embudo separador con acetato de etilo (250 ml) y se lavó con agua (2x200 ml). Las capas acuosas se combinaron y se volvieron a extraer con acetato de etilo (200 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró dando el [5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acetonitrilo bruto. Este material se disolvió a continuación en metanol (6 ml) e hidróxido potásico 4N (8 ml) y se calentó a 90ºC durante la noche. La solución se acidificó a continuación con ácido clorhídrico (ac) 1N hasta que se formó un precipitado. El precipitado se filtró a continuación y se lavó con agua dando el producto bruto. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente 0-15% metanol/diclorometano) dando el compuesto del título (284 mg, 28%). MS m/z=257 $[M+H^+]^+$

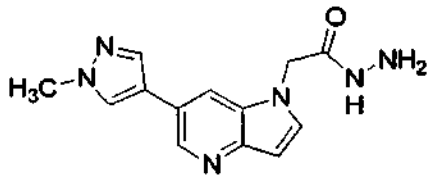
Etapa 3: Éster metílico del ácido [5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético

Se suspendió ácido [5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético (200 mg, 0,78 mmol) en metanol (4 ml). A continuación se añadió ácido sulfúrico (125 μl) y la solución se calentó hasta reflujo durante 2 horas. La solución se concentró in vacuo y el material bruto se disolvió en diclorometano, se transfirió a un embudo separador y se lavó con sat. $NaHCO_3$ (aq). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente 0-10% metanol/diclorometano) dando el compuesto del título (148 mg, rendimiento 70%). MS m/z=271 $[M+H^+]^+$

Etapa 4: Hidrazida del ácido [5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético

Se disolvió éster metílico del ácido 5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético (148 mg, 0,55 mmol) en etanol (3,0 ml) e hidrato de hidrazina (500 μl). La solución se calentó hasta reflujo durante 1 hora. La reacción se interrumpió y se dejó volver de nuevo a temperatura ambiente. El producto cristalizó y se filtró dando el compuesto del título (92 mg, rendimiento 63%). MS m/z=271 $[M+H^+]^+$; (DMSO-*d6*) 3,88 (3H, s), 4,21 (2H, sa), 7,27 (1H, s), 7,85 (1H, s), 8,10 (2H, s), 8,42 (1H, d), 9,17(1H,s), 11,37(1H, s).

Intermedio 58: Hidrazida del ácido [6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-pirrol[3,2-b]piridin-1-il]-acético



Etapa 1: 6-Bromo-1H-pirrol[3,2-b]piridina

A una solución de 5-bromo-2-metil-3-nitro-piridina (1,58 g, 7,28 mmol) [preparada de acuerdo con el documento WO 2006/103449] en dimetilformamida (10 ml) se añadió dimetilformamida dimetil acetal (1,65 ml, 12,37 mmol). La

mezcla de reacción se agitó a 100˚C durante 1 h, a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en ácido acético glacial (25 ml) y se añadió polvo de hierro (3,25 g, 58,24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100˚C durante 21 h, a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió metanol (25 ml) y la suspensión se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se concentró in vacuo. El residuo se repartió entre bicarbonato sódico acuoso saturado y acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se absorbió a continuación sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice mediante cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de 0-70% acetato de etilo/hexano dio 869 mg del compuesto del título como un sólido de color marfil (rendimiento 60%): ^{1}H-RMN (DMSO-*d6*): δ 6,77 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 11,46 (s ancho, 1H); MS (m/z) 197, 199 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: 6-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[3,2-b]piridina

A un vial de microondas cargado con N_2, se añadió 6-bromo-1H-pirrol[3,2-b]piridina (327 mg, 1,65 mmol) y se disolvió en DMA (2 ml). La solución se burbujeó con N_2 durante 5 minutos. A continuación, se añadió 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (516 mg, 2,48 mmol) a la solución, la cual se burbujeó con N_2 durante otros 5 minutos. Se disolvió K_2CO_3 (320 mg, 2,31 mmol) en agua (2 ml) y la solución se burbujeó con N_2 durante 5 minutos. La solución acuosa se añadió al vaso de reacción y la solución se burbujeó de nuevo con N_2. Por último, se añadió $Pd(dppf)_2Cl_2$ (81 mg, 0,10 mmol) a la solución, se burbujeó con N_2, se selló y se sometió a microondas durante 15 minutos a 130ºC. La reacción se transfirió a continuación a un embudo separador con diclorometano (75 ml) y se lavó con agua (2x75 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con diclorometano (75 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se sometió a vacío. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente de 0-80% acetonitrilo/diclorometano) dando el compuesto del título (200 mg, rendimiento 61%). MS m/z=199 $[M+H^+]^+$.

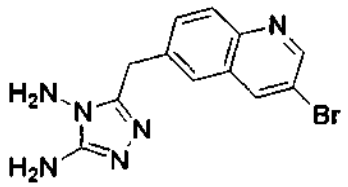
Etapa 3: Éster etílico del ácido [6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-pirrol[3,2-b]piridin-1-il]-acético:

En un matraz de fondo redondo cargado con N_2, se suspendió hidruro sódico, 60%, (41 mg, 1,01 mmol) en dimetilformamida (2,5 ml). La solución se mantuvo bajo atmósfera de N_2 y se enfrió hasta 0˚C durante 10 minutos. A continuación, se disolvió 6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[3,2-b]piridina (200 mg, 1,01 mmol) en dimetilformamida (2,5 ml) y se añadió gota a gota a la solución enfriada. La solución se dejó en agitación a 0˚C durante otros 10 minutos. Por último, se añadió lentamente éster etílico del ácido bromo-acético (123 μl, 1,11 mmol) al vaso de reacción. La reacción se dejó equilibrar hasta temperatura ambiente, agitando durante 2 horas. Por último, la solución se transfirió a un embudo separador con diclorometano (75 ml) y se lavó con agua (2x75 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (0-10% gradiente gradual metanol/diclorometano) dando el compuesto del título (122 mg, rendimiento 43%). MS m/z=285 $[M+H^+]^+$

Etapa 4: Hidrazida del ácido [6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-pirrol[3,2-b]piridin-1-il]-acético:

Se disolvió éster etílico del ácido [6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-pirrol[3,2-b]piridin-1-il]-acético (122 mg, 0,42 mmol) en etanol (1 ml) e hidrato de hidrazina (500 μl). La solución se calentó hasta reflujo durante 1 hora. A continuación, la solución se concentró *in vacuo* y se redisolvió en una cantidad mínima de metanol caliente. El producto cristalizó y se recogió mediante filtración dando el compuesto del título (114,8 mg, rendimiento 99%). MS m/z=271 $[M+H^+]^+$

Intermedio 59: 5-(3-Bromo-quinolin-6-ilmetil)-[1,2,4]triazol-3,4-diamina



Etapa 1: 5-(3-Bromo-quinolin-6-ilmetil)-[1,3,4]oxadiazol-2-ilamina

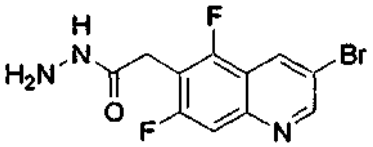
Una mezcla de hidrazida del ácido (3-bromo-quinolin-6-il)-acético (preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención) (4,12 g, 14,7 mmol), bromuro de cianógeno (1,1 eq., 16,2 mmol, 1,7 g) y $KHCO_3$ (1,25 eq., 18,3 mmol, 1,83 g) se agitó en metanol (30 ml) a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se diluyó con agua (40 ml) y el sólido se recogió mediante filtración y se lavó con metanol frío y se secó dando el compuesto del título como un sólido blanco (4,02 g, 13,2 mmol, 90%). ^{1}H-RMN (DMSO-*d6*): δ 4,27 (2H, s), 6,94 (s, 2H), 7,71 (dd, 1H), 7,86 (d, 1H), 8,02 (d, 1H), 8,73 (d, 1H); 8,93 (d, 1H); MS (m/z) 305 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: 5-(3-Bromo-quinolin-6-ilmetil)-[1,2,4]triazol-3,4-diamina

Una mezcla de 5-(3-bromo-quinolin-6-ilmetil)-[1,3,4]oxadiazol-2-ilamina (3,53 g, 11,6 mmol), hidrazina hidrato (30 ml)

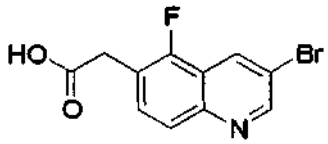
y agua (15 ml) se calentó en un vial de microondas a 170ºC y 2 bar de presión durante 1 hora. Después de enfriar el sólido formado, se recogió por filtración y se lavó con metanol frío y se secó dando el compuesto del título como sólido blanco (1,79 g, 5,6 mmol, 49%). ^{1}H-RMN (DMSO-*d6*): δ 4,13 (2H, s), 5,46 (s, 2H), 5,56 (s, 2H), 7,23 (d, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,98 (d, 1H), 8,71 (d, 1H); 8,91 (d, 1H); MS (m/z) 319 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 60: Hidrazida del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético



Se añadió gota a gota $SOCl_2$ (394 mg, 3,31 mmol) a una solución agitada de ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético (500 mg, 1,65 mmol) en 12 ml de metanol a 0ºC bajo atmósfera de N_2. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente el disolvente se evaporó y el éster metílico del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético bruto se usó directamente en el siguiente etapa. A una mezcla de éster metílico del ácido (3-bromo-5,7-difluoro-quinolin-6-il)-acético (2,29 g, 7,22 mmol) en metanol (100 ml) se añadió hidrazina anhidra (2,31 g, 72,2 mmol). La mezcla se calentó a 55°C durante 4 horas. Se añadió hidrazina anhidra adicional (1,16 g, 36,1) y la mezcla se calentó a 55ºC durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente dando un sólido blanco. El sólido blanco se filtró y se lavó con metanol frío obteniéndose 2,1 g del compuesto del título (rendimiento 92%). MS: m/z 318 $[M+H^+]$. ^{1}H-RMN (500 MHz. DMSO-d_6): δ 1,99 (2H, s), 4,25 (2H, sa), 7,72 (1H, d), 8,74 (1H, s), 9,03 (1H, s), 9,35 (1H, s).

Intermedio 61: Ácido (3-bromo-5-fluoro-quinolin-6-il)-acético



Etapa 1: 6-bromo-5-fluoro-quinolina

Una mezcla de 4-bromo-3-fluoro-fenilamina (100 g, 526 mmol), sulfato ferroso (30 g), glicerol (200 g), nitrobenceno (40 g) y ácido sulfúrico concentrado (100 ml) se calentó suavemente. Después de la primera reacción vigorosa, la mezcla se calentó hasta reflujo durante 5 horas. El nitrobenceno se evaporó *in vacuo.* La solución acuosa se acidificó con ácido acético glacial y se separó un precipitado marrón, el cual se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo= 12/1) dando una mezcla de 6-bromo-5-fluoro-quinolina y 6-bromo-7-fluoro-quinolina como un sólido blanco (80 g, 68%). Esta mezcla se calentó hasta reflujo en éter de petróleo. La solución se enfrió hasta t.a., se filtró y se secó dando 6-bromo-7-fluoro-quinolina como un sólido blanco. A la solución se añadió HCl/MeOH y en la solución precipitó un sólido blanco. El sólido se filtró y se alcalinizó. El precipitado resultante se recogió por filtración y se secó obteniéndose 6-bromo-5-fluoroquinolina como sólido blanco. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): 9,0 (d,1H), 8,5 (d,1H), 8,0 (m,1H), 7,8 (d,1H), 7,7 (m,1H); MS: m/z 228 $[M+H^+]^+$.

Etapa 2: Éster *terc*-butílico del ácido (5-fluoro-quinolin-6-il)-acético

A una solución de 6-bromo-5-fluoro-quinolina (1,0 g, 4,5 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml) se añadió una solución de acetato de terc-butilzincbromuro (9 mmol, 20 ml, 10,4 M en tetrahidrofurano) seguido de $Pd(PPh_3)_4$ (0,52 g, 0,45 mmol). La mezcla se calentó en un reactor de microondas durante 30 min a 120ºC. La mezcla de reacción se neutralizó con cloruro amónico saturado (60 ml) y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna dando el compuesto del título (0,83 g, 71%). ^{1}H-NMR($CDCl_3$, 300 MHz): 8,9 (d, 1H), 8,4 (d, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,6 (m, 1H), 7,5 (m, 1H), 3,7 (d, 2H), 1,4 (s, 9H).

Etapa 3: Éster metílico del ácido (5-fluoro-quinolin-6-il)-acético

El éster *terc*-butílico del ácido (5-fluoro-quinolin-6-il)-acético (5 g, 19 mmol) en 25 ml de NaOH (4N) ac. se calentó hasta reflujo durante 4h. La mezcla se lavó con acetato de etilo y la capa acuosa se acidificó hasta pH 5 con HCl conc. El precipitado resultante se recogió y se lavó con agua y se secó *in vacuo* dando ácido (5-fluoro-quinolin-6-il)-

acético. A este sólido se añadió H_2SO_4 conc. (1,2 ml) y MeOH (20 ml) y la solución se calentó hasta reflujo durante 6 h. Después de enfriar, el disolvente se eliminó in vacuo y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida dando el compuesto del título (2,0 g 48%).

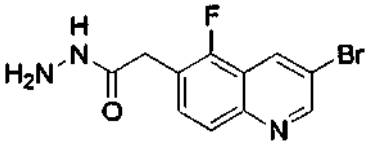
Etapa 4: Éster metílico del ácido (3-bromo-5-fluoro-quinolin-6-il)-acético

A una solución de éster metílico del ácido (5-fluoro-quinolin-6-il)-acético (2,0 g, 9 mmol) en CCl_4(20 ml) y piridina (1,48 ml, 18 mmol) se añadió gota a gota bromo (0,9 ml, 18 mmol) a 5ºC. La solución se calentó hasta reflujo durante 20 minutos. Después de enfriar, la reacción se neutralizó mediante $NaHCO_3$ ac. sat. y la mezcla se extrajo con diclorometano y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida dando el compuesto del título (1,8 g, 66%). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 8,9 (d, 1H), 8,5 (d, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,6 (m, 1H), 3,9 (d, 2H), 3,7 (s, 3 H).

Etapa 5: Ácido (3-bromo-5-fluoro-quinolin-6-il)-acético

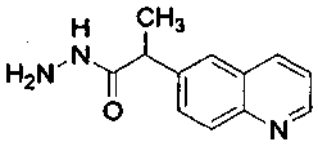
Éster metílico del ácido 3-bromo-5-fluoro-quinolin-6-il)-acético (1,2 g) en 10 ml de NaOH (4N) ac. se calentó hasta reflujo durante 4h. La mezcla se lavó con acetato de etilo y la capa acuosa se acidificó hasta pH 5 con HCl conc. El precipitado resultante se recogió y se lavó con agua y se secó *in vacuo* dando el compuesto del título (838 mg 74%). ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): 12,6 (s, 1H), 9,0 (d, 1H), 8,7 (d, 1H), 7,9 (d, 1H), 7,8 (m, 1H), 3,9 (d, 2H). MS: 283, 285 (M+1).

Intermedio 62: Hidrazida del ácido (3-bromo-5-fluoro-quinolin-6-il)-acético



Una solución de ácido (3-bromo-5-fluoro-quinolin-6-il)-acético (800 mg, 2,7 mmol) e hidrazina hidrato (98%, 2 ml) en metanol (15 ml) se calentó hasta reflujo durante 1h. El disolvente se eliminó *in vacuo* obteniéndose un sólido blanco, el cual se lavó con metanol y se secó dando el compuesto del título (750 mg, 94%) como un sólido blanco. ^{1}H-NMR (DMSO-d6,300 MHz): 9,34 (s, 1H), 8,996-9,00(d, 1H), 8,72-8,73 (d, 1H), 7,85-7,88 (d, 1H), 7,73-7,79 (m, 1H), 4,26-4,27 (d, 2H), 3,64-3,66 (d, 2H); MS: m/z 299 $[M+H^+]^+$.

Intermedio 63: Hidrazida del ácido 2-quinolin-6-il-propiónico



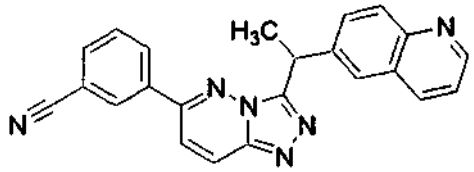
Se combinaron ácido 2-quinolin-6-il-propiónico (5,6 g, 26,1 mmol), hidrazina hidrato (1,6 ml) y metanol (150 ml) y se calentó hasta reflujo durante 72 horas. Pasado este tiempo la mezcla se concentró *in vacuo* y se dividió entre $NaHCO_3$ (200 ml) y diclorometano (150 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 150 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron *in vacuo* dando el compuesto del título como un sólido blanco (4,6 g, 21,4 mmol, 82%). ^{1}H-NMR (DMSO-d6, 500 MHz): 9,30 (1H, sa), 8,85 (1H, dd), 8,33 (1H, dd), 7,95 (1H, d), 7,86 (1H, d), 7,74 (1H, dd), 7,51 (1H, dd), 4,22 (3H, s), 3,74 (1H, q), 1,44 (3H; MS: m/z 216 $[M+H^+]^+$.

Procedimientos para la síntesis de los ejemplos

El compuesto 21 y el método A se conservan con fines de referencia.

Método A

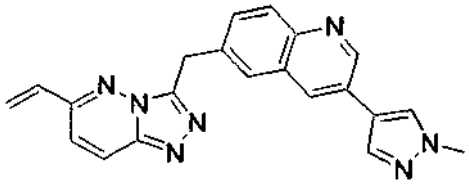
Compuesto 21; (*R,S*)-3-[3-(1-Quinolin-6-il-etil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-6-il]-benzonitrilo



A una mezcla desgasificada (nitrógeno burbujeado durante 15 min) de agua (1 ml) y 1,4-dioxano (3 ml) se añadió (*R, S*)-6-[1-(6-cloro-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-il)-etil]-quinolina (100 mg, 0,32 mmol, 1,0 equiv.), ácido 3-cianofenil-borónico (52 mg, 0,35 mmol, 1,1 equiv.), carbonato potásico (2 equiv., 0,64 mmol, 89 mg) y aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)-ferroceno]paladio(II) diclorometano (15 mg, 0,07 equiv). El tubo de microondas se tapó y se calentó en un reactor de microondas a 130˚C durante 20 minutos. Pasado este tiempo la mezcla se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con diclorometano:metanol 100:0 a 90:10. El residuo se disolvió en dimetilformamida (1 ml) y se purificó adicionalmente mediante HPLC de fase inversa activada por masa (5 -95% CH_3CN en H_2O) dando el compuesto del título como un sólido blanco (71 mg, 0,19 mmol, rendimiento 59%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 1. Separación de enantiómeros descritos en el Método B.

Método C

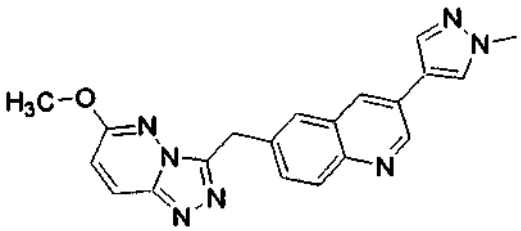
Compuesto 156: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-vinil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



A una mezcla desgasificada (nitrógeno burbujeado durante 15 min) de agua (1 ml) y 1,4-dioxano (2 ml) se añadió 6-(6-cloro-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina (117 mg, 0,31 mmol), éster pinacólico del ácido vinilborónico (59 μl, 0,35 mmol), carbonato potásico (0,93 mmol, 128 mg) y aducto de dicloro[1,1'-bis(difenil-fosfino)-ferroceno]paladio(II) diclorometano (15 mg, 0,02 mmol). El tubo de microondas se tapó y se calentó en un reactor de microondas (Personel Chemistry, Emrys Optimizer) a 135ºC durante 1500 segundos. Pasado este tiempo la fase orgánica se concentró en sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con 0-10% metanol en diclorometano obteniéndose el compuesto del título (22 mg, rendimiento 19%) como un sólido blanco. Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método I

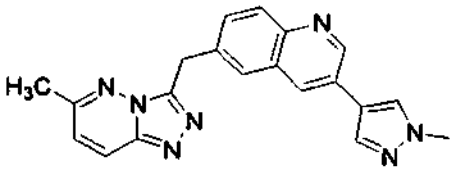
Compuesto 140: 6-(6-Metoxi-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina



A un vial de microondas de 5 ml, se añadió 1 ml de metanol seguido de 15 mg de carbonato potásico y 25 mg (0,067 mmol) de 6-(6-cloro-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)quinolina. La mezcla de reacción se calentó durante 3800 segundos a 130ºC en un microondas. La mezcla de reacción se filtró a continuación y se purificó mediante HPLC preparativa dando el compuesto del título (11,6 mg, 47%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método L

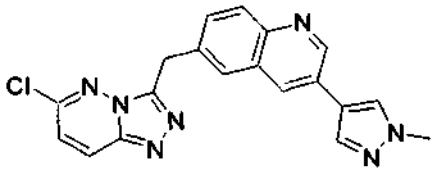
Compuesto 124: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



Una solución de 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (50 mg, 0,141 mmol, 1,0 equiv.) en 1,4-dioxano (1 ml) se desgasificó con nitrógeno y se añadió nitrógeno a un tubo de microondas que contenía 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (0,177 mmol, 1,25 equiv., 37 mg). A continuación se añadió una solución desgasificada de carbonato potásico (0,282 mmol, 2 equiv., 39 mg) en agua (0,5 ml) al tubo de microondas seguido del aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (5 mg, 0,0071 mmol, 0,05 equiv). El tubo de microondas se cerró y se hizo reaccionar en un reactor de microondas a 100ºC durante 30 minutos. La mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y agua y la capa orgánica se evaporó y el residuo se absorbió a continuación sobre gel de sílice. La purificación sobre gel de sílice con un gradiente 0-10 % de metanol en diclorometano, seguido de trituración con metanol dio el compuesto del título (1,8 mg, 0,005 mmol, rendimiento 4 %) como un sólido blanco. Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método N

Compuesto 152: 6-(6-Cloro-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina

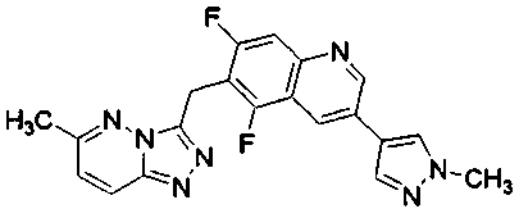


A una mezcla de ácido [3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (530 mg, 1,98 mmol) en diclorometano (2 ml) 0ºC se añadió cloruro de oxalilo (1,2 eq) y una gota de dimetilformamida. La mezcla de reacción se dejó agitar durante una hora. Se tomó una pequeña alícuota y se disolvió en metanol para obtener el éster metílico y se analizó mediante LCMS: *m*/*z* 382,1. El disolvente se eliminó in vacuo, seguido de la adición de diclorometano que se eliminó *in vacuo* y la adición de tolueno que se eliminó *in vacuo* dando el cloruro de [3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acetilo como un sólido amarillo con un rendimiento del 88%.

Se disolvió (6-cloro-piridazin-3-il)-hidrazina (190 mg, 1,315 mmol) en dimetilformamida seguido de la adición de trietilamina (3 eq). Esta mezcla se agitó durante 5 minutos. La mezcla adquirió un tono verde oscuro y se enfrió hasta 0ºC. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de [3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]acetilo (375 mg, 1,315 mmol) en dimetilformamida y la mezcla de reacción adquirió un tono amarillo oscuro y se agitó durante una hora. Pasado este tiempo la mezcla se concentró hasta sequedad, se absorbió en ácido acético (10 ml) y se agitó a 60ºC durante 16 horas. El disolvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua y la fase acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se purificaron mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2, gradiente de metanol 0 a 10 %) dando el compuesto del título (217 mg, rendimiento 42%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método O

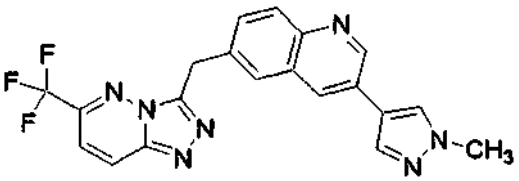
Compuesto 14 5: 5,7-Difluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



A un vial de 40 ml se añadió 1-butanol (10 ml), hidrazida del ácido [2,4-difluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (425 mg, 1,34 mmol) y 3-cloro-6-metilpiridazina (172 mg, 1,34 mmol). La mezcla se calentó a 120ºC durante 24 horas. El disolvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se agitó en etanol antes de la filtración, obteniéndose 200 mg de material bruto. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, diclorometano/ metanol 0 a 10 %) dio 182 mg de material puro con un rendimiento del 35%. Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método P

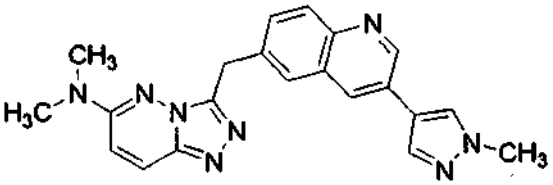
Compuesto 123: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-trifluorometil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



Una mezcla de 1-butanol (2 ml), 3-cloro-6-trifluorometil-piridazina (0,13 mmol, 25 mg), hidrazida del ácido [3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-6-il]-acético (0,13 mmol, 40 mg) se calentó a 120°C durante 18 horas. El disolvente se eliminó insuflando nitrógeno, el residuo marrón se disolvió en 1 ml de dimetilformamida y 1 ml de metano y se purificó mediante HPLC preparativa dando el compuesto del título (15,8 mg, 0,04 mmol, 29%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método Q

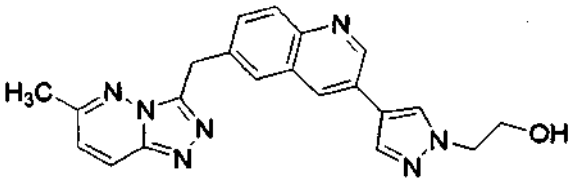
Compuesto 159: Dimetil-{3-[3-(1- Metil-1H-pirazol-4-il)-quinolin-6-ilmetil]-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-6-il}-amina



A un vial de microondas de 5 ml, se añadió 1 ml de dimetilamina al 40% en agua seguido de 300 µl de DMSO para disolver 25 mg (0,067 mmol) de 6-(6-cloro-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)quinolina. La reacción se calentó en un microondas durante 2000 segundos a 130ºC. La mezcla de reacción se filtró, a continuación se purificó mediante HPLC preparativa dando el compuesto del título (7,7 mg, rendimiento 30%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método R

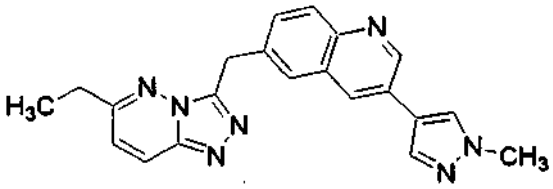
Compuesto 144: 2-{4-[6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-etanol



A un vaso de microondas se añadió 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (80 mg, 0,23 mmol, 1 equiv), bis(pinacol)borano (69 mg, 0,27 mmol, 1,2 equiv), acetato de potasio (66 mg, 0,67 mmol, 3,0 equiv) seguido de dimetilacetamida (0,8 ml). La solución se desgasificó durante 10 min y se añadió aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (7 mg, 0,01 mmol, 0,048 equiv). El vaso del microondas se tapó y se hizo reaccionar en un reactor de microondas a 120ºC durante 1 hora. El vaso de microondas se enfrió y a continuación se añadió 2-(4-bromo-pirazol-1-il)-etanol (0,18 mmol, 0,8 equiv) disuelto en dietilacetamida (0,6 ml), seguido de carbonato sódico acuoso 2M (0,6 ml). La solución se desgasificó durante 10 min y se añadió el aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (7 mg, 0,01 mmol, 0,048 equiv). El vaso del microondas se tapó y se hizo reaccionar en un reactor de microondas a 120ºC durante 2 horas. Después de enfriar, se añadió Na_2SO_4 (3g) y la mezcla se diluyó con acetonitrilo y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-80:20) o HPLC preparativa dando el compuesto del título. Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2,

Método T

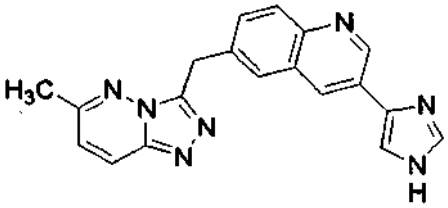
Compuesto 157: 6-(6-Etil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina



A una solución de 3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-vinil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (22 mg, 0,06 mmol) en diclorometano (5 ml) y metanol (0,5 ml) bajo una atmósfera de $N_{2(g)}$, se añadió paladio sobre carbono al 10% (20 mg) y la atmósfera se sustituyó por $H_{2(g)}$. Después de agitar vigorosamente durante 3 horas, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2, metanol 0-10%) dando el compuesto del título como un sólido blanco (17 mg, 77%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2,

Método U

Compuesto 142: 3-(1H-Imidazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina

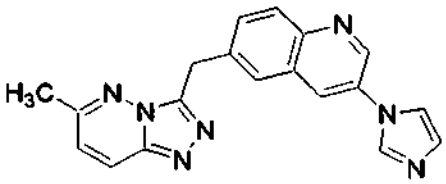


A una solución de 4-bromo-1-tritil-1H-imidazol (103 mg, 0,24 mmol, 1,0 equiv) en tetrahidrofurano (1 ml) se añadió

bromuro de etilmagnesio (3M en dietiléter, 0,094 ml, 0,28 mmol, 1,2 equiv) y la reacción se agitó durante 90 min. A continuación se añadió $ZnCl_2$ (38 mg, 0,28 mmol, 1,2 equiv) y la solución se agitó durante 90 minutos más. Se añadieron tetrakis (trifenilfosfina)paladio (2 mg, 0,024 mmol, 0,10 equiv) y 3-bromo-6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (100 mg, 0,28 mmol, 1,2 equiv) y la solución se calentó a 70ºC durante 18 horas. El disolvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se absorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-80:20 dando 6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(3-tritil-3H-imidazol-4-il)-quinolina. El grupo tritilo se eliminó agitando el compuesto en ácido clorhídrico metanólico (0,5 N) durante 3 horas. Los compuestos volátiles se eliminaron *in vacuo* y el residuo se agitó en etanol y se recogió mediante filtración y se secó dando el compuesto del título (5,6 mg, rendimiento 8%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método V

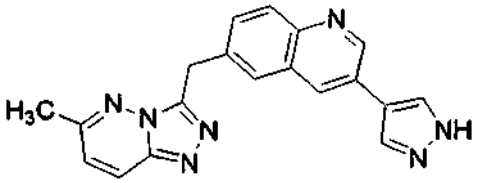
Compuesto 132: 3-Imidazol-1-il-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b] piridazin-3-ilmetil)-quinolina



A un vial de reacción se añadió 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (71 mg, 0,2 mmol, 1,0 equiv), CuI (7 mg, 0,04 mmol, 0,008 equiv), L-prolina (9 mg, 0,08 mmol, 0,4 equiv) y K_2CO_3 (83 mg, 0,60 mmol, 3,0 equiv). El sistema se evacuó y se llenó con nitrógeno (3x). A continuación se añadió una solución de imidazol (27 mg, 0,4 mmol, 2,0 equiv) desgasificado en DMSO (1 ml). La reacción se calentó a 120ºC durante 18 horas. El disolvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se absorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2: CH_3OH 100:0-90:10 dando el compuesto del título (15 mg, rendimiento 22%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método W

Compuesto 125: 6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1H-pirazol-4-il)-quinolina

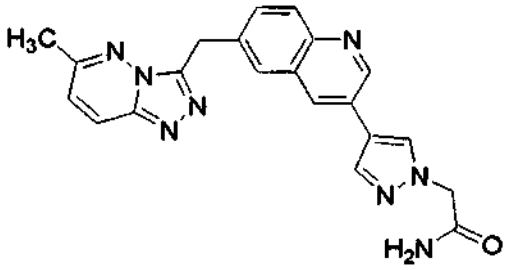


A un vial de microondas se añadió 3-bromo-6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (100 mg, 0,28 mmol, 1 equiv), 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol (113 mg, 0,35 mmol, 1,25 equiv), K_2CO_3 (78 mg, 0,566 mmol, 2,0 equiv) seguido de 1,4-dioxano (3 ml) y agua (1,5 ml).

La solución se desgasificó con nitrógeno durante 10 min y a continuación se añadió aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen] paladio(II) (10 mg, 0,014 mmol, 0,05 equiv). El vaso del microondas se tapó y se hizo reaccionar en un reactor de microondas a 130ºC durante 30 min. La mezcla se enfrió y se repartió entre diclorometano y agua. La fase orgánica se absorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-80:20) dando 6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-[1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina (106 mg, rendimiento 80%). El sólido se añadió a continuación hasta una solución del 20% de etilendiamina en dimetilformamida y se agitó durante 3 horas. El disolvente se eliminó y el residuo se trató con etanol dando el compuesto del título (65 mg, rendimiento 85%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método Z

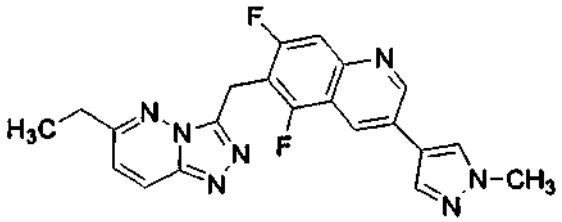
Compuesto 149: 2-{4-[6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-acetamida



Se disolvió 6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-3-(1H-pirazol-4-il)-quinolina (65 mg, 0,19 mmol, 1 equiv). La solución se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 min y a continuación se añadió 2-bromoacetamida (26 mg, 0,19 mmol, 1 equiv) y la solución se calentó a 90°C durante 18 h. El producto se extrajo en diclorometano y se lavó con agua. La fase orgánica se concentró hasta sequedad dando el compuesto del título (40 mg, rendimiento 52%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método BB

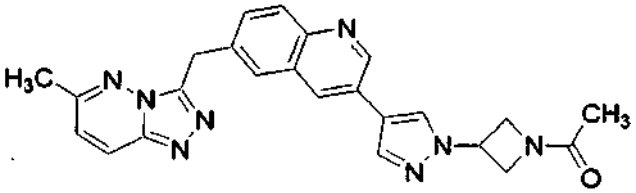
Compuesto 166 : 6-(6-Etil-[1,2,4]tria zol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-5,7-difluoro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-quinolina



A una mezcla de 3-bromo-6-(6-etil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-5,7-difluoro-quinolina (86 mg, 0,2 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (0,21 mmol, 44 mg) y carbonato de cesio (0,6 mmol< 195 mg) en 1,4-dioxano (2 ml) a reflujo, se añadió [2-[(D-N)Metil]fenil-c](triciclohexilfosfina)trifluoroacetato-O-(SP-4-3)-paladio (Bedford, R.B.; Cazin, C.S. J.; Coles, S. J.; Gelbrich, T.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Light, M. E. Organometallics 2003, 22, 987) (0,5 mol%, 0,1 μmol, 0,1 mg). Después de 30 min, la mezcla de reacción se filtró a través de un almohadilla de gel de sílice (2g) eluyendo con diclorometano/metanol (17/3,12 ml). El filtrado se concentró sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0 - 90:10) dando el compuesto del título como un sólido blanco (52 mg, rendimiento 60%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2,

Método CC

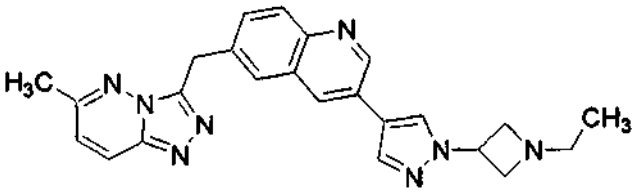
Compuesto175: 1-(3-{4-[6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-azetidin-1-il)-etanona



A 3-(1-azetidin-3-il-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (25 mg, 0,063 mmol) en diclorometano (1 ml) se añadió trietilamina (9,7 µl, 0,069 mmol) seguido de cloruro de acetilo (5,0 µl, 0,069 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con agua y el producto se extrajo en diclorometano. La reacción se diluyó con agua y se extrajo en diclorometano y se lavó con agua. El filtrado se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-90:10) dando el compuesto del título (4,20 mg, rendimiento 15%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método DD

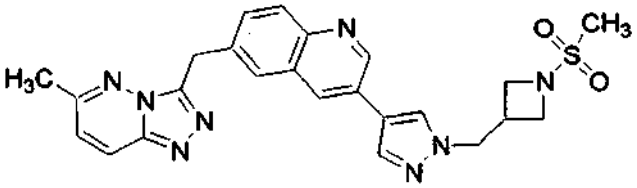
Compuesto 17 1: 3- [1-(1-Etilazetidin-3-il)-1H-pirazol-4-il]-6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



A 3-(1-azetidin-3-il-1H-pirazol-4-il)-6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (50 mg, 0,126 mmol) en diclorometano (3 ml) se añadió acetaldehído (15 µl, 0,505 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se añadió triacetoxiborohidruro sódico (67 mg, 0,136). Después de 1 hora, la solución se diluyó con diclorometano (1,5 ml) y se lavó con bicarbonato sódico (1,5 ml). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (1,5 ml). Las capas combinadas de diclorometano se lavaron con salmuera (3 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4, El filtrado se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-90:10) dando el compuesto del título (4,8 mg, rendimiento 9%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método EE

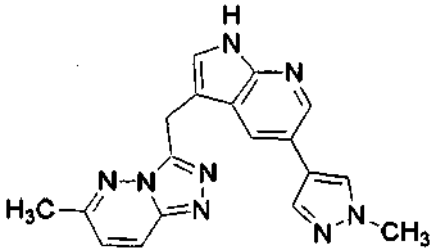
Compuesto 172: 3-[1-(1-M etanosulfonil-azetidin-3-ilmetil)-1H-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



A (1-azetidin-3-ilmetil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (22 mg, 0,054 mmol) en diclorometano (1 ml) se añadió trietilamina (7,5 µl, 0,054 mmol) seguido de cloruro de metanosulfonilo (4,0 µl, 0,054 mmol) y dimetilaminopiridina (6,6 mg, 0,054 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó a continuación con agua y el producto se extrajo en diclorometano. La reacción se diluyó con agua y se extrajo en diclorometano y se lavó con agua. El filtrado se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-90:10) dando el compuesto del título (5,4 mg, rendimiento 21%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2,

Método FF

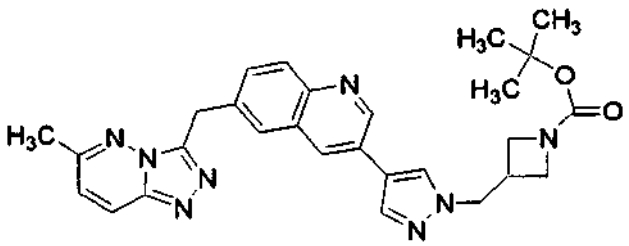
Compuesto 177: 6-Metil-3-[5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-ilmetil]-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazina



Se suspendió hidrazida del ácido [5-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-acético (60 mg, 0,22 mmol) y 3-cloro-6-metil-piridazina (35 mg, 0,27 mmol) en n-butanol (1 ml). La suspensión se calentó en un microondas durante 1 hora a 200ºC. A continuación, la solución se transfirió a un embudo separador con diclorometano (20 ml). La solución se lavó con $NaHCO_3$ (aq) saturado (30 ml). La capa orgánica se repartió, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró *in vacuo*. El material bruto se secó cargado en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente 0-10% Metanol/diclorometano) dando el producto 6-Metil-3-[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-pirrol[3,2-b]piridina-1-ilmetil]-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazina (24,3 mg, rendimiento 32%), el cual cristalizó en una cantidad mínima de metanol. Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método GG

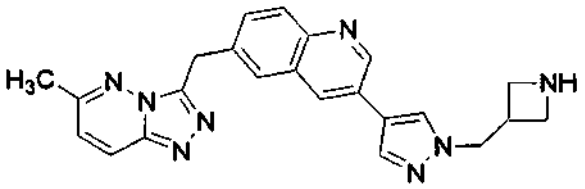
Compuesto 176: Éster *terc*-butílico del ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-ilmetil}-azetidin-1-carboxílico



A un vaso de microondas se añadió 3-bromo-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (476 mg, 1,35 mmol, 1 equiv), éster *terc*-butílico del ácido 3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3]dioxolan-2-il)-pirazol-1-ilmetil]-azetidin-1-carboxílico (1,2 g, 3,37 mmol, 2,5 equiv), K_2CO_3 (393 mg, 2,84 mmol, 2,0 equiv) seguido de dioxano (12 ml) y agua (6 ml). La solución se desgasificó con nitrógeno durante 10 min y a continuación se añadió el aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino) ferroceno]paladio(II) diclorometano (44 mg, 0,06 mmol, 0,05 equiv). El vaso del microondas se tapó y se hizo reaccionar en un reactor de microondas a 130ºC durante 30 min. El vaso de microondas se enfrió y a continuación la mezcla se extrajo en diclorometano y se lavó con agua. Los compuestos volátiles se eliminaron *in vacuo* y el residuo se absorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH 100:0-80:20) obteniéndose éster *terc*-butílico del ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-ilmetil}-azetidin-1-carboxílico (189 mg, rendimiento 28%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2,

Método HH

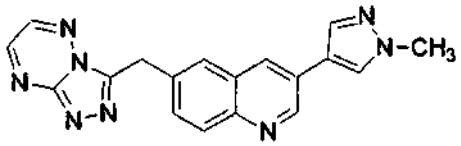
Compuesto 155: 3-(1-Azetidin-3-ilmetil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



Al éster terc-butílico del ácido 3-{4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-ilmetil}-azetidin-1-carboxílico (189 mg) se añadieron 6 ml de una solución de TFA:diclorometano/1:1. La mezcla se dejó reposar durante 2 horas. Los compuestos volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria y a continuación se añadió metanol (6 ml) y MP-carbonato (400 mg, 3,18 mmol/g). La resina se filtró y los compuestos volátiles se eliminaron *in vacuo* obteniéndose un rendimiento cuantitativo de 3-(1-azetidin-3-ilmetil-1H-pirazol-4-il)-6-(6-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina. Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método II

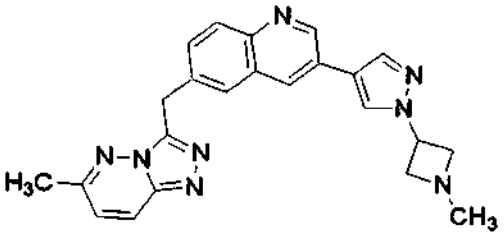
Compuesto 179: 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-6-[1,2,4]triazol[4,3-b][1,2,4]triazin-3-ilmetil-quinolina



Una mezcla de 3-bromo-6-[1,2,4]triazol[4,3-b][1,2,4]triazin-3-ilmetil-quinolina (69 mg, 0,204 mmol), éster pinacólico del ácido 1-metil-4-pirazolborónico (51 mg, 0,25 mmol), carbonato potásico (56 mg, 0,41 mml), 1,4-dioxano (2 ml) y agua (1 ml) se burbujeó con nitrógeno gaseoso durante 10 minutos. Pasado este tiempo se añadió diclorobis(trifenilfosfino) paladio (8 mg, 5 %mol), el vial se selló y se calentó en un microondas durante 1500 segundos a 135ºC. La mezcla se diluyó con diclorometano y salmuera, antes la fase orgánica se concentró sobre gel de sílice y se cromatografió en columna ultrarrápida (SiO_2 4g, diclorometano/CH_3OH 0-10%) dando el compuesto del título como un sólido blanco (11 mg, 16%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

Método NN

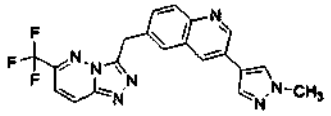
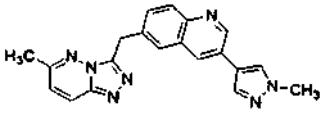
Ejemplo 3-[1-(1-Metil-azetidin-3-il)-1H-pirazol-4-il]-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina



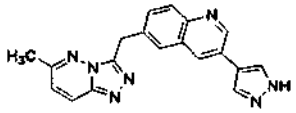
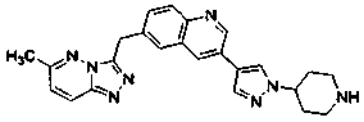
A 3-(1-azetidin-3-il-1H-pirazol-4-il)-6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-b]piridazin-3-ilmetil)-quinolina (194 mg, 0,4898 mmol) en diclorometano (9 ml) se añadió formaldehído (37% en agua, 1,959 mmol, 147 μl). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se añadió triacetoxiborohidruro sódico (260 mg, 1,22 mmol). Después de 1 hora, la solución se diluyó con diclorometano (6 ml) y se lavó con bicarbonato sódico (6 ml). La capa acuosa se extrajo adicionalmente con diclorometano (6 ml). Las capas combinadas de diclorometano se lavaron con salmuera (12 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4. El filtrado se concentró *in vacuo* sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 95:4,995:0,005 - 80:19,98:0,02) dando el compuesto del título (69 mg, rendimiento 35%). Los datos analíticos se presentan en la Tabla 2.

La estructura, nombre, datos físicos y biológicos y procedimientos se describen a continuación en forma tabular en la Tabla 2.

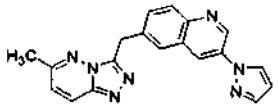
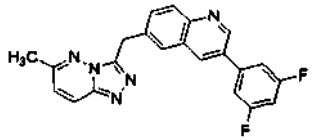
Tabla 2

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
123	I	II	P	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-trifluorometil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,83 (s, 3H), 4,70 (s, 2H), 7,61 (dd, 1H), 7,72 (d, 1H) 7,74 (d, 1H) 7,86 (d, 1H) 8,01 (s, 1H) 8,31 (s, 1H) 8,33 (d, 1H) 8,62 (d, 1H) 9,07 (s, 1H).	410
124	I	I	L	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 3,91 (3H, s) 4,70 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,67 (1H, dd), 7,51 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,09 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,39 (1H, s), 8,43 (1H, d), 9,14 (1H, d)	356

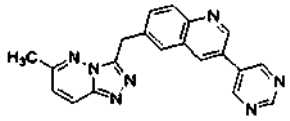
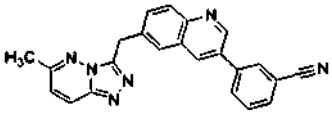
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
125	I	II	W	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1H-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,56 (3H, s), 4,74 (2H, s), 7,30 (1H, d), 7,80 (1H, dd), 7,74 (1H, s), 8,02 (1H, d), 8,28 (1H, d), 8,36 (2H, s), 8,71 (1H, s), 9,32 (2H, s)	342
126	I	I	L	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-piperidin-4-il-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,11-2,19 (2H, m), 2,26-2,28 (2H, m), 2,54 (3H, s), 3,09-3,17 (2H, m), 3,42-3,46 (2H, m), 4,53-4,58 (1H, m), 4,73 (2H, s), 7,29 (1H, d), 7,76 (1H, dd), 8,00 (1H, d), 8,21 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,54 (1H, s), 8,54 (1H, sa), 8,62 (1H, s), 8,78 (1H, sa), 9,27 (1H, s)	425

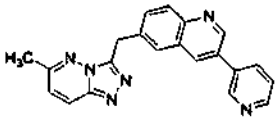
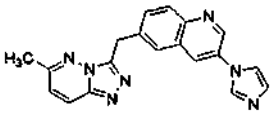
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
127	II		V	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-pirazol-1-il-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,73 (2H, s), 6,65 (1H, d), 7,27 (1H, d), 7,75 (1H, dd), 7,75 (1H, dd), 7,88 (1H, d), 7,90 (1H, s), 8,02 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,70 (1H, dd), 9,45 (1H, d)	342
128	II	III	L	 **3-(3,5-Difluoro-fenil)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,74 (2H, s), 7,28 (1H, d), 7,34 (1H, td), 7,72 (1H, dd), 7,80 (1H, dd), 7,88 (1H, s), 8,03 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,72 (1H, d), 9,27 (1H, d)	388

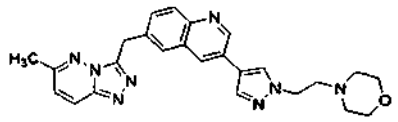
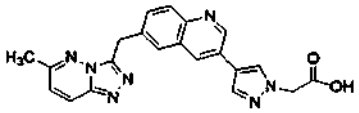
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
129	II	III	L	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-pirimidin-5-il-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,74 (2H, s), 7,28 (1H, d), 7,83 (1H, dd), 7,90 (1H, s), 8,05 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,81 (1H, d), 9,27 (1H, s), 9,32 (1H, d), 9,35 (1H, s)	354
130	I	I	L	 **3-[8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-benzonitrilo**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,74 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,75 (1H, t), 7,81 (1H, dd), 7,89 (1H, s), 7,92 (1H, dd), 8,04 (1H, d), 8,24 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,41 (1H, s), 8,73 (1H, d), 9,27 (1H, d)	377

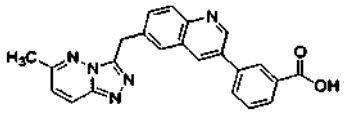
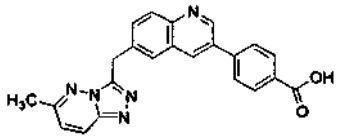
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
131	I	I	L	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-piridin-5-il-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,74 (2H, s), 7,28 (1H, d), 7,57 (1H, dd), 7,80 (1H, dd), 7,91 (1H, s), 8,03 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,31 (1H, dt), 8,65 (1H, dd), 8,71 (1H, d), 9,10 (1H, d), 9,26 (1H, d)	352
132	II	II	V	 **3-Imidazol-1-il-8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)- -quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,74 (2H, s), 7,19 (1H, s), 7,27 (1H, dd), 7,79 (1H, dd), 7,84 (1H, s), 7,96 (1H, s), 8,04 (1H, d), 8,27 (1H, dd), 8,47 (1H, s), 8,61 (1H, d), 9,26 (1H, d)	341

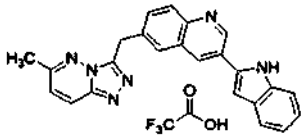
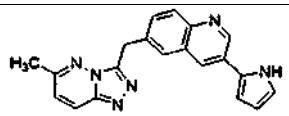
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
133	I	I	L	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-[1-(2-morfolin-4-iletil)-1*H*-pirazol-4-il]-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,44 (4H, ta), 2,55 (3H, s), 2,76 (2H, t), 3,56 (2H, t), 4,29 (4H, t), 4,71 (2H, s), 7,28 (1H, d), 7,68 (1H, dd), 7,76 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,11 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,43 (1H, d), 8,45 (1H, s), 9,15 (1H, d)	455
134	I	II	R	 **Ácido {4 -[8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il]-acético**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,71 (2H, s), 5,01 (2H, s), 7,28 (1H, d), 7,68 (1H, d), 7,78 (1H, s), 7,95 (1H, d), 8,14 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,41 (2H, s), 8,46 (1H, s), 9,16 (1H, d)	400

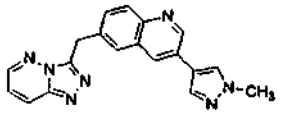
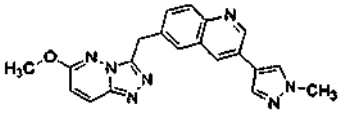
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
135	II	III	L	 **Ácido 3-[8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-benzoico**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,73 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,80 (1H, dd), 7,93 (1H, d), 8,01-8,09 (5H, m), 8,27 (1H, d), 8,71 (1H, d), 9,26 (1H, d)	396
136	II	III	L	 **Ácido 4-[8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-benzoico**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 4,73 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,80 (1H, dd), 7,93 (1H, d), 8,01-8,08 (5H, m), 8,27 (1H, d), 8,71 (1H, d), 9,26 (1H, d)	396

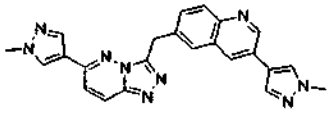
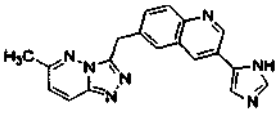
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
137	I	II	L	 **Ácido 3-(1*H*-indol-2-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin trifluroacético**	(DMSO-*d*6) 2,56 (3H, s), 4,76 (2H, s), 7,05 (1H, t), 7,17 (1H, t), 7,25 (1H, s), 7,30 (1H, d), 7,46 (1H, d), 7,60 (1H, d), 7,82 (1H, dd), 7,91 (1H, s), 8,04 (1H, d), 8,28 (1H, d), 8,83 (1H, s), 9,50 (1H, s), 11,86 (1H, s)	391
138	I	III	L	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1*H*-pirrol-2-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,48 (3H, s), 4,62 (2H, s), 6,13 (1H, dd), 6,74 (1H, dd), 7,20 (1H, d), 7,56 (1H, dd), 7,66 (1H, s), 7,83 (1H, d), 8,19 (1H, d), 8,30 (1H, d), 9,14 (1H, d), 11,50 (1H, s)	341

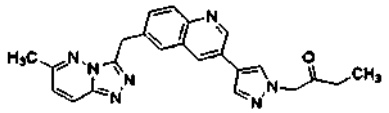
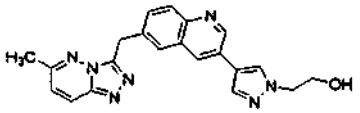
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
139	I	I	L	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,84 (3H, s), 4,68 (2H, s), 7,28 (1H, dd), 7,59 (1H, dd), 7,68 (1H, s), 7,86 (1H, d), 8,02 (1H, s), 8,30 (1H, d), 8,31 (1H, s), 8,35 (1H, d), 8,57 (1H, dd), 9,07 (1H, d)	342
140	I	I	I	 **8-(8-Metoxi-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,83 (3H, s), 3,90 (3H, s) 4,57 (2H, s), 6,95 (1H, d), 7,62 (1H, dd), 7,67 (1H, s), 7,85 (1H, d), 8,02 (1H, s), 8,16 (1H, d), 8,31 (1H, s), 8,35 (1H, d), 9,06 (1H, d)	372

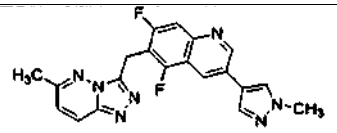
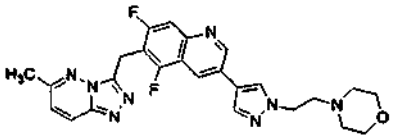
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
141	I	I	A	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-[8-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,83 (3H, s), 3,86 (3H, s) 4,66 (2H, s), 6,61 (1H, d), 7,66 (1H, dd), 7,79 (1H, s), 7,86 (1H, d), 8,01 (1H, s), 8,10 (1H, s), 8,29 (1H, s), 8,30 (1H, d), 8,37 (1H, d), 8,46 (1H, s) 9,06 (1H, d)	422
142	II	II	U	 **3-(3*H*-imidazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,57 (3H, s), 4,77 (2H, s), 7,32 (1H, d), 7,86 (1H, dd), 7,93 (1H, s), 8,08 (1H, d), 8,29 (1H, d), 8,44 (1H, d), 8,97 (1H, s), 9,35 (1H, s), 9,43 (1H, d)	342

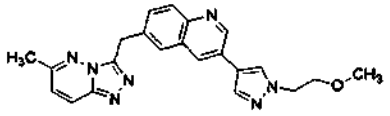
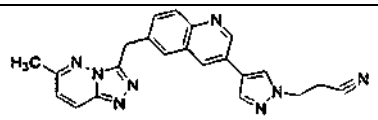
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
143	I	I	R	 **1-[4-(8-8-(Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il]-butan-2-ona**	(DMSO-*d*6) 0,98 (3H, t), 2,55 (3H, s), 4,71 (2H, s), 5,20 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,68 (1H, dd), 7,78 (1H, s), 7,95 (1H, d), 8,15 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,34 (1H, s), 8,46 (1H, d), 9,15 (1H, d)	412
144	I	II	R	 **2-{4-(8-8-(Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il}-etanol**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 3,79 (2H, q), 4,19 (2H, t), 4,70 (2H, s), 4,98 (1H, t), 7,27 (1H, d), 7,66 (1H, dd), 7,75 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,12 (1H, s), 8,26 (1H, d), 8,41 (1H, s), 8,44 (1H, d), 9,16 (1H, d)	386

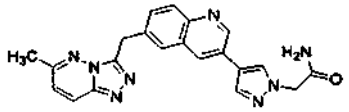
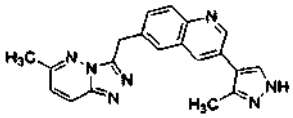
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
145	I	I	O	 **5,7-Difluoro-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,47 (3H, s), 3,84 (3H, s) 4,61 (2H, s), 7,21 (1H, d), 7,64 (1H, d), 8,13 (1H, s), 8,17 (1H, d), 8,43 (1H, s), 8,49 (1H, d), 9,22 (1H, d).	392
146	I	I	L	 **5,7-Difluoro-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-[1-(2-morfolin-4-il-etil)-1*H*-pirazol-4-il-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,43 (4H, ma), 2,53 (3H, s) 2,75 (2H, m), 3,54 (4H, ma), 4,28 (2H, t), 4,68 (2H, s), 7,28 (1H, d), 7,71 (1H, d), 8,15 (1H, s), 8,21 (1H, s), 8,24 (1H, d), 8,56 (1H, d), 9,30 (1H, d).	491

(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
147	I	I	R	 **3-[1-(2-Metoxi-etil)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 3,25 (3H, s), 3,74 (2H, t), 4,31 (2H, t), 4,70 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,67 (1H, dd), 7,75 (1H, d), 8,12 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,44 (1H, d), 9,15 (1H, d)	400
148	I	I	R	 **3-{4-[8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinoli-3-il]-pirazol-1-il}-propionato**	(DMSO-*d*6) 2,82 (3H, s), 3,41 (2H, t), 4,73 (2H, t), 4,98 (2H, s), 7,55 (1H, d), 7,96 (1H, dd), 8,04 (1H, s), 8,22 (1H, d), 8,48 (1H, s), 8,53 (1H, d), 8,74 (1H, d), 8,78 (1H, s), 9,43 (1H, d)	395

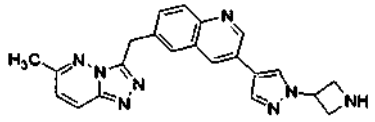
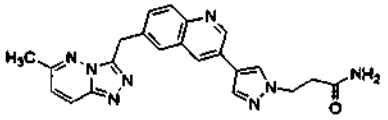
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
149	I	III	Z	 **2-{4-[8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinoli-3-il]-pirazol-1-il}-acetamida**	(DMSO-*d*6) 2,60 (3H, s), 4,70 (2H, s), 4,80 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,33 (1H, sa), 7,59 (1H, sa), 7,67 (1H, dd), 7,77 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,12 (1H, s), 8,26 (1H, d), 8,39 (1H, s), 8,46 (1H, d), 9,16 (1H, d)	399
150	II		L	 **3-(3-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,54 (3H, s), 4,70 (2H, s), 7,26 (1H, d), 7,67 (1H, d), 7,85 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,30 (1H, d), 9,03 (1H, d)	356

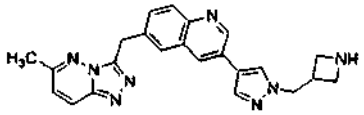
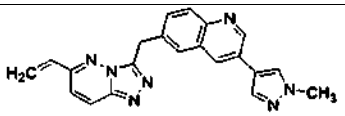
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
151	I	III	R	**Ácido {4 -[5,7-Difluoro-8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il)-acético**	(DMSO-*d*6) 2,50 (3H, s), 4,62 (2H, s), 4,90 (2H, s), 7,22 (1H, d), 6,66 (1H, d), 8,17 (1H, d), 8,45 (1H, s), 8,52 (1H, d), 9,24 (1H, s)	436
152	NA	NA	N	**8-(8-Cloro-[1,2,4]triazol(4,3-[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,91 (3H, s), 4,73 (2H, s), 7,56 (1H, d), 7,73 (1H, dd), 7,82 (1H, s), 7,98 (1H, d), 8,11 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,48 (1H, d), 8,53 (1H, s), 9,22 (1H, d)	376

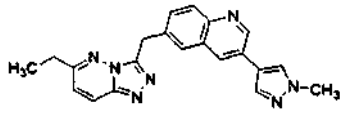
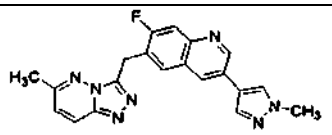
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
153	I	II	HH	 **3-(1-Azetidin-3-il-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol-[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,62 (3H, s), 4,44-4,52 (4H, m), 4,79 (2H, s), 5,52 (1H, quinteto), 7,35 (1H, d), 7,80 (1H, dd), 7,87 (1H, d), 8,04 (1H, d), 8,34 (1H, d), 8,44 (1H, s), 8,61 (1H, d), 8,65 (1H, s), 8,97 (1H, sa), 9,18 (1H, sa), 9,27 (1H, d)	397
154	I	II	R	 **3-(4-[8-(8-metil-[1,2,4]triazol-[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il)-propionamida**	(DMSO-*d*6) 2,60 (3H, s), 2,73 (2H, t), 4,40 (2H, t), 4,75 (2H, s), 6,97 (1H, sa), 7,32 (1H, d), 7,48 (1H, sa), 7,72 (1H, dd), 7,80 (1H, s), 7,98 (1H, d), 8,16 (1H, s), 8,31 (1H, d), 8,42 (1H, s), 8,47 (1H, d), 9,18 (1H, d)	413

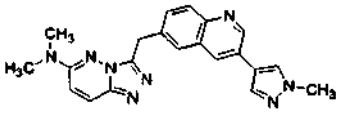
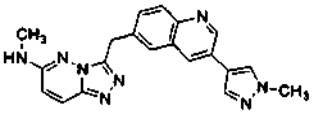
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
155	I	II	HH	 **3-(1-Azetidin-3-ilmetil-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol-[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 3,30 (1H, m), 3,91 (2H, m), 4,04 (2H, m), 4,45 (2H, d), 4,77 (2H, s), 7,31 (1H, d), 7,88 (1H, dd), 7,93 (1H, s), 8,28 (1H, d), 8,51 (1H, s), 8,66 (1H, sa), 8,80 (1H, sa), 8,87 (1H, s), 9,37 (1H, d)	411
156	NA	NA	C	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-vinil-[1,2,4]triazol-[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,90 (3H, s), 4,72 (2H, s), 5,87 (1H, d), 6,44 (1H, d), 6,69 (1H, dd), 7,76 (1H, d), 7,78 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,08 (1H, s), 8,35 (1H, d), 8,37 (1H, s), 8,41 (1H, d), 9,13 (1H, d)	368

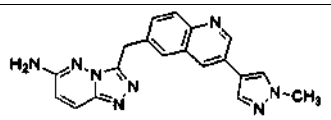
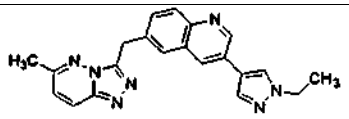
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
157	I	I	T	 **8-(8-Etil-[1,2,4]triazol-[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,26 (3H, t), 2,86 (2H, q), 3,90 (3H, s), 4,70 (2H, s), 7,30 (1H, d), 7,68 (1H, dd), 7,79 (1H, d), 7,92 (1H, d), 8,08 (1H, s), 8,26 (1H, d), 8,38 (1H, s), 8,41 (1H, d), 9,13 (1H, d)	370
158	I	I	O	 **7-Fluoro-3-(1-metil--1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 3,90 (3H, s), 4,70 (2H, s), 7,29 (1H, d), 7,77 (1H, d), 7,82 (1H, d), 8,07 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,37 (1H, s), 8,46 (1H, d), 9,18 (1H, d)	374

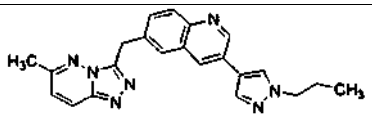
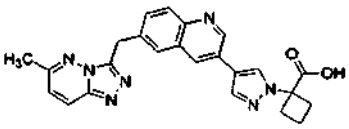
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
159	I	I	Q	 **Dimetil-{3-[3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-8-ilmetil]-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-8-il}-amina**	(DMSO-*d*6) 3,00 (s, 6H), 3,83 (s, 3H), 4,49 (s, 2H) 7,13 (d, 1H), 7,59 (dd, 1H) 7,73 (d, 1H) 7,83 (d, 1H) 7,93 (d, 1H) 8,02 (s, 1H) 8,31 (s, 1H) 8,34 (d, 1H) 9,05 (d, 1H).	385
160	I	I	Q	 **Metil-{3-[3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-8-ilmetil]-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-8-il}-amina**	(DMSO-*d*6) 2,73 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 4,47 (s, 2H) 6,66 (d, 1H), 7,33 (c, 1H) 7,61 (dd, 1H) 7,73 (d, 1H) 7,79 (d, 1H) 7,84 (d, 1H) 8,02 (s, 1H) 8,31 (s, 1H) 8,34 (d, 1H) 9,06 (s, 1H)	371

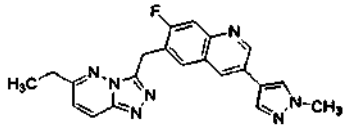
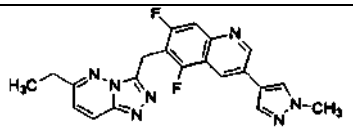
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
161	I	I	Q	 **3-[3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolin-8-ilmetil]-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-8-il}-8-ilamina**	(DMSO-*d*6) 3,83 (s, 3H), 4,45 (s, 2H) 6,67 (d, 1H), 6,73 (s, 2H) 7,55 (m, 2H) 7,83 (d, 1H) 7,87 (d, 1H) 8,01 (s, 1H) 8,30 (s, 1H) 8,32 (d, 1H) 9,05 (s, 1H)	357
162	I	I	R	 **3-(1-Etil-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,43 (t, 3H), 2,54 (s, 3H), 4,19 (c, 2H), 4,70 (s, 2H), 7,27 (d, 1H), 7,67 (dd, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,93 (d 1H), 8,09 (s, 1H), 8,26 (d, 1H), 8,42 (d, 1H), 8,44 (s, 1H), 9,15 (d, 1H)	370

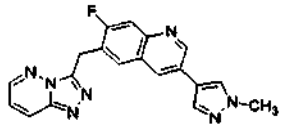
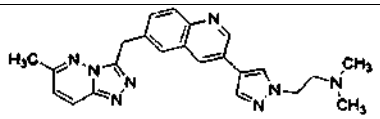
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
163	I	I	R	 **8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-(1-propil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 0,87 (t, 3H), 1,84 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 4,11 (t, 2H), 4,70 (s, 2H), 7,27 (d, 1H), 7,67 (dd, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,93 (d, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,26 (d, 1H), 8,42 (d, 1H), 8,43 (s, 1H), 9,15 (d, 1H)	384
164	I	III	R	 **Ácido 1 -{4-[8-(8-Metil-[1,2,4ltriazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il}-pirazol-1-il)-ciclobutanocarboxílico**	(DMSO-*d*6) 1,69-2,07 (m, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,57-2,69 (m, 4H), 7,20 (d, 1H), 7,59 (dd, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,86 (d, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,19 (d, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,42 (s, 1H), 9,21 (d, 1H)	440

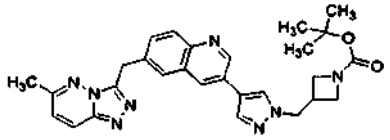
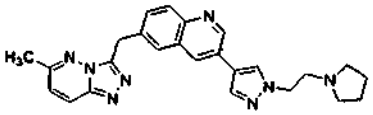
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
165	I	I	O	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-7-fluoro-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,48 (3H, t), 3,11 (2H, c), 3,90 (3H, s), 4,71 (2H, s), 7,32 (1H, d), 7,76 (1H, d), 7,86 (1H, d), 8,07 (1H, s), 8,27 (1H, d), 8,37 (1H, s), 8,45 (1H, d), 9,18 (1H, d)	388
166	I	I	BB	 **8-(8-Etil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-5,7-difluoro-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,24 (3H, t), 2,85 (2H, q), 4,16 (3H, s), 4,95 (2H, s), 7,55 (1H, d), 7,95 (1H, d), 8,44 (1H, s), 8,49 (1H, d), 8,74 (1H, s), 8,79 (1H, d), 9,54 (1H, d)	406

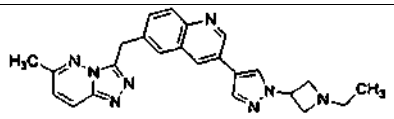
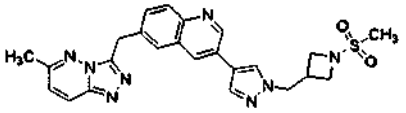
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
167	I	IV	O	 **7-Fluoro-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,90 (3H, s), 4,76 (2H, s), 7,37 (1H, dd), 7,77 (1H, dd), 7,79 (1H, d), 8,06 (1H, s), 8,37 (1H, s), 8,40 (1H, dd), 8,46 (1H, d), 8,65 (1H, dd), 9,18 (1H, d)	360
168	I	I	R	 **Dimetil-(2-(4-[8-(8-metil-[1,2,4|triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quiniolin-3-il]-pirazol-1-il)etil)-amina**	(DMSO-*d*6) 2,18 (6H, s), 2,54 (3H, s), 2,69 (2H, t), 4,24 (2H, t), 4,70 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,67 (1H, dd), 7,75 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,09 (1H, s), 8,26 (1H, d), 8,42 (1H, d), 8,43 (1H, s), 9,14 (1H, d)	413

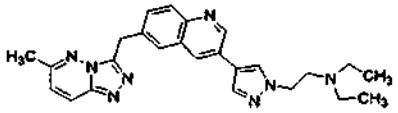
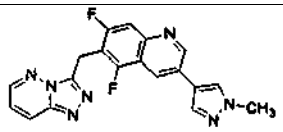
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
169	I	I	GG	 **Ácido *terc*-butílico de l á cido 3 -[4-(8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,*3b*]piridazin-3-ilmetil)-3-il]pirazol-1-ilmetil]-azetidina-1-carboxílico**	(DMSO-*d*6) 1,36 (9H, s), 2,54 (3H, s), 3,01 (1H, m), 3,72 (2H, sa), 3,92 (2H, sa s), 4,38 (2H, d), 4,70 (2H, s), 7,27 (1H, d), 7,67 (1H, dd), 7,75 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,12 (1H, s), 8,26 (1H, d), 8,43 (1H, d), 8,47 (1H, s), 9,14 (1H, d)	511
170	I	I	R	 **8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-3-[1-(2-pirrolidin-1-il-etil)-1*H*-pirazol-4-il)-quinolina**	(DMSO-*d*6, 100˚C) 1,73 (4H, m), 2,52 (4H, m), 3,00 (2H, m), 4,35 (2H, ma), 4,70 (2H, s), 7,22 (1H, s), 7,69 (1H, dd), 7,82 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,06 (1H, s), 8,16 (1H, d), 8,35 (1H, d), 8,35 (1H, s), 9,10 (1H, d)	439

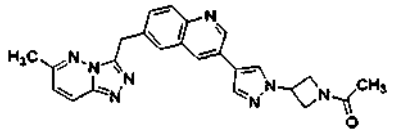
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
171	I	I	DD	 **3-[1-(1-Etil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	DMSO-*d*6) 0,94 (3H, t), 2,53 (2H, q) 2,54 (3H, s), 3,39 (2H, m), 3,73 (2H, m), 4,70 (2H, s), 5,01 (1H, m), 7,27 (1H, d), 7,68 (1H, dd), 7,74 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,17 (1H, s), 8,26 (1H, d), 8,46 (1H, d), 8,61 (1H, s), 9,17 (1H, d)	425
172	I	II	EE	 **3-[1-(1-Metanosulfonill-azetidin-3-ilmetil)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,73 (3H, s), 3,27 (1H, m), 3,96 (2H, m), 4,15 (1H, m), 4,59 (2H, d), 4,89 (2H, s), 7,45 (1H, d), 7,86 (1H, dd), 7,93 (1H, s), 8,13 (1H, d), 8,33 (1H, s), 8,45 (1H, d), 8,62 (1H, d), 8,68 (1H, s), 9,34 (1H, d)	490

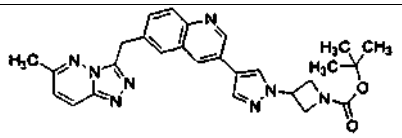
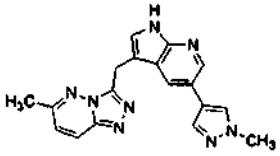
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
173	I	I	R	 **Dietil-(2-[4-(8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1il]-etil)-amina**	(DMSO-*d*6) 0,94-1,19 (6H, ma), 2,55 (3H, s), 3,00-3,20 (4H, ma), 3,20 (2H, ma), 3,64 (2H, ma), 4,61 (2H, ma), 4,71 (1H, s), 7,28 (1H, d), 7,70 (1H, da), 7,77 (1H, sa), 7,95 (1H, d), 8,23 (1H, sa), 8,46 (1H, sa), 8,56 (1H, sa), 9,16 (1H, s)	442
174	I	II	P	 **5,7-Difluoro-3-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-8-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,84 (3H, s), 4,67 (2H, s), 7,31 (1H, dd), 7,64 (1H, d), 8,13 (1H, s), 8,28 (1H, d), 8,43 (1H, s), 8,48 (1H, d), 8,60 (1H, dd), 9,22 (1H, d)	377

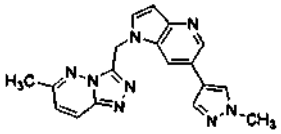
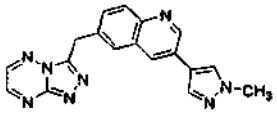
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
175	I	II	CC	 **1-(3-(4-[6-(6-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il]-azetidin-1-il)-etanona**	(DMSO-*d*6) 1,84 (3H, s), 2,55 (3H, s), 4,15-4,18 (m, 1H), 4,34 (1H, t), 4,44-4,46 (1H, m), 4,61 (1H, t), 4,70 (2H, s), 5,29 (1H, m), 7,27 (1H, d), 7,68 (1H, dd), 7,75 (1H, dd), 7,95 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,25 (1H, s), 8,47 (1H, d), 8,65 (1H, s), 9,17 (1H, d)	439

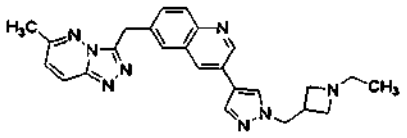
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
176	I	I	GG	 **Éster *terc*-butílico del ácido 3- (4-[8-(8-Metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3-ilmetil)-quinolin-3-il]-pirazol-1-il]-azetidin-1-carboxílico**	(DMSO-*d*6) 1,57 (9H, s), 2,69 (3H, s), 4,33 (2H, ma), 4,49 (2H, ma), 4,85 (2H, s), 5,41 (1H, m), 7,42 (1H, d), 7,83 (1H, dd), 7,90 (1H, s), 8,10 (1H, d), 8,40 (1H, s), 8,41 (1H, d), 8,62 (1H, d), 8,78 (1H, s), 9,33 (1H, d)	498
177	I	II	FF	 **6-Metil-3-[5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrol[2,3-*b*]piridin-3-ilmetil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazina**	(DMSO-*d*6) 2,56 (3H, s), 3,87 (3H, s), 4,57 (2H, s), 7,25 (1H, d), 7,36 (1H, d), 7,84 (1H, d), 8,11 (1H, s), 8,16 (1H, d), 8,21 (1H, d), 8,44 (1H, s), 11,45 (1H, s)	345

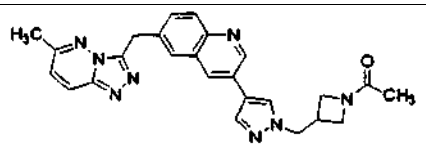
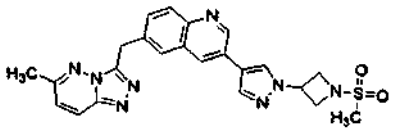
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
178	III	NA	FF	 **6-Metil-3-[8-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrol[3,2-*b*]piridin-1-ilmetil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazina**	(CD_3OD) 2,60 (3H, s), 3,96 (3H, s), 6,03 (2H, s), 6,60 (1H, d), 7,29 (1H, d), 7,76 (1H, d), 7,95 (1H, s), 8,07 (1H, d), 8,09 (1H, s), 8,34 (1H, m), 8,55 (1H, d)	345
179	I	I	II	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]triazin-3-ilmetil-quinolina**	(DMSO-*d*6) 3,90 (3H, s), 4,73 (2H, s), 7,65 (1H, d), 7,76 (1H, s), 7,92 (1H, d), 8,07 (1H, s), 8,37 (1H, s), 8,40 (1H, s), 8,72 (1H, d), 8,73 (1H, d), 9,13 (1H, s)	343

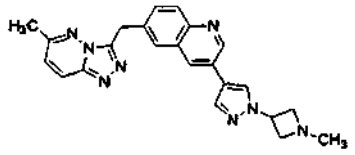
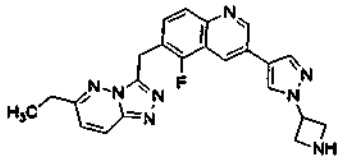
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
180	I	I	DD	 **3-[1-(1-Etil-azetidin-3-ilmetil)-1*H*-pirazol-4-il)-6-(6-metil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 0,84 (3H, t), 2,39 (2H, c), 2,53 (3H, s), 2,82 (1H, quinteto), 2,98 (2H, t), 3,24 (2H, t), 4,33 (2H, d), 4,68 (2H, s), 7,26 (1H, d), 7,66 (1H, dd), 7,72 (1H, d), 7,92 (1H, d), 8,09 (1H, s), 8,24 (1H, d), 8,28 (1H, s), 8,41 (1H, d), 8,43 (1H, s), 9,13 (1H, d)	439

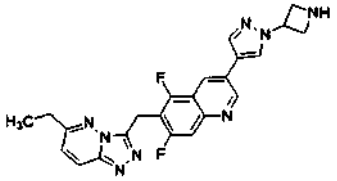
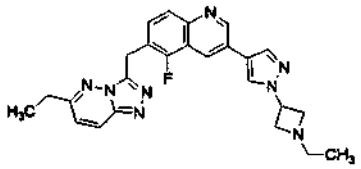
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
181	I	II	CC	 **1-(3-(4-[8-(8-Metil-)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-quinolin-3-il]pirazol-ilmetil)-azetidin-1il)-etanona**	(DMSO-*d*6) 1,72 (3H, s), 2,53 (3H, s), 3,05 (1H, m), 3,68 (1H, dd), 3,89 (1H, t), 3,96 (1H, dd), 4,18 (1H, t), 4,39 (2H, d), 4,69 (2H, s), 7,26 (1H, d), 7,66 (1H, dd), 7,74 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,12 (1H, d), 8,42 (1H, d), 8,45 (1H, s), 9,14 (1H, d)	453
182	I	II	EE	 **3-[1-(1-Metanosulfonil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(8-metil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,55 (3H, s), 3,16 (3H, s), 4,33-4,35 (4H, m), 4,71 (2H, s), 5,34 (1H, quinteto), 7,27 (1H, d), 7,69 (1H, dd), 7,76 (1H, s), 7,95 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,29 (1H, s), 8,48 (1H, d), 8,62 (1H, s), 9,18 (1H, d)	

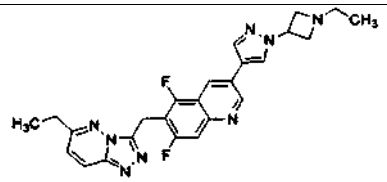
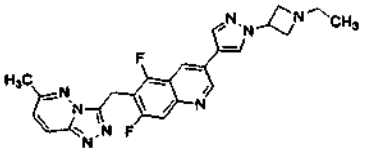
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
183	I	NA	NN	 **3-[1-(1-Metil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(8-metil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 2,35 (3H, s), 2,54 (3H, s), 3,41 (2H, t), 3,73 (2H, t), 4,69 (2H, s), 4,97 (1H, quinteto), 7,26 (1H, d), 7,67 (1H, dd), 7,73 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,16 (1H, s), 8,25 (1H, d), 8,45 (1H, d), 8,60 (1H, s), 9,16 (1H, d)	411
184	I	NA	HH	 **3-(1-Azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-metil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-5-fluoro-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,25 (3H, t), 2,87 (2H, q), 4,35-4,44 (4H, m), 4,72 (2H, s), 5,44 (1H, quinteto), 7,32 (1H, d), 7,70 (1H, t), 7,83 (1H, d), 8,25 (1H, d), 8,47 (1H, s), 8,63 (1H, d), 8,72 (1H, s), 9,22 (2H, sa), 9,28 (1H, d)	429

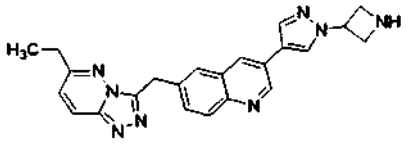
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
185	I	NA	HH	 **3-(1-Azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-etil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-5-difluoro-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,23 (3H, t), 2,87 (2H, c), 4,37-4,45 (4H, m), 4,71 (2H, s), 5,44 (1H, quinteto), 7,32 (1H, d), 7,73 (1H, d), 8,48 (1H, s), 8,62 (1H, d), 8,70 (1H, s), 9,08 (1H, sa), 9,20 (1H, sa), 9,32 (1H, d)	447
186	I	NA	DD	 **3-[1-(1-Etil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-etil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-5-fluoro-quinolina**	(DMSO-*d*6) 0,93 (3H, t), 1,25 (3H, t), 2,55 (2H, c), 2,88 (2H, q), 3,38 (2H, m), 3,71 (2H, m), 4,72 (2H, s), 5,00 (1H, quinteto), 7,31 (1H, d), 7,67 (1H, t), 7,81 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,28 (1H, s), 8,61 (1H, d), 8,74 (1H, s), 9,28 (1H, d)	457

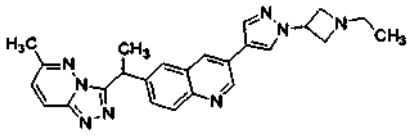
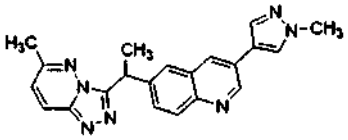
(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
187	I	NA	DD	 **3-[1-(1-Etil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il)-8-(8-etil)-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-5,7-difluoro-quinolina**	(DMSO-*d*6) 0,93 (3H, t), 2,50 (3H, t), 2,57 (2H, c), 2,87 (2H, q), 3,37 (2H, m), 3,71 (2H, m), 4,71 (2H, s), 5,00 (1H, quinteto), 7,31 (1H, d), 7,70 (1H, d), 8,25 (1H, d), 8,28 (1H, s), 8,61 (1H, d), 8,74 (1H, s), 9,33 (1H)	475
188	I	NA	DD	 **3-[1-(1-Etil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-5,7-difluoro-8-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 0,93 (3H, t), 2,51 (2H, q), 2,57 (3H, s), 3,37 (2H, m), 3,71 (2H, m), 4,69 (2H, s), 5,00 (1H, quinteto), 7,29 (1H, d), 7,72 (1H, d), 8,25 (1H, d), 8,29 (1H, s), 8,61 (1H, d), 8,74 (1H, s), 9,33 (1H, d)	461

(continuación)

Ej.	MET IC_{50}	GTL 16 EC_{50}	Método	Estructura	^{1}H-RMN (500 MHz)	MS (m/z)
189	I	NA	HH	 **3-(1-Azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(8-etil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3ilmetil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,25 (3H, t), 2,86 (2H, q), 4,42 (4H, m), 4,71 (2H, s), 5,45 (1H, quinteto), 7,31 (1H, d), 7,72 (1H, dd), 7,81 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,36 (1H, s), 8,48 (1 H, d), 8,58 (1H, s), 9,06 (1H, s a), 9,16 (1H, d), 9,18 (1H, sa)	411

(continuación)

190	I	NA	DD	 **3-[1-(1-Etil-azetidin-3-il)-1*H*-pirazol-4-il]-8-(1-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3il)etil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 0,93 (3H, t), 1,88 (3H, d), 2,51-2,54 (5 H, m), 3,35-3,38 (2H, m), 3,71-3,71 (2H, m), 5,01 (1H, m), 7,22 (1H, d), 7,71 (1H, dd), 7,74 (1H, d), 7,93 (1H, d), 8,16 (1H, d), 8,24 (1H, d), 8,48 (1H, d), 8,60 (1H, s), 9,17 (1H, d)	439
191	I	NA	O	 **3-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il]-8-(1-(8-metil-[1,2,4]triazol[4,3-*b*]piridazin-3il)etil)-quinolina**	(DMSO-*d*6) 1,88 (3H, d), 2,51 (3H, s), 3,90 (3H, s), 5,01 (1H, quinteto), 7,23 (1H, d), 7,70 (1H, dd), 7,74 (1H, s), 7,93 (1H, d), 8,08 (1H, s), 8,24 (1H, d), 8,37 (1H, s), 8,43 (1H, d), 9,13 (1H, d)	370

en las que:

I c-MET IC_{50} ≤ 100nM;
II 100 nM < c-MET IC_{50} ≤ 1 μM;
III 1 μM < c-MET IC_{50} ≤ 10 μM y
IV 10 μM < c-MET IC_{50} ≤ 50 μM.

Bioensayos

Para ensayar las actividades inhibitorias de los compuestos y las composiciones de la presente divulgación se pueden usar los ensayos de quinasa conocidos por aquellos expertos en la materia. Los ensayos de la quinasa incluyen, entre otros, los siguientes ejemplos.

Se evaluaron los datos de cribado utilizando la siguiente ecuación $Z'=1-[3*(\sigma_+ + \sigma_-)/|\mu_+-\mu_-|]$ (Zhang et al., 1999 J Biomol Screening 4(2) 67-73), donde μ significa la media y σ la desviación estándar. El subíndice designa controles positivos o negativos. La puntuación Z' para un ensayo de cribado robusto debe ser ≥ 0,50. El umbral típico = $\mu_+ - 3*\sigma_+$. Cualquier valor que entre dentro del umbral se designa como "acierto".

Ensayo enzimático basado en la luminiscencia de MET

Materiales: Poli Glu-Tyr (4:1) sustrato (Sigma Cat# P-0275), ATP (Sigma Cat#A-3377, FW=551), tampón HEPES, pH 7,5, seroalbúmina bovina (BSA) (Roche 92423420), $MgCl_2$, estaurosporina *(Streptomyces sp.* Sigma Cat#85660-1MG), placa de 385 pocillos de fondo plano blancos Costar (VWR Cat#29444-088). MET quinasa (véase más arriba), Kinase-Glo™ (Promega Cat#V6712).

Soluciones madre: 10 mg/ml de poli Glu-Tyr en agua, conservada a -20ºC; tampón HEPES 100 mM, pH 7,5 (5 ml de sol madre 1M + 45 ml de miliQH_2O); ATP 10mM (5,51mg/ml en dH_2O) conservado a -20˚C (diluido 50 μl en un total de 10 ml de miliQH_2O al día=50 μM ATP solución de trabajo); BSA al 1% (1 g BSA en 100 ml de HEPES 0,1M, pH 7,5, conservado a -20˚C), $MgCl_2$ 100mM; estaurosporina 200 μM, 2X reactivo Kinase-Glo™ (preparado en el momento o conservado a -20ºC).

Ajuste del ensayo estándar para el formato de 384 pocillos (20 μl para la reacción de la quinasa, 40 μl para la reacción de detección 40 μl): $MgCl_2$ 10mM; 0,3 mg/ml de poli Glu-Tyr; BSA al 0,1%; 1 μl del compuesto de ensayo (en DMSO); 0,4 μg/ml de MET quinasa; ATP 10 μM; tampón HEPES 100mM. Los controles positivos contenían DMSO y ningún compuesto de ensayo. Los controles negativos contenían estaurosporina 10 μM. Las reacciones de la quinasa se iniciaron en el tiempo t=0 mediante la adición de ATP. Las reacciones de la quinasa se incubaron a 21ºC durante 60 min, a continuación se añadieron 20 μl de reactivo Kinase-Glo™ a cada pocillo para neutralizar la reacción de la quinasa e iniciar la reacción de luminiscencia. Después de una incubación de 20 min a 21ºC, la luminiscencia se detectó en un luminómetro de lector de placa.

Ensayo enzimático basado en luminiscencia de AurA

Materiales: sustrato de péptido kemptido = LRRASLG (Biopeptide, San Diego, CA), ATP (Sigma Cat#A-3377, FW=551), tampón HEPES, pH 7,5, Brij 35 al 10% (Calbiochem Cat#203728), $MgCl_2$, estaurosporina (*Streptomyces sp.* Sigma Cat#85660-1MG), placa de 385 pocillos de fondo plano blancos (VWR Cat#29444-088), AurA quinasa autofosforilada (véase más abajo), Kinase-Glo™ (Promega Cat#V6712).

Soluciones madre: péptido kemptido 10 mM (7,72 mg/ml en agua), conservado a -20ºC; tampón HEPES 100mM + Brij 35 al 0,015%, pH 7,5 (5 ml de solución madre de HEPES 1M + 75 μl de Brij 35 al 10% + 45 ml de miliQH_2O); ATP 10mM (5,51 mg/ml en dH_2O) conservado a -20ºC (diluido 50 μl en un total de 10 ml de miliQH_2O al día = 50 μM ATP solución de trabajo); $MgCl_2$ 100 mM, estaurosporina 200 μM, 2X reactivo Kinase-Glo™ (preparado en el momento o conservado a -20ºC).

Reacción de autofosforilación de la AurA: se añadieron ATP y $MgCl_2$ a 1-5 mg/ml de AurA a concentraciones finales de 10 mM y 100 mM, respectivamente. La reacción de autofosforilación se incubó a 21˚C durante 2-3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA a una concentración final de 50 mM y las muestras se congelaron instantáneamente con N_2 líquido y se almacenaron a -80˚C.

Ajuste del ensayo estándar para el formato de 384 pocillos: (20 μl para la reacción de la quinasa, 40 μl para la reacción de detección): $MgCl_2$ 10mM; péptido kemptido 0,2 mM; μl del compuesto de ensayo (en DMSO); 0,3 μg/ml de AurA quinasa autofosforilada; ATP 10 μM; tampón HEPES 100mM + tampón Brij al 0,015%. Los controles positivos contenían DMSO y ningún compuesto de ensayo. Los controles negativos contenían estaurosporina 5 μM. Las reacciones de la quinasa se iniciaron en el tiempo t=0 mediante la adición de ATP. Las reacciones de la quinasa se incubaron a 21ºC durante 45 min, a continuación se añadieron 20 μl de reactivo Kinase-Glo™ a cada pocillo para neutralizar la reacción de la quinasa e iniciar la reacción de luminiscencia. Después de una incubación de 20 min a 21ºC, la luminiscencia se detectó en un luminómetro de lector de placa.

Purificación de Met:

Los residuos celulares de la mitad de un cultivo de 12 l de células de insecto Sf9 que expresan el dominio quinasa de Met humana se resuspendieron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,7 y NaCl 250 mM, en un volumen de aproximadamente 40 ml por 1 l de cultivo original. Se añadió un comprimido de cóctel de inhibidores de la proteasa sin EDTA Complete de Roche (Cat# 1873580) por 1 l de cultivo original. La suspensión se agitó durante 1 hora a 4ºC. El sedimento se eliminó por centrifugación durante 30 minutos a 39.800 x g a 4ºC. El sobrenadante se decantó en un vaso de precipitados de 500 ml y 10 ml de una suspensión al 50% de Ni-NTA Agarosa de Qiagen (Cat# 30250) que se había preequilibrado en Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 50mM, glicerol al10%, imidazol 10mM y metionina 10mM y se agitó durante 30 minutos a 4ºC. La mezcla se vertió a continuación en una columna de goteo a 4ºC 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. La proteína se eluyó usando un gradiente gradual con dos volúmenes de columna, cada uno con el mismo tampón que contenía imidazol 50mM, 200mM y 500mM, secuencialmente. El tag con 6 residuos de histidina se escindió durante la noche usando 40 unidades de proteasa de TEV (Invitrogen Cat# 10127017) por 1 mg de proteína dializando en Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM a 4ºC. El tag de 6 residuos de histidina se eliminó pasando la muestra a través de una columna IMAC 5 ml de Pharmacia (Cat# 17-0409-01) cargada con níquel y equilibrada en Tris-HCl 50mM pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM. La proteína escindida unida a la columna de níquel a una baja afinidad se eluyó con gradiente gradual. El gradiente gradual se hizo pasar con 15% y después 80% del lado B (lado A = Tris-HCl pH 7,8 50 mM, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 10mM y metionina 10mM; lado B = Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500mM, glicerol al 10%, imidazol 500mM y metionina 10mM) para 4 volúmenes de columna cada uno. La proteína Met eluyó en el primer etapa (15%), mientras que la Met no escindida y el tag de histidina eluyó en las fracciones del 80%. Las fracciones del 15% se combinaron después del análisis en gel SDS-PAGE confirmando la presencia de Met escindida; se hizo una purificación adicional mediante cromatografía por filtración en gel en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 de grado prep. de Amersham Biosciences (Cat# 17-1069-01) equilibrada en Tris-HCl 50 mM pH 8,5, NaCl 150mM, glicerol al 10% y DTT 5 mM. Las fracciones más puras se combinaron y se concentraron hasta ~10,4 mg/ml mediante centrifugación en una unidad de filtro para centrífuga Amicon Ultra-15 10.000 Da MWCO (Cat# UFC901024).

Ensayos celulares

Se mantuvieron células HCT116 en medio de McCoy 5a suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, glutamina 2mM y 100 unidades de penicilina/100 μg de estreptomicina a 37°C en CO_2 al 5%.

Ensayos de supervivencia celular

Los compuestos se ensayaron por duplicado en los siguientes ensayos. Ensayo en 96 pocillos con XXT: las células se hicieron crecer en medios de crecimiento que contenían diversas concentraciones de compuestos (duplicados) en un placa de fondo plano de 96 pocillos durante 72 horas a 37ºC en CO_2 al 5%. El número de células de partida fue de 5.000 células por pocillo y el volumen fue de 120 ml. Al final de la incubación de 72 horas, se añadieron a cada uno de los pocillos de la placa, 40 ml de mezcla de marcaje con XTT (solución 50:1 del ácido 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenosulfónico hidrato y reactivo de electroacoplamiento: PMS (metilsulfato de N-metildibenzopirazina). Después de un tiempo de 2 a 6 horas, se midió en un espectrofotómetro a 650 nm.

Ensayo de fosforilación de la histona-H3: se sembraron células HCT116 a razón de $1x10^6$ células por disco de 60 x 15 mm (Falcon) en 3 ml de medio de crecimiento (medio de McCoy 5A, FBS al 10%, pen-trep al 1%) y se incubó durante la noche (37ºC, CO_2 al 5%). Al día siguiente, se añadió el compuesto y se incubó durante 1 hora (37ºC CO_2 al 5%). Después de 1 hora, las células se lavaron una vez con 1X PBS y a continuación se lisaron directamente en la placa con 100 μl de tampón de lisis (Tris HCl 125mM pH 6,8 y 2x tampón de carga SDS) y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,7 ml y se colocaron en hielo. Las muestras se sonicaron durante aproximadamente 5 segundos y se colocaron en un bloque térmico a 95ºC durante 3 minutos. Después de calentar, las muestras se colocaron en un NuPage Bis-Tris Gel 4-12% (Invitrogen), seguido de la transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μM (Invitrogen). Después de la transferencia, las membranas se colocaron en un tampón de bloqueo de Qiagen con Tween al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente con un balanceo suave. Se diluyó anticuerpo anti-fosfohistona H3 (Ser 10) (Upstate #06-570) 1:250 en tampón de bloqueo y se añadió a las transferencias y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La transferencia se lavó tres veces con 1X PBS + Tween 20 al 0,1%. Se diluyó anticuerpo secundario anti-conejo-HRP de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. #111-035-003) 1:3000 en tampón de bloque y a continuación se añadió durante 1 h a temperatura ambiente. La transferencia se lavó tres veces con 1X PBS + Tween 20 al 0,1% y se visualizó mediante quimioluminiscencia con sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Pierce #34078).

Ejemplos 25: modelo de xenoinjerto de tumor GTL16

Materiales y procedimientos

Ratones desnudos atímicos hembra (nu/nu de Harlan) de 6-8 semanas con un peso corporal en el intervalo de 18-22

g al principio del estudio. Los animales tuvieron acceso libre al alimento y al agua durante todo el estudio. Los ratones se alojaron en lechos animales de laboratorio Alpha-dri® bed-o-cobs® en jaulas con microaislador estático e irradiadas con un ciclo de 12 horas de luz a una temperatura de 21-23ºC y un 40-60% de humedad. Todos los procedimientos que implicaban la manipulación de animales se llevaron a cabo conforme a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH) y todos los protocolos fueron aprobados por un Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

Análisis Western blot y cuantificación del marcador farmacodinámico: aproximadamente 100 mg de cada tumor se homogeneizó en 2X volúmenes de tampón RIPA (Upstate) más inhibidores de la proteasa (Sigma) usando el Tissuelyser (Qiagen). Se sometieron 80 μg de cada lisado a SDS-PAGE seguido de análisis western blot para detectar phospho-Met (señalización celular), el cual se cuantificó utilizando el sistema de detección Typhoon (GE Life Sciences).

Implantación del tumor

Los xenoinjertos se iniciaron a partir de células tumorales GTL-16 cultivadas y mantenidas por un Departamento de Biología celular. Cada ratón de ensayo recibió una inyección subcutánea de 4 x 10^6 células suspendidas en 100 ml de medio RPMI libre de suero. Los tumores se aleatorizaron en grupos de tratamiento el día 5 cuando el tumor del tamaño alcanzó aproximadamente 150 mm^3. Cada uno de los grupos de dosis contenían n=5 ratones. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula:

$$\textbf{Volumen del tumor} = (w^2 \times l)/2,$$

en la que *w* = anchura y *l* = longitud en nm del tumor.

El peso del tumor se puede estimar asumiendo que 1 mg es equivalente a 1 mm^3 del volumen del tumor.

Análisis de inhibición del crecimiento tumoral (TGI)

El TGI se calculó a partir de la diferencia entre la media de los volúmenes tumorales de los ratones tratados con vehículo y de los ratones tratados con fármaco, expresado como porcentaje.

$$\%TGI = \frac{\text{Media del volumen del tumor}_{control} - \text{Media del volumen del tumor}_{tratados\ con\ fármaco} \times 100}{\text{Mediana del volumen del tumor}_{control}}$$

La MTV se define como la media del volumen tumoral (MTV) para el número de animales, n, que permanecen en el estudio ese día.

Resultados

La Figura 4 muestra los efectos del compuesto 124 administrado como una dosis oral (PO) aguda a 1, 3, 10, 30 mg/kg. El tratamiento se realizó el día 13 cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio del tumor de ~650 mm^3. Tras la administración de la dosis, se sacrificaron n=3 a los tiempos T= 15 min, 2h, 6h, 12h. Los tumores se homogeneizaron en tampón RIPA e inhibidores de la proteasa. Se sometieron 80 μg de lisado a SDS-PAGE seguido de análisis Western blot para detectar la phospho-Met y se cuantificó usando el sistema de imagen Typhoon.

La Figura 6 muestra los efectos de la administración del compuesto 124 por vía oral (PO) at 1, 3, 10 y 30 mg/kg dos veces al día (C12H) durante 14,5 días consecutivos. El tratamiento comenzó el día 6. El último día del tratamiento, 1, 3, 10, 30 mg/kg PO C12H y las dosis habían reducido el volumen medio del tumor en un 32% (p=0,0079), 55% (p<0,0001), 72% (p<0,0001) y 79% (p<0,0001) respectivamente comparado con el volumen medio del tumor del grupo tratado con el vehículo.

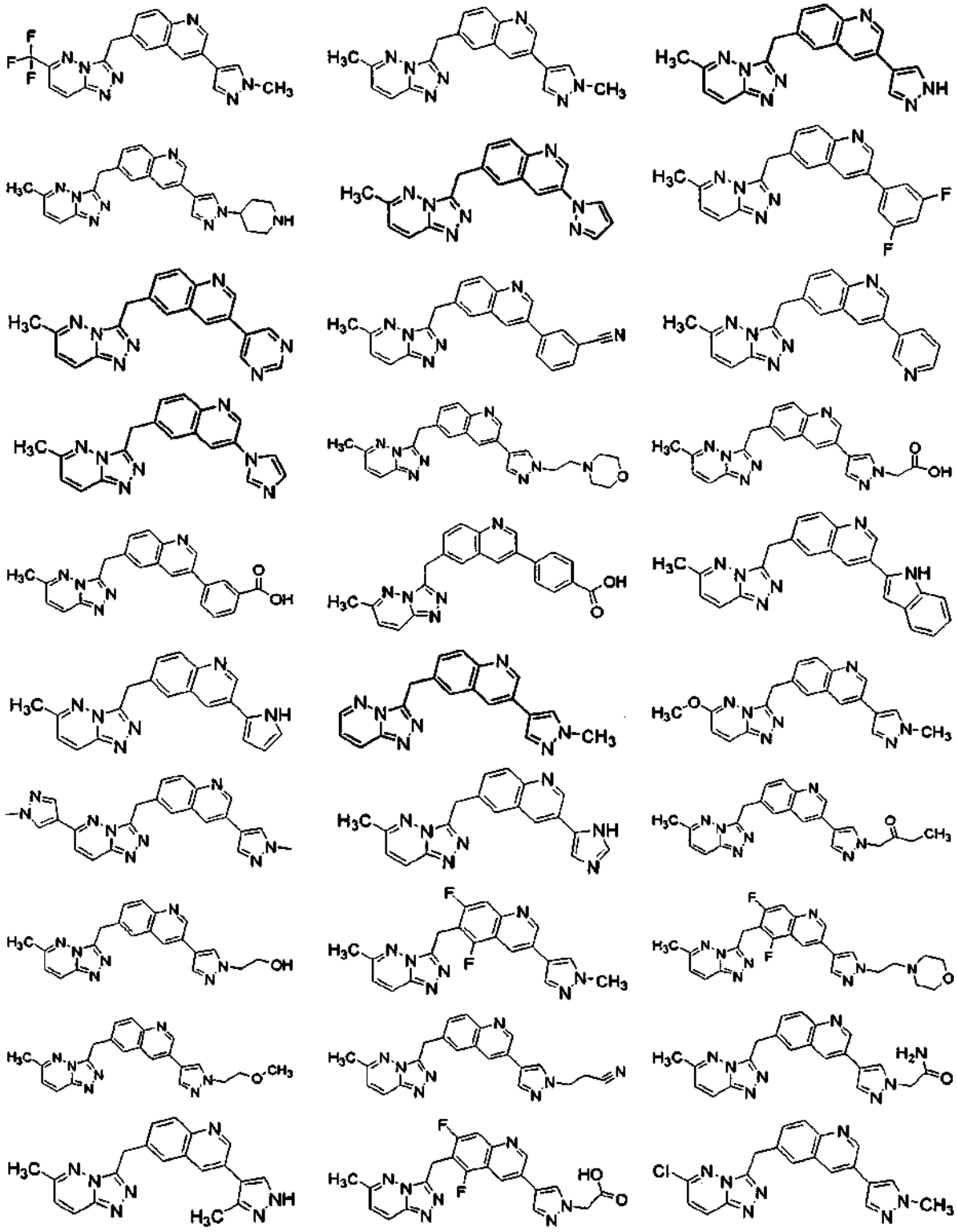
La Figura 7 muestra los efectos de la administración oral del compuesto 124 sobre la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en tumores GTL16 en ratones desnudos. Todos los tratamientos comenzaron el día 6 después de la implantación de las células tumorales. Al final del régimen de administración de 14,5 días, se calculó el %TGI a partir de la diferencia entre la media de los volúmenes del tumor de los ratones tratados con vehículo y de los ratones tratados con fármaco expresado como un porcentaje de la media del volumen del tumor del grupo control tratado con vehículo.

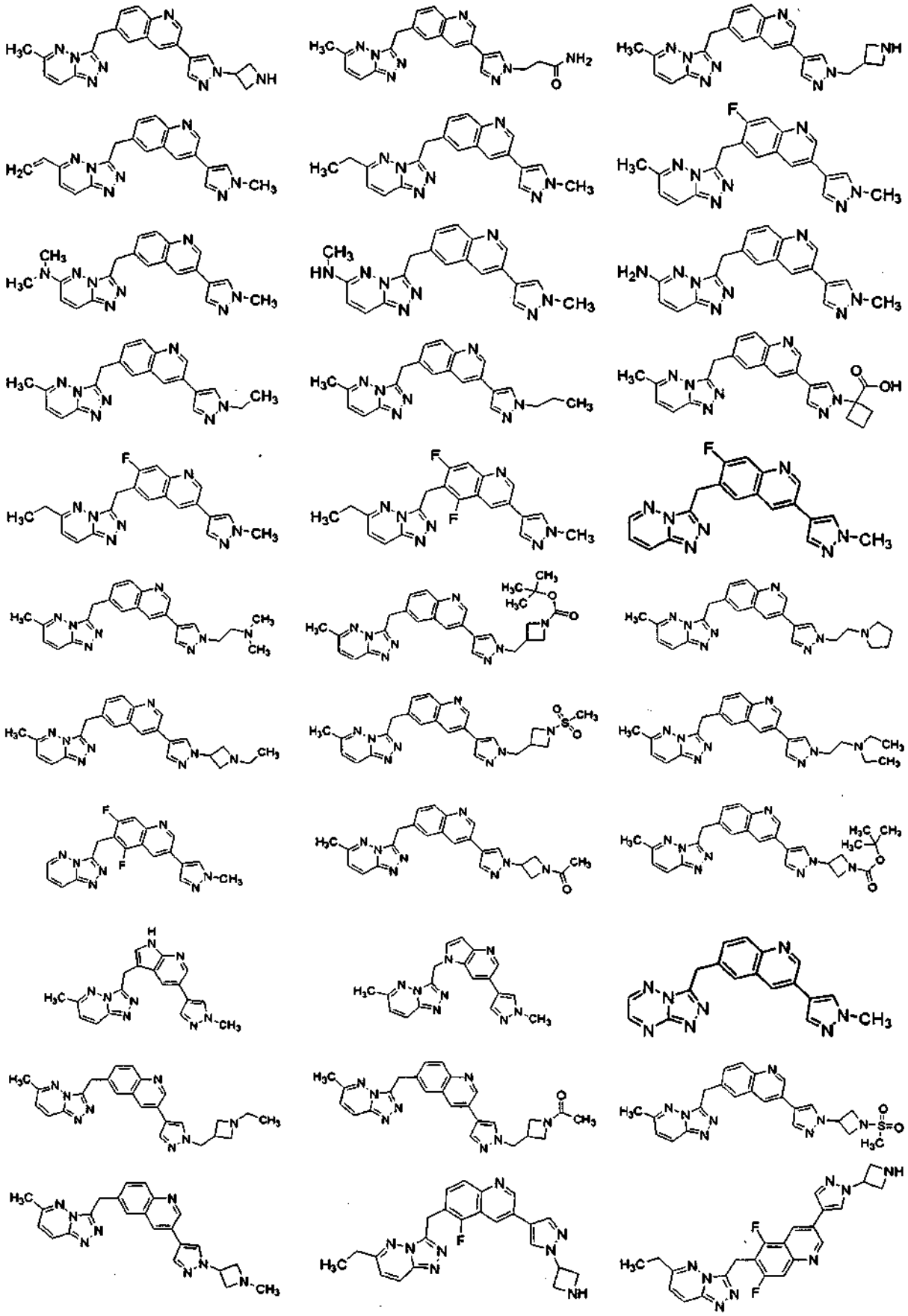
Abreviaturas

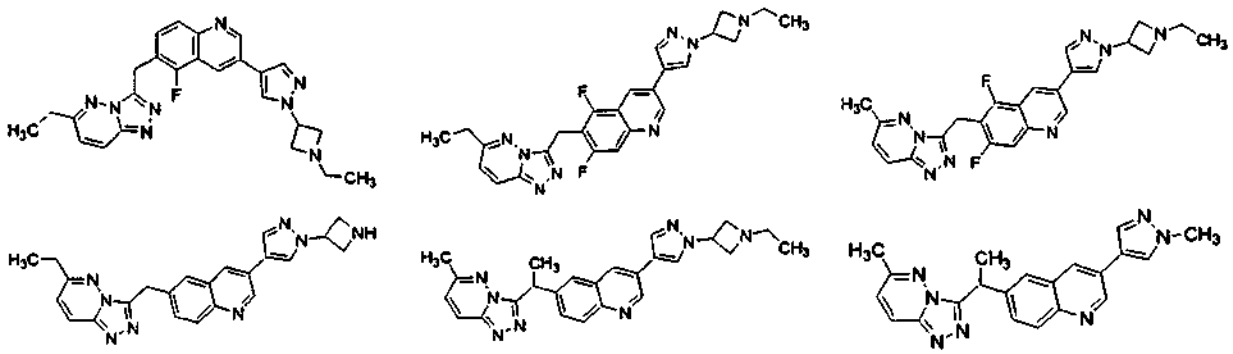
PO	Per Oral;
C12H	Cada 12 horas
C24H	Cada 24 horas
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
NIH	Instituto Nacional del Salud Health
IACUC	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales
MTV	Media del volumen del tumor
FD	Farmacodinamia

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de:







o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer.

3. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 2, 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, leiomiosarcoma, mieloma múltiple, carcinoma de células renales papilares, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello o leucemia.

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 4

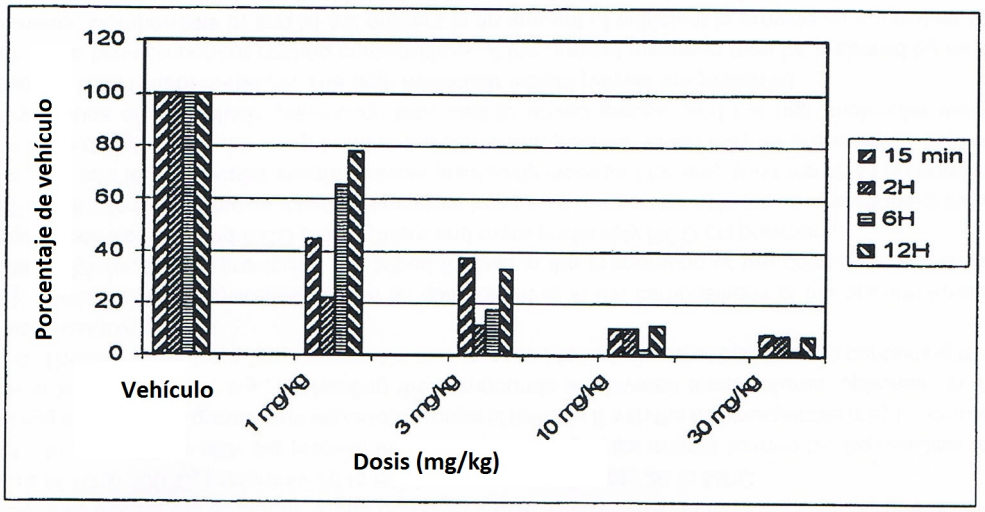
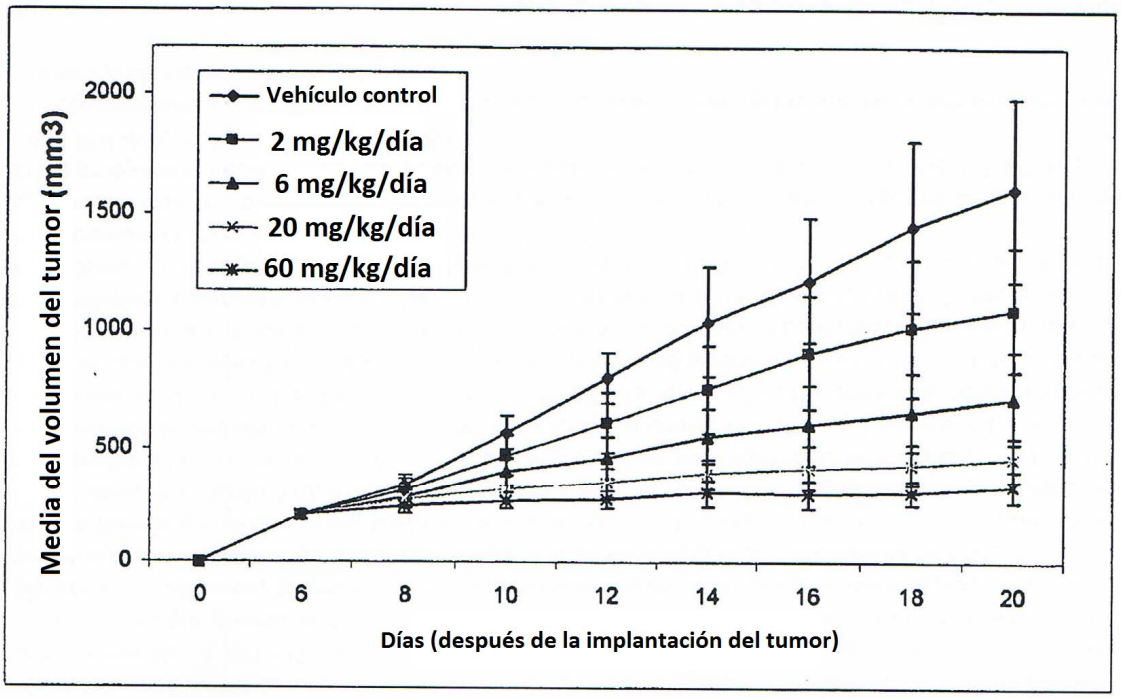

120
100
80
60
40
20
0
Porcentaje de vehículo
15 min
2H
6H
12H
Vehículo
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
Dosis (mg/kg)

FIGURA 6


Vehículo control
2 mg/kg/día
6 mg/kg/día
20 mg/kg/día
60 mg/kg/día
Media del volumen del tumor (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
6
8
10
12
14
16
18
20
Días (después de la implantación del tumor)

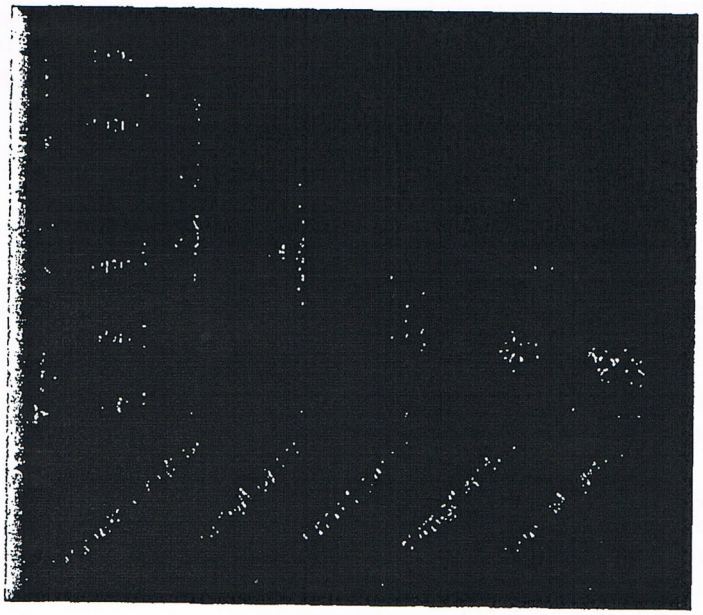



FIGURA 7