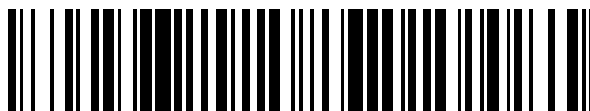


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 039**

51 Int. Cl.:

C07D 231/46 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 409/12 (2006.01)

A61K 31/655 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10785650 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2441457**

54 Título: **Sales de derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituídos, procedimiento de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

11.06.2009 CN 200910052946

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.03.2014

73 Titular/es:

**JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (50.0%)
No. 145 Renmin East Road Xipu District
Lianyungang, Jiangsu 222002, CN y
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO.
LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TANG, PENG CHO;
LÜ, HEJUN;
FEI, HONGBO y
CHEN, YIQIAN**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 452 039 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sales de derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituídos, procedimiento de preparación y uso de los mismos.

5 CAMPO

Esta divulgación se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de nuevos derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituídos, procedimientos para su preparación, composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, y su uso como un agente terapéutico, particularmente como miméticos de trombopoyetina (TPO) y agonistas del receptor de trombopoyetina.

ANTECEDENTES

La trombopoyetina (TPO), también denominada factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF), factor estimulante de la trombocitopoyesis (TSF), ligando de leucemia c-mieloproliferativa (c-Mpl), ligando mpl, o megapoyetina, es una glicoproteína que se ha indicado para regular la producción de plaquetas. Véanse Wendling, F. y col., *Biotherapy* 10(4): 269-77 (1998); Kuter D.J. y col., *The Oncologist*, 1: 98-106 (1996); Metcalf, *Nature* 369: 519-520 (1994).

Bajo ciertas circunstancias, la actividad de la TPO es resultado de la unión de la TPO con el receptor de TPO (también denominado Mpl). El receptor de TPO se ha clonado y su secuencia aminoacídica se ha descrito. Véase Vigon y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 89: 5640-5644 (1992).

La TPO es un polipéptido glicosilado de 332 aminoácidos que desempeña una función clave en la regulación de la megacariocitopoyesis, y en el proceso en el que las plaquetas se producen por megacariocitos de médula ósea. Véanse Kuter y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 11104-11108 (1994); Barley y col., *Cell* 77: 1117-1124 (1994); Kaushansky y col., *Nature* 369: 568-571 (1994); Wendling y col., *Nature* 369: 571-574 (1994); y Sauvage y col., *Nature* 369: 533-538 (1994). La TPO se produce en el hígado pero funciona principalmente en la médula ósea, donde estimula la diferenciación de las células madre en los progenitores de megacariocitos, y estimula la proliferación de megacariocitos, la poliploidización y, en última instancia, entra en las plaquetas en circulación del cuerpo. La TPO es también un regulador primario en situaciones que implican trombocitopenia y en una serie de estudios que incluyen recuentos plaquetarios crecientes, el tamaño plaquetario y la incorporación de isótopos en plaquetas de animales receptores. Véase, Metcalf *Nature* 369: 519-520 (1994). Específicamente, se considera que la TPO afecta a la megacariocitopoyesis de varias formas: (1) provoca un aumento del tamaño y número de megacariocitos; (2) aumenta el contenido de ADN, las formas de poliploidía, y el número de megacariocitos; (3) aumenta la endomitosis de megacariocitos; (4) aumenta el número de megacariocitos maduros; (5) aumenta el porcentaje de células precursoras, el número de células positivas pequeñas de acetilcolinesterasa, el número de células de médula ósea.

Las plaquetas son necesarias para la coagulación de la sangre. Cuando el recuento de plaquetas es muy bajo, el paciente está en riesgo de muerte por hemorragia catastrófica. Por lo tanto, la TPO se ha usado tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de diversos trastornos hematológicos, por ejemplo, enfermedades causadas principalmente por defectos plaquetarios. De forma análoga, La TPO puede ser útil para el tratamiento de afecciones trombocitopénicas, especialmente las derivadas de la quimioterapia, radioterapia, o trasplante de médula para el tratamiento de cáncer o linfoma.

La lenta recuperación de los niveles de plaquetas en los pacientes que padecen trombocitopenia es un problema grave. Es deseable proporcionar un compuesto para el tratamiento de la trombocitopenia que actúe como un mimético de TPO. Estos péptidos se diseñaron para unir y activar el receptor de TPO (TPO-R) pero no tienen ninguna homología de secuencia con la TPO natural. En los últimos años, se ha informado de una serie de miméticos de TPO activos de moléculas pequeñas, que incluyen derivados de poliaminas cíclicas (documento WO 00/28987), tiazol-2-il-benzamidas (documentos WO 01/07423, WO 01/53267), derivados azo-arilo (documentos WO 00/35446, WO 01/17349), 2-aril-naftimidazoles (documentos WO 01/39773, WO 01/53267), y derivados de semicarbazona (documento WO 01/34585). En sistemas basados en células, cada una de estas moléculas puede activar rutas de transducción de señales que dependen de la presencia del receptor de TPO en la membrana celular. Ciertos tipos de compuestos pueden actuar directamente sobre el propio receptor de TPO. Se descubrió que algunos de los compuestos más preferidos de esta serie estimulan la proliferación y diferenciación de las líneas celulares humanas sensibles a TPO y la TPO en cultivos de médula ósea humana que tiene una concentración por debajo de 100 nM.

Varias patentes cedidas a GlaxoSmithKline describieron un análogo de trombopoyetina, el trombopag (documentos WO 2003/098992, WO 01 089457), con buena actividad.

La presente divulgación proporciona una serie de sales farmacéuticamente aceptables de derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituídos, que son miméticos de TPO y agonistas del receptor de TPO más eficaces.

La solicitud internacional N° PCT/CN2009/000001 presentada por el Solicitante de la presente invención el 4 de enero de 2009 describió derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituidos novedosos y su uso como miméticos de trombopoyetina (TPO) y agonistas del receptor de trombopoyetina. Los seis ejemplos (Ejemplo 1, Ejemplo 9, Ejemplo 15, Ejemplo 28, Ejemplo 43 y Ejemplo 52) descritos en la solicitud internacional proporcionaron los compuestos respectivamente como se indica a continuación:

ácido 2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico,
 ácido 5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico,
 ácido 5-(2-hidroxi-3-{N'-(3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico,
 ácido 4-(2-hidroxi-3-[N'-(3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]bifenil-furan-2-carboxílico,
 ácido 5-(3-{N'-(1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico,
 ácido 4-[2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-tiofeno-2-carboxílico,
 y los ésteres de los mismos.

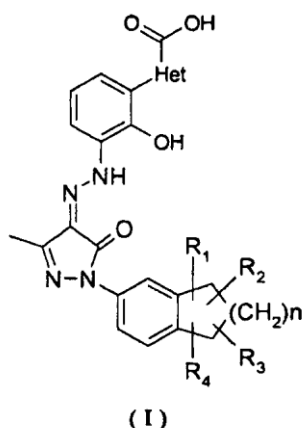
Estos compuestos se ensayaron para mostrar una buena actividad como agonistas del receptor de TPO. Sin embargo, la solicitud internacional N° PCT/CN2009/000001 no describió las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos.

El inventor de la divulgación descubrió que la forma de ácido libre de los derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituidos era escasamente soluble en disolventes convencionales y, por lo tanto, desventajosa para prepararse en una forma de dosificación medicinal, limitando su biodisponibilidad *in vivo*. Es necesario desarrollar nuevas formas de derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituidos para mejorar su solubilidad y absorción farmacocinética, que pueden usarse en la preparación convencional de formas de dosificación.

RESUMEN

Con el fin de superar la insuficiencia de la técnica anterior, la presente invención proporciona sales farmacéuticamente aceptables de nuevos derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituidos, procedimientos para su preparación, composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, y su uso como agente terapéutico, particularmente como miméticos de trombopoyetina (TPO) y agonistas del receptor de trombopoyetina. Las sales tienen buena actividad para tratar la trombocitopenia, una mejor solubilidad, buena actividad *in vivo*, mejor biodisponibilidad, menor toxicidad y son un buen candidato en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la trombocitopenia.

"Los compuestos de la presente divulgación" y "las sales de la presente divulgación" son intercambiables, ambas de las cuales son las sales farmacéuticamente aceptables de derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituidos como se especifica en la reivindicación 1 y se representa por la fórmula (I).



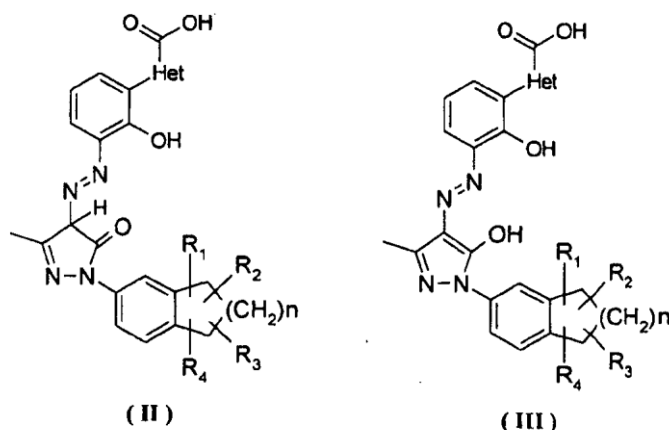
en la que:

Het se selecciona entre el grupo que consiste en fenilo, furilo y tienilo;
 cada uno de R1, R2, R3 y R4 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo;
 n es 0, 1 ó 2;

las sales son sales de adición de bases que se seleccionan entre el grupo que consiste en sal sódica, sal de litio, sal potásica, sal cálcica, sal de magnesio, sal de arginina, sal de lisina, sal de metanamina, sal de dimetilamina, sal de trimetilamina, sal de etilamina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de etanolamina, sal de piperazina, sal de dibencil etilendiamina, sal de meglumina, sal de trometamina, sal de tetrametil amonio cuaternario, sal de tetraetil amonio cuaternario y sal colina.

La expresión "ácido libre" se refiere a derivados azoicos de pirazolona biciclo-sustituídos que tienen la fórmula (I).

El equivalente se refiere a los tautómeros de los compuestos que tienen la fórmula (I), que se conoce bien el experto en la técnica. Los tautómeros de los compuestos que tienen la fórmula (I) incluyen la siguiente fórmula (II) y la fórmula (III), pero sin limitación:

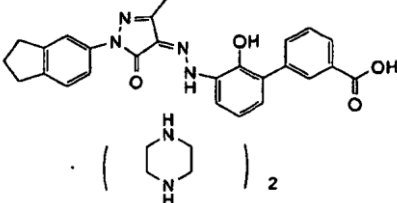
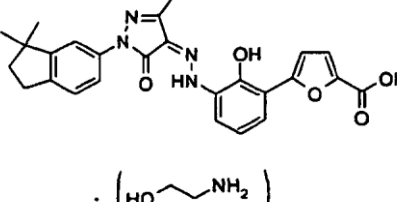
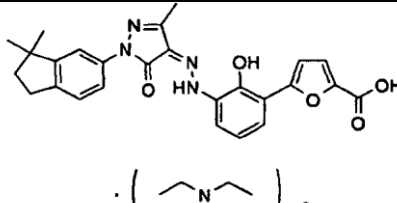
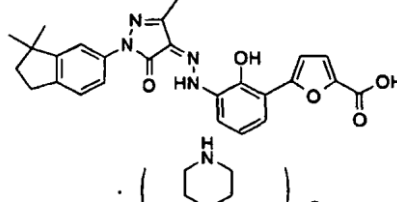
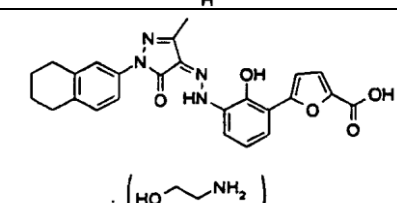
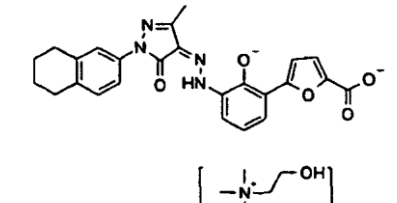
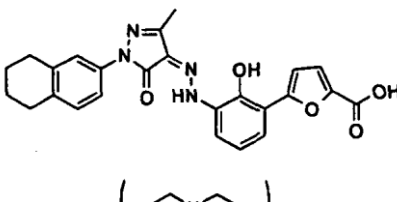


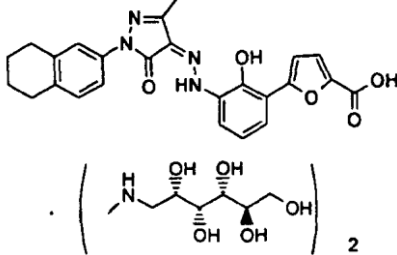
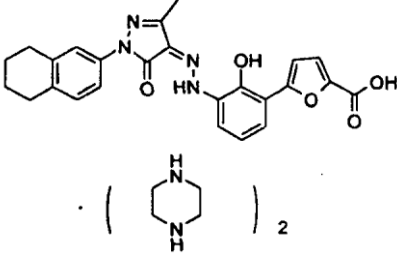
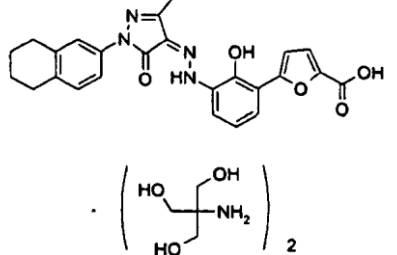
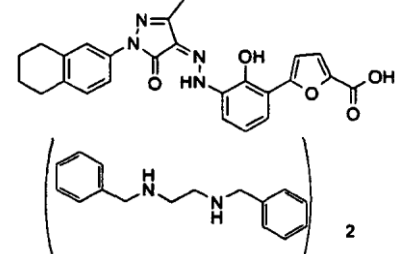
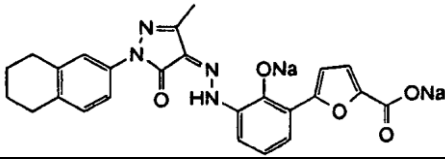
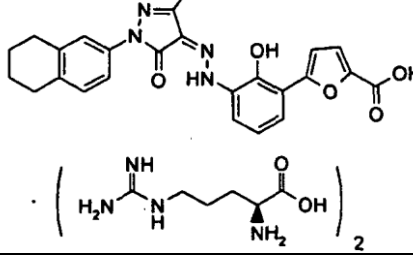
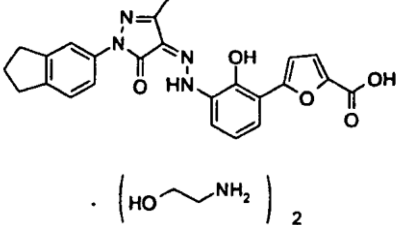
Todos los tautómeros de los compuestos que tienen la fórmula (I) se incluyen en el alcance de la presente divulgación y cada uno de ellos se incluye en la definición de los compuestos que tienen la fórmula (I).

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" en la presente divulgación se refiere a sales de adición de bases farmacéuticamente no tóxicas. Las sales son las formadas entre los compuestos que tienen la fórmula (I) y bases apropiadas, tales como hidróxido de metales alcalinos, aminoácido básico, amina o amonio cuaternario, incluyendo sal sódica, sal de litio, sal potásica, sal cálcica, sal de magnesio, sal de arginina, sal de lisina, sal de metanamina, sal de dimetilamina, sal de trimetilamina, sal de etilamina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de etanolamina, sal de piperazina, sal de dibencil etilendiamina, sal de meglumina, sal de trometamina, sal de tetrametil amonio cuaternario, sal de tetraetil amonio cuaternario y sal colina, preferiblemente sal de dietilamina, sal de etanolamina, sal colina, sal de piperazina, sal de meglumina y sal de trometamina, más preferiblemente sal de etanolamina, sal colina, sal de meglumina y sal de trometamina, y mucho más preferiblemente sal de etanolamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) de la presente divulgación preferiblemente incluyen, pero sin limitación:

Ejemplo N°	Estructura	Compuesto
1		bis-(etanolamina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico
2		bis-(dietilamina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico

3		bis-(piperazina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico
4		bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico
5		bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico
6		bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico
7		bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
8		bis-(colina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
9		bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

10		bis-(meglumina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
11		bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
12		bis-(trometamol) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
13		bis-(dibenciletilendiamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
14		sal disódica del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
15		bis-(L-arginina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
16		bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

17		bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico
18		bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico
19		bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico
20		bis-(dietilamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico
21		bis-(piperazina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico
22		bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-(2-Hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
23		colina del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

La presente divulgación se refiere a un proceso para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos que tienen la fórmula (I), que comprende las etapas de:

5 (a) disolver o suspender el ácido libre de la presente divulgación (el compuesto que tiene la fórmula (I)) en

un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico se selecciona entre el grupo que consiste en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y tetrahidrofurano, preferiblemente tetrahidrofurano;

(b) añadir una base a la mezcla con agitación; donde la base puede ser una base orgánica o inorgánica, tal como hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, aminoácido básico, amina o amonio cuaternario;

(c) obtener las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto que tiene la fórmula (1),

donde las bases inorgánicas incluyen hidróxidos de metales alcalinos que se seleccionan entre el grupo que consiste en el hidróxido sódico, hidróxido de litio, hidróxido potásico, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio; los aminoácidos básicos se seleccionan entre el grupo que consiste en lisina y arginina; las aminas se seleccionan entre el grupo que consiste en metanamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, etanolamina, piperazina, dibencil etilendiamina, meglumina y trometamina; y los amonios cuaternarios se seleccionan entre el grupo que consiste en tetrametil amonio cuaternario, tetraetil amonio cuaternario, hidróxido de colina, preferiblemente dietilamina, etanolamina, hidróxido de colina, piperazina, meglumina y trometamina, más preferiblemente etanolamina, hidróxido de colina, meglumina y trometamina, mucho más preferiblemente etanolamina.

En la etapa (b), la proporción de equivalencia del ácido libre y el hidróxido de metal alcalino, aminoácido básico, amina y amonio cuaternario era preferiblemente 1:5~5:1, más preferiblemente 1:1~1:3, y mucho más preferiblemente 1:1~1:2.

En la etapa (c), la separación de sales preferiblemente incluía la filtración directa de la mezcla de reacción, la concentración de la mezcla de reacción y la recristalización en un disolvente orgánico. Las sales pueden secarse en la condición tal como secado al vacío o secado al aire de alta temperatura.

Las reacciones de formación de sales se realizaron generalmente en condiciones de refrigeración, temperatura ambiente o calentamiento. Sin embargo, cabe mencionar que la temperatura de la reacción está relacionada con la formación de sales, que se conoce bien por el experto en la técnica. El intervalo de las temperaturas de reacción de la presente divulgación es de la temperatura ambiente al punto de ebullición del disolvente de reacción, preferiblemente 0~40 °C. El experto en la técnica puede determinar fácilmente la temperatura de reacción más preferible de las reacciones de formación de sales mediante técnicas convencionales.

La presente divulgación se refiere al uso de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) en la preparación de un agonista del receptor de trombopoyetina.

La presente divulgación se refiere al uso de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trombocitopenia, donde el medicamento se co-administra con un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un factor estimulador de colonias, una citocina, una quimiocina, una interleucina o agonista o antagonista del receptor de citocina, un receptor soluble, un anticuerpo agonista o antagonista de receptor, o uno o más péptidos o compuestos de moléculas pequeñas que tienen el mismo mecanismo con el fármaco.

La presente divulgación se refiere a las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1, para su uso como un medicamento para el tratamiento de trombocitopenia, donde el medicamento se co-administra con un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un factor estimulador de colonias, una citocina, una quimiocina, una interleucina o agonista o antagonista del receptor de citocina, un receptor soluble, un anticuerpo agonista o antagonista de receptor, o uno o más péptidos o compuestos de moléculas pequeñas que tienen el mismo mecanismo con el fármaco, donde el medicamento está en forma de forma de dosificación oral, o el medicamento está en forma de forma de dosificación parenteral.

La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1 y vehículos o agentes diluyentes farmacéuticamente aceptables, donde la composición se co-administra con un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un factor estimulador de colonias, una citocina, una quimiocina, una interleucina y agonista del receptor de citocina. La presente divulgación también se refiere al uso de las composiciones en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trombocitopenia, donde la co-administración comprende usar los fármacos de la presente divulgación al mismo tiempo o sucesivamente.

La presente divulgación se refiere a un proceso para preparar las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) como se especifica en la reivindicación 1 y vehículos o agentes diluyentes farmacéuticamente aceptables, donde el proceso comprende la etapa de combinar los compuestos que tienen la fórmula (I) con vehículos o agentes diluyentes farmacéuticamente aceptables.

En el proceso de preparación de composiciones farmacéuticas, es importante preparar el fármaco de forma apropiada manejada y tratada de forma conveniente, no sólo en vista a una preparación disponible en el mercado, sino también en vista a una preparación de la forma de dosificación farmacéutica que contiene los compuestos activos.

En otro aspecto, es importante ofrecer una curva de concentración en plasma de fármaco fiable, reproducible y constante después de la administración a un sujeto en el proceso de preparación de composiciones farmacéuticas.

Otros factores importantes incluyen durabilidad química, estabilidad en estado sólido y tiempo de almacenamiento del principio activo. Los fármacos que contienen su composición preferiblemente pueden almacenarse relativamente durante mucho tiempo si ningún cambio obvio en el carácter físico y químico de sus componentes activos, tales como composición química, densidad, higroscopicidad y solubilidad.

También es importante proporcionar un fármaco con una química lo más pura posible.

Típicamente, un fármaco puede ofrecer las siguientes ventajas: tratamiento conveniente, preparación de las formas de dosificación del fármaco adecuadas y solubilidad fiable si el fármaco puede obtenerse en una forma estable, tal como una forma cristalina estable, que se conoce bien por el experto en la técnica.

La cantidad eficaz del principio activo en una unidad de dosificación farmacéutica como se ha descrito anteriormente será no tóxica, preferiblemente seleccionada entre el intervalo de 0,001~100 mg/kg de peso total, más preferiblemente 0,001~50 mg/kg. Al tratar un sujeto que necesita un mimético de TPO, la dosis seleccionada se administra preferiblemente por vía oral o parenteral. Las formas parenterales preferidas incluyen formas de administración tópica, rectal, transdérmica, inyección e infusión continua. Las unidades de dosificación orales para administración en seres humanos preferiblemente contienen de 0,05 a 3500 mg de principio activo, mucho más preferiblemente de 0,5 a 1000 mg de principio activo. Se prefiere la administración oral, que usa una dosificación inferior. Sin embargo, también puede usarse la administración parenteral, a dosis elevadas, cuando sea segura y conveniente para el paciente. Las dosificaciones anteriores se refieren a la cantidad preferida del principio activo expresada como el ácido libre.

Se entenderá por un experto en la técnica que la cantidad y separación óptima de las dosis individuales del principio activo dependerá de la naturaleza y extensión de la afección que se va a tratar, la forma, ruta y sitio de administración, y el paciente particular que se va a tratar, y tales óptimos pueden determinarse mediante técnicas convencionales. También se apreciará por un experto en la técnica que el ciclo óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis del principio activo dadas por día durante un número definido de días, puede determinarse por los expertos en la técnica usando pruebas de determinación del ciclo convencional de tratamiento.

Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse por vía oral o parenteral, donde los compuestos pueden prepararse en comprimidos, píldoras, polvos y gránulos usados en diferentes rutas de administración. En las formas de dosificación sólidas anteriores, los componentes activos se mezclan con al menos un tipo de diluyente inerte. De acuerdo con una operación convencional, las formas de dosificación orales también incluyen otra sustancia, tal como lubricantes, emolientes y antioxidantes además del diluyente inerte. Si se hacen en cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación contienen agentes tamponantes. Los comprimidos y píldoras pueden fabricarse en formas de dosificación de liberación sostenida.

Aunque pueden usarse emulsiones no acuosas, las formas de dosificación parenterales de la presente divulgación contienen una solución acuosa estéril y estas formas de dosificación también contienen adyuvantes, por ejemplo antisépticos, agentes humectantes, agentes penetrantes, agentes tamponantes, agentes emulsionantes y dispersantes. El proceso de esterilización puede usar un filtro de retención de bacterias y se añaden agentes esterilizantes a las composiciones que se irradiaron o se calentaron para su esterilización.

En comparación con los ácidos libres, las sales de la presente divulgación tienen las siguientes ventajas:

(1) Las sales de la presente divulgación se disuelven fácilmente en los disolventes convencionales, tales como agua, metanol, ácido clorhídrico al 0,1% y se adaptan para preparar formas de dosificación convencionales, donde la solubilidad de las sales de etanolamina se mejora en ácido clorhídrico al 0,1%.

(2) Las sales de la presente divulgación tienen una mejor estabilidad.

(3) Las sales de la presente divulgación tienen una mejor actividad biológica *in vitro*.

(4) Las sales de la presente divulgación tienen mejores características farmacocinéticas *in vivo*, una mejor absorción, mayor biodisponibilidad y mejor curva de farmacocinética, donde la sal de etanolamina, sal colina, sal de piperazina, sal de meglumina y la sal de trometamina tienen mejores características de la farmacocinética, preferiblemente la sal de etanolamina.

(5) El proceso de preparación de las sales de la presente divulgación tiene la ventaja de tener un alto rendimiento, una alta pureza, ser rápido, cómo y de bajo coste, donde la sal de etanolamina, sal colina, sal de dietilamina y sal de piperazina son más ventajosas en rutas del proceso, aquellas que pueden

cristalizarse directamente.

En comparación con los ácidos libres, las sales de la presente divulgación tienen mejores características de solubilidad, estabilidad, actividad biológica *in vitro* y farmacocinética, preferiblemente sal de dietilamina, sal de etanolamina, sal colina, sal de piperazina, sal de meglumina y sal de trometamina, más preferiblemente sal de etanolamina, sal colina, sal de meglumina y sal de trometamina, mucho más preferiblemente sal de etanolamina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los significados que se describen a continuación.

El término "etanolamina" se refiere a "2-aminoetanol".

El término "colina" se refiere a "(2-hidroxietil)trimetilamina".

El término "meglumina" se refiere a "N-metil-D-meglumina".

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de una o más de las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto descrito en el presente documento o profármacos del mismo, con otros componentes químicos, tales como vehículos fisiológica/farmacéuticamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

El término "estabilidad" se refiere a estabilidad química y estabilidad sólida.

La expresión "estabilidad química" se refiere al almacenamiento de los compuestos de la presente divulgación, incluyendo formas aisladas o formas de dosificación mezcladas con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo dosificación oral, tal como comprimidos, cápsulas y así sucesivamente) en condiciones convencionales con una degradación química o descomposición química insignificante.

La expresión "estabilidad sólida" se refiere al almacenamiento de los compuestos de la presente divulgación, incluyendo formas sólidas aisladas o formas de dosificación mezcladas con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables en formas sólidas (por ejemplo dosificación oral, tal como comprimidos, cápsulas y así sucesivamente) en condiciones convencionales con una transformación en estado sólido insignificante (por ejemplo cristalización, recristalización, cambio de fase en estado sólido, hidratación, deshidratación, solvatación o eliminación del disolvente).

Los ejemplos de la expresión "almacenado en condiciones convencionales" incluyen el intervalo de temperatura de -80 °C a +50 °C (preferiblemente de 0 °C a 40 °C, más preferiblemente a temperatura ambiente, tal como 15 °C~30 °C), el intervalo de presión de 0,1 pa a 2 pa (preferiblemente atmosférica), el intervalo de humedad relativa del 5% al 95% (preferiblemente del 10%~60%) y/o expuesto a una luz UV/visible de 460 lux experimentando un tiempo más prolongado (más de o igual a seis meses).

La expresión "administración parenteral" incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intra-rectal, intravaginal o intraperitoneal, preferiblemente administración oral.

La expresión "higroscopicidad" farmacéutica se refiere al carácter de la capacidad o grado de la sustancia para poder absorber agua bajo cierta temperatura y humedad. Las muestras de prueba son ingredientes satisfechos con el Drug Quality Control Standard. Los envases de los fármacos y las condiciones de almacenamiento pueden remitirse a los resultados de la prueba anterior.

PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DESVELADOS

Con el fin de conseguir el fin de la divulgación, la divulgación emplea las siguientes soluciones técnicas:

El procedimiento de síntesis del compuesto que tiene la fórmula (I) se refiere al ejemplo 1, ejemplo 9, ejemplo 15, ejemplo 28, ejemplo 43 y ejemplo 52 de la solicitud internacional N° PCT/CN2009/000001 presentada el 4 de enero de 2009.

El proceso para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen la fórmula (I) comprende las etapas de:

(a) disolver o suspender el ácido libre de la presente divulgación (el compuesto que tiene la fórmula (I)) en un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico se selecciona entre el grupo que consiste en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y tetrahidrofurano, preferiblemente tetrahidrofurano;

(b) añadir una base a la mezcla con agitación; donde la base puede ser una base orgánica o inorgánica, tal como hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, aminoácido básico, amina o amonio cuaternario;

(c) obtener las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto que tiene la fórmula (I),

donde las bases inorgánicas incluyen hidróxidos de metales alcalinos que se seleccionan entre el grupo que consiste en el hidróxido sódico, hidróxido de litio, hidróxido potásico, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio; las aminas y los amonios cuaternarios se seleccionan entre el grupo que consiste en tetraetil amonio cuaternario, tetraetil amonio cuaternario, etanolamina, colina, lisina, arginina, metanamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, dibencil etilendiamina, meglumina, piperazina y trometamina; preferiblemente dietilamina, etanolamina, piperazina, hidróxido de colina, meglumina y trometamina, más preferiblemente etanolamina, hidróxido de colina, meglumina y trometamina, mucho más preferiblemente etanolamina.

En la etapa (b), la proporción de equivalencia del ácido libre y la base era preferiblemente 1:5~5:1, más preferiblemente 1:1~1:3, y mucho más preferiblemente 1:1~1:2.

En la etapa (c), la separación de sales preferiblemente incluía la filtración directa de la mezcla de reacción, la concentración de la mezcla de reacción y la recristalización en un disolvente orgánico. Las sales pueden secarse en la condición tal como secado al vacío o secado al aire de alta temperatura.

Las reacciones de formación de sales se realizan generalmente en condiciones de refrigeración, temperatura ambiente o calentamiento. Sin embargo, cabe mencionar que la temperatura de la reacción tiene influencia sobre la reacción de formación de sales, que se conoce bien por el experto en la técnica. El intervalo de las temperaturas de reacción de la presente divulgación es de la temperatura ambiente al punto de ebullición del disolvente de reacción, preferiblemente 0~40 °C. El experto en la técnica puede determinar fácilmente la temperatura de reacción más preferible de las reacciones de formación de sales mediante técnicas convencionales.

La presente divulgación se describe adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

EJEMPLOS

Las estructuras de todos los compuestos se identificaron por resonancia magnética nuclear (^1H RMN) o espectrometría de masas (EM).

La RMN se realizó en un espectrómetro Bruker AVANCE-400. Los disolventes apropiados incluían metanol deuterado (CD_3OD), cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) con tetrametilsilano (TMS) como patrón interno y los desplazamientos químicos se registraron como ppm (10^{-6}).

La EM se determinó en un espectrómetro de masas FINNIGAN LCQ Ad (IEN) (Thermo, Modelo: Finnigan LCQ advantage MAX).

La EC_{50} se determinó en un NovoStar ELIASA (BMG Co. Alemania).

El gel de sílice de capa fina se refiere a una placa de gel de sílice Yantai Huanghai HSGF254 o Qingdao GF254. La dimensión de las placas usadas en el análisis por TLC fue de 0,15 mm~0,2 mm, y la dimensión de las placas usadas en la purificación del producto fue de 0,4 mm~0,5 mm.

La cromatografía en columna usó generalmente gel de sílice de malla 200~300 Yantai Huanghai como vehículo.

El análisis por HPLC se determinó en un espectrómetro de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200DAD (columna cromatográfica Sunfire C18 150 x 4,6 mm) y un espectrómetro de cromatografía líquida de alto rendimiento Waters 2695-2996 (columna cromatográfica Gemini C18 150 x 4,6 mm).

Las reacciones de hidrogenación a presión se realizaron con un espectrómetro de hidrogenación Parr 3916EKX y un generador de hidrógeno QL. Las reacciones por microondas se realizaron con un reactor de microondas CEM Discover-S 908860.

En las reacciones de hidrogenación, el sistema de reacción generalmente se dejó al vacío y se cargó con hidrógeno, y la operación se repitió tres veces.

El material de partida conocido de la invención puede prepararse mediante el procedimiento de síntesis convencional en la técnica, o adquirirse en ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc o Dari chemical Company, etc.

A menos que se indique otra cosa, las siguientes reacciones se pusieron en una atmósfera de nitrógeno.

La expresión "atmósfera de nitrógeno" se refiere a que un matraz de reacción está equipado con un globo de nitrógeno de 1 l.

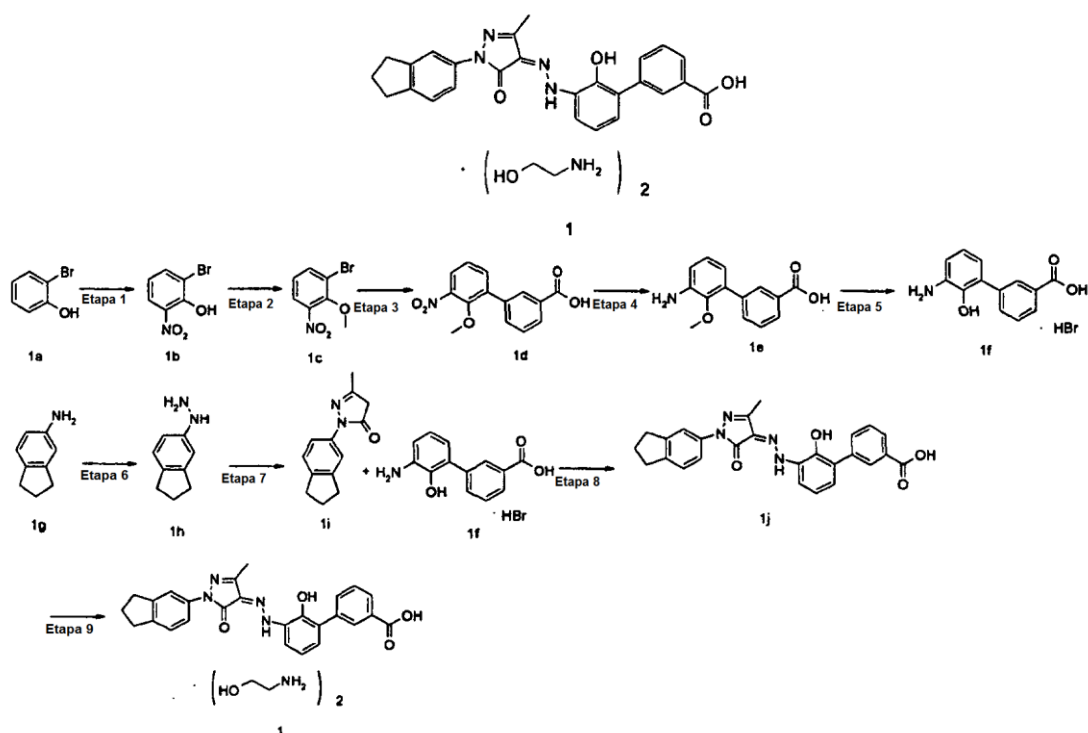
La expresión "atmósfera de hidrógeno" se refiere a que un matraz de reacción está equipado con un globo de hidrógeno de 1 l.

A menos que se indique otra cosa, la solución usada en la siguiente reacción se refiere a una solución acuosa.

El término "TLC" se refiere a cromatografía de capa fina.

El término "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento. Condiciones de ensayo por HPLC: tiempo de realización: 30 min, temperatura de la columna: 30 °C PDA: 230 nm, fase móvil: acetonitrilo:agua (ácido trifluoroacético al 0,1%) = 25:75, caudal: 1,0 mL minuto. Columna cromatográfica: C18, 150 x 4,6 mm Gemini.

Ejemplo 1: bis-(etanolamina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico



Etapa 1

2-Bromo-6-nitro-fenol

Una solución de 60 ml de ácido sulfúrico concentrado diluido con 186 ml de agua se enfrió a temperatura ambiente. A la solución se le añadió nitrato sódico (79,2 g, 0,93 mol). Se añadió gota a gota 2-bromo-fenol **1a** (60 ml, 0,52 mol) a tal velocidad que la temperatura de la reacción se mantuvo por debajo de 25 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El precipitado se disolvió en 320 ml de acetato de etilo. La mezcla se lavó con agua y saturada salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 2-bromo-6-nitro-fenol **1b** (48,2 g, rendimiento del 42,8%) en forma de un sólido de color amarillo.

EM m/z (IEN): 218 [M+1]

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 11,18 (s, 1H), 8,12-8,15 (m, 1H), 7,89-7,91 (m, 1H), 6,88-7,02 (m, 1H)

Etapa 2

1-Bromo-2-metoxi-3-nitro-benceno

Se disolvió 2-bromo-6-nitro-fenol **1b** (46,55 g, 0,214 mol) en 500 ml de acetona seguido de la adición de carbonato

potásico (35,36 g, 0,26 mol) y yodometano (20,1 ml, 0,32 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 70 °C durante 40 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se diluyó con 1300 ml de acetato de etilo y 500 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 ml x 2). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con ácido clorhídrico 4 M y una solución saturada de bicarbonato sódico y después se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 1-bromo-2-metoxi-3-nitro-benceno **1c** (44,59 g, rendimiento del 90,0%) en forma de un sólido de color pardo.
EM m/z (IEN): 234 [M+1]

10 Etapa 3

Ácido 2'-metoxi-3'-nitro-bifenil-3-carboxílico

Se disolvieron 1-bromo-2-metoxi-3-nitro-benceno **1c** (23,25 g, 0,10 mol), ácido 3-carboxifenil-borónico (19,5 g, 117 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (8,86 g, 7,7 mol) en una mezcla de disolvente de 100 ml de una solución 2 M de carbonato sódico y 500 ml de 1,4-dioxano. La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 105 °C durante 43 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y después se añadieron 300 ml de ácido clorhídrico 6 N y 400 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (200 ml x 2). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título ácido 2'-metoxi-3'-nitro-bifenil-3-carboxílico **1d** (53,93 g) en forma de un sólido de color amarillo claro.
EM m/z (IEN): 272 [M-1]
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,11 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,90-7,92 (m, 1H), 7,82-7,84 (m, 1H), 7,21-7,75 (m, 1H), 7,63-7,67 (m, 1H), 7,42-7,46 (m, 1H), 3,45 (s, 3H)

25 Etapa 4

Ácido 2'-metoxi-3'-amino-bifenil-3-carboxílico

Se disolvió ácido 2'-metoxi-3'-nitro-bifenil-3-carboxílico **1d** (0,48 g, 1,74 mmol) en 60 ml de etanol seguido de la adición de 0,5 g de paladio sobre carbono (10%) y formiato amónico (1,1 g, 17,4 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 80 °C durante 20 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida y se secó para obtener el compuesto del título ácido 2'-metoxi-3'-aminobifenil-3-carboxílico **1e** (0,42 g, rendimiento del 93,3%) en forma de un sólido de color blanco.
EM m/z (IEN): 242 [M-1]

Etapa 5

Bromhidrato del ácido 3'-amino-2'-hidroxi-bifenil-3-carboxílico

Empleo de un procedimiento conocido descrito en la solicitud de patente WO 01/89457: Se disolvió ácido 2'-metoxi-3'-amino-bifenil-3-carboxílico **1e** (2,5 g, 10,3 mmol) en 100 ml de ácido bromhídrico (40%). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 120 °C durante una noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título bromhidrato del ácido 3'-amino-2'-hidroxi-bifenil-3-carboxílico **1f** (2,4 g, 88,8%) en forma de un sólido de color caqui.
EM m/z (IEN): 230 [M+1]

Etapa 6

50 Indan-5-il-hidrazina

Se disolvió indan-5-ilamina **1g** (3,59 g, 27,0 mmol) en 20 ml de ácido clorhídrico concentrado tras la refrigeración en un baño de hielo-agua y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añadieron gota a gota 10 ml de una solución de nitrito sódico (1,86 g, 27,0 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 minutos más y se usó en la siguiente reacción.

Después de la refrigeración en un baño de hielo-sal, se disolvió cloruro de estannoso dihidrato (24,4 g, 108,0 mmol) en 10 ml de ácido clorhídrico concentrado seguido de la adición de la mezcla auxiliar que se ha mencionado anteriormente. La mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se hizo reaccionar durante 1,5 horas. Después, la mezcla se ajustó a pH 9 con una solución al 40% de hidróxido sódico tras la refrigeración en un baño de hielo-agua. La mezcla se extrajo con 400 ml de acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida y se secaron para obtener el compuesto del título indan-5-il-hidrazina **1h** (2,05 g, rendimiento del 51,3%) en forma de un sólido de color rojizo.
EM m/z (IEN): 149 [M+1]

65

Etapa 7

2-Indan-5-il-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona

- 5 Se disolvió indan-5-il-hidrazina **1h** (2,05 g, 13,8 mmol) en 50 ml de ácido acético seguido de la adición de acetoacetato de etilo (1,76 ml, 13,8 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante una noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 2-indan-5-il-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **1i** (1,84 g, rendimiento del 62,3%) en forma de un sólido de color amarillo.
- 10 EM m/z (IEN): 215 [M+1]
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,69 (s, 1H), 7,60 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,44 (s, 2H), 2,90 2,97 (m, 4H), 3,21 (s, 3H), 2,07 2,14 (m, 2H)

Etapa 8

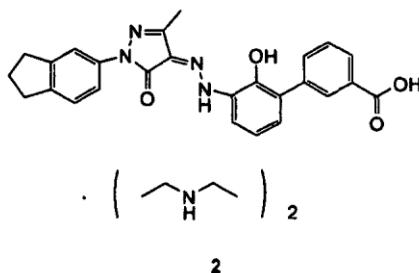
Ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico

- Después de la refrigeración en un baño de hielo-agua, se disolvió el bromhidrato del ácido 3'-amino-2'-hidroxi-bifenil-3-carboxílico **1f** (267 mg, 1,16 mmol) en 10 ml de ácido clorhídrico 1 M seguido de la adición gota a gota de 10 ml de una solución de nitrito sódico (88 mg, 1,28 mmol) y 2-indan-5-il-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **1i** (249 mg, 1,16 mmol). La mezcla se ajustó a pH 8 con una solución saturada de bicarbonato sódico seguido de la adición de 10 ml de etanol. La mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró, se secó y se re-cristalizó en metanol para obtener el compuesto del título ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico **1j** (60 mg, rendimiento del 11,4%) en forma de un sólido de color amarillo.
- 25 EM m/z (IEN): 453 [M-1]
¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13,76 (s a, 1H), 13,03 (s a, 1H), 9,66 (s a, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,96-7,98 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,60-7,82 (m, 5H), 7,28-7,30 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,13-7,17 (m, 2H), 2,86-2,93 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 2,03-2,10 (m, 2H)

Etapa 9

bis-(Etanolamina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico

- 35 Se disolvió el ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico **1j** (454 mg, 1,0 mmol) en 16 ml de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se añadió con etanolamina (143 mg, 2,35 mmol) y se agitó durante 3 horas. La mezcla se filtró, la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (2 ml x 3), y el producto sólido se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(etanolamina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico **1** (553 mg, rendimiento: 96,0%) en forma de un sólido de color rojo intenso.
- 40 EM m/z (IEN): 453 [M-1]
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,13 (s, 1H), 7,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,69 (m, 3H), 7,61 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,45 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,98 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,65 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,95 (m, 4H), 2,86 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,41 (s, 3H), 2,12 (m, 2H)
- 45

Ejemplo 2: bis-(dietilamina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico

- 50 Se disolvió ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico **1j** (150 mg, 0,33 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una solución de color rojo intenso. La solución se añadió gota a gota con dietilamina (48 mg, 0,66 mmol) para formar una solución de color púrpura y se agitó durante 2 horas. El sólido se precipitó en la solución. La mezcla se filtró, la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3), y el producto sólido se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(dietilamina)
- 55

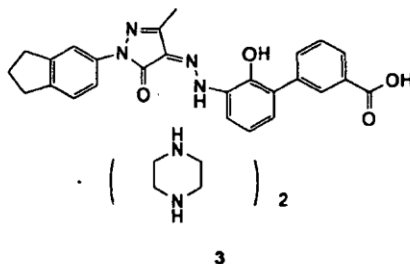
del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico 2 (132 mg, rendimiento: 66,7%) en forma de un sólido de color rojo.

HPLC: 99,2%

EM m/z (IEN): 452,9 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,08(m, 1H), 7,94 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,72 (m, 2H), 7,62 (m, 2H), 7,55 (m, 1H), 7,25 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,07 (m, 1H), 2,89-2,98 (m, 12H), 2,38 (s, 3H), 2,09-2,14 (m, 2H), 1,34 (m, 12H)

Ejemplo 3: bis-(piperazina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico



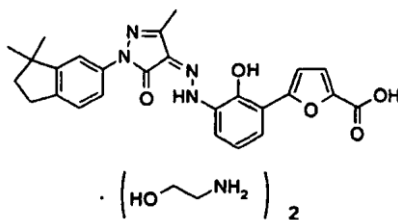
Se disolvió ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico **1j** (150 mg, 0,33 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con piperazina (57 mg, 0,66 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El sólido se precipitó en la solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(piperazina) del ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico **3** (130 mg, rendimiento: 62,8%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

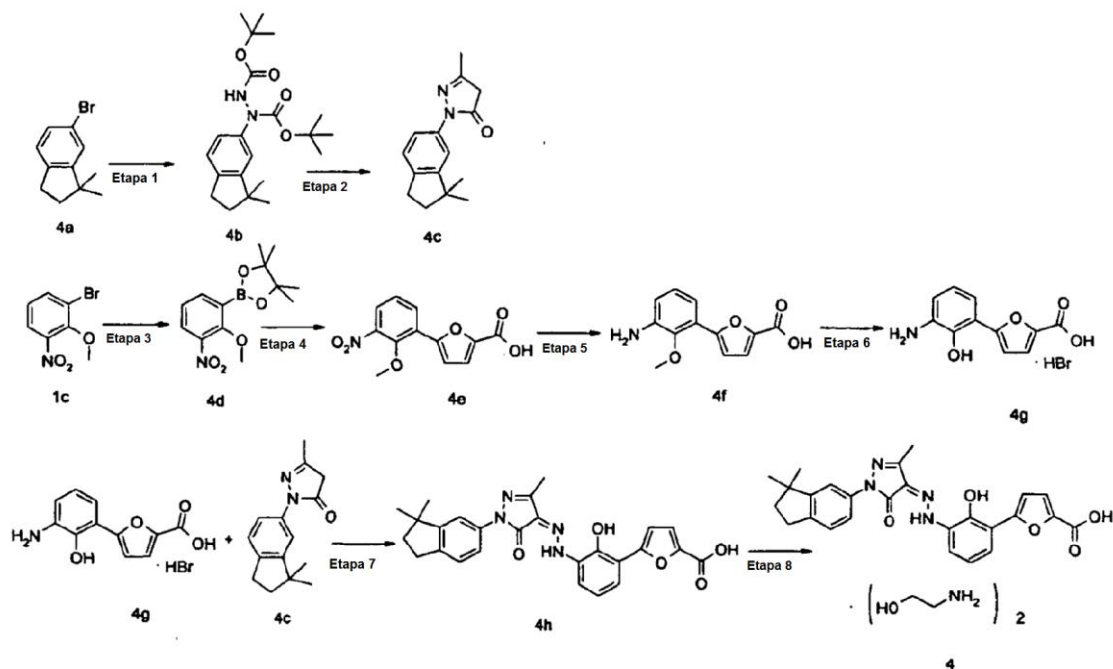
HPLC: 98,5%

EM m/z (IEN): 452,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,10 (s, 1H), 7,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,68 (m, 3H), 7,61 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,15 (m, 1H), 7,00 (m, 1H), 2,89-2,95(m, 4H), 2,84 (s, 16H), 2,39 (s, 3H), 2,09-2,12 (m, 2H)

Ejemplo 4: bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico





Etapa 1

5 1-(3,3-dimetil-inden-5-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato de di-terc-butilo

Se disolvió 6-bromo-1,1-dimetil-indano (preparado usando un procedimiento ya conocido: solicitud de patente WO 2005/066115) **4a** (4,32 g, 19,27 mmol) en 40 ml de tetrahidrofurano y después se añadió gota a gota butil litio (15,67 ml, 1,6 M, 25,05 mmol) a -78 °C. Después de que la mezcla de reacción se hizo reaccionar durante 40 minutos, se añadió entonces una solución de azodicarboxilato de di-terc-butilo (5,32 g, 23,12 mmol) en 30 ml de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se hizo reaccionar durante 3 horas más a -78 °C. La mezcla de reacción se añadió con 5 ml de metanol, después se calentó hasta la temperatura ambiente y se filtró mediante gel de sílice. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 1-(3,3-dimetil-1H-inden-5-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato de di-terc-butilo **5b** (2,70 g, rendimiento del 37,2%) en forma de un sólido de color amarillo.

Etapa 2

2-(3,3-Dimetil-indan-5-il)-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona

Se disolvió 1-(3,3-dimetil-1H-inden-5-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato de di-terc-butilo **4b** (2,70 g, 7,18 mmol) en 100 ml de ácido acético seguido de la adición de 20 ml de ácido trifluoroacético. Después de que la mezcla se hiciera reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió acetoacetato de etilo (0,98 g, 7,54 mmol). Después, la mezcla se calentó a 100 °C y se hizo reaccionar durante 2 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para retirar el ácido acético. La mezcla de reacción se neutralizó por una solución saturada de bicarbonato sódico, y después se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 2-(3,3-dimetil-indan-5-il)-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **5c** (1,0 g, rendimiento del 47,7%) en forma de un sólido de color pardo claro.
EM m/z (IEN): 243 [M+1]

Etapa 3

2-(2-Metoxi-3-nitro-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano

Se disolvieron 1-bromo-2-metoxi-3-nitro-benceno **1c** (67 g, 289 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolano (110 g, 433 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (11,80 g, 14,44 mmol) y acetato potásico (71 g, 724 mmol) en 600 ml de éter dimetílico del ácido eteroxálico. La mezcla se calentó a reflujo durante 17 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 2-(2-metoxi-3-nitro-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano **4d** (50,5 g,

61,9%) en forma de un cristal de color amarillo.

Etapa 4

5 Ácido 5-(2-metoxi-3-nitro-fenil)furan-2-carboxílico

Se disolvieron 2-(2-metoxi-3-nitro-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano **4d** (10 g, 35,85 mmol), ácido 5-bromofuran-2-carboxílico (5,47 g, 28,66 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (2,07 g, 1,79 mmol) y carbonato sódico (7,60 g, 71,66 mmol) en la mezcla de disolvente de 200 ml de 1,4-dioxano y 30 ml de agua. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2,5 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con 150 ml de agua y se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico 1 M. Después, la mezcla se filtró y la torta de filtro se lavó con 50 ml de la mezcla de disolvente de n-hexano/acetato de etilo (V/V = 1:1). El residuo se secó para obtener el compuesto del título ácido 5-(2-metoxi-3-nitrofenil) furan-2-carboxílico **4e** (4,23 g, rendimiento del 56,1%) en forma de un sólido de color gris.

EM m/z (IEN): 262 [M-1]

Etapa 5

20 Ácido 5-(3-amino-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvió ácido 5-(2-metoxi-3-nitro-fenil)furan-2-carboxílico **4e** (4,23 g, 16,09 mmol) en 125 ml de acetato de etilo seguido de la adición de 423 mg de paladio sobre carbono (10%) y formiato amónico (4,054 g, 64,35 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3,5 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título ácido 5-(3-amino-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4f** (2,79 g, rendimiento del 74,4%) en forma de un sólido de color verde claro.

EM m/z (IEN): 232 [M-1]

Etapa 6

30 Bromhidrato del ácido 5-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvió ácido 5-(3-amino-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4f** (2,79 g, 11,97 mmol) en 25 ml de diclorometano seguido de la adición gota a gota de tribromuro de boro (23,9 ml, 2,0 M). La mezcla de reacción se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se concentró a presión reducida después de añadir 5 ml de metanol. El residuo se diluyó con 100 ml de acetato de etilo y se agitó durante 1 hora. Después, la mezcla se filtró y la torta de filtro se secó para obtener el compuesto del título bromhidrato del ácido 5-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4g** (1,24 g, rendimiento del 47,2%) en forma de un sólido de color amarillo.

EM m/z (IEN): 218 [M-1]

40

Etapa 7

45 Ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1, 5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvió bromhidrato del ácido (Z)-5-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4g** (333 mg, 1,1 mmol) en ácido clorhídrico (3,7 ml, 1 M) tras la refrigeración en un baño de hielo-agua seguido de la adición gota a gota de 1,5 ml de una solución de nitrito sódico (85 mg, 1,22 mmol). Después de que la mezcla se hiciera reaccionar durante 20 minutos, se añadieron sucesivamente 2-(3,3-dimetil-indan-5-il)-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **5c** (242 mg, 1,0 mmol), bicarbonato sódico (1,4 g, 16,67 mmol) y 3 ml de etanol. La mezcla de reacción se hizo reaccionar durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y a la torta de filtro se le añadieron 20 ml de agua. La mezcla se ajustó a pH 3-4 con ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se filtró y la torta de filtro se secó y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4h** (190 mg, rendimiento del 40,3%) en forma de un sólido de color rojo.

EM m/z (IEN): 470,9 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13,74(s a, 1H), 13,15(s a, 1H), 9,99(s a, 1H), 7,71 (m, 3H), 7,55 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,20 (m, 2H), 7,15 (m, 1H), 2,86 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,33 (s, 3H), 1,92 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,26 (s, 6H)

60

Etapa 8

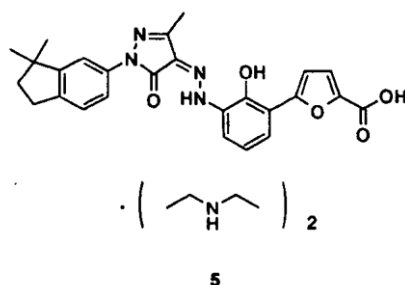
65 bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvió ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4h** (2,3 g, 4,87 mmol) en 20 ml de tetrahidrofurano. La solución se añadió con etanolamina (594 mg, 9,75 mmol) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se filtró, la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(etanolamina) del ácido (Z)-S-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4** (2,5 g, rendimiento: 86,4%) en forma de un sólido de color negro.

EM m/z (IEN): 470,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,57 (m, 4H), 7,19 (m, 1H), 7,03 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,71 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,73 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,98 (m, 4H), 2,88 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,36 (s, 3H), 1,96 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,29 (s, 6H)

Ejemplo 5: bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico



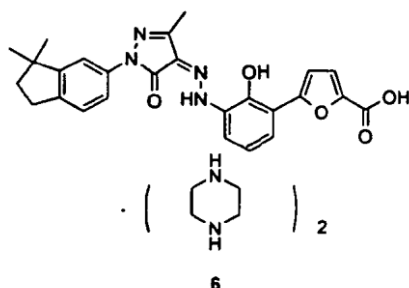
Se disolvió ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4h** (150 mg, 0,32 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con dietilamina (46 mg, 0,63 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución se concentró a presión reducida, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 10:1), y el producto sólido se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis(dietilamina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **5** (170 mg, rendimiento: 86,7%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 94,6%

EM m/z (IEN): 471,9 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,60 (m, 4H), 7,19 (m, 1H), 7,04 (m, 1H), 6,87 (m, 2H), 2,98 (c, J = 7,2 Hz, 8H), 2,89 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,36 (s, 3H), 1,96 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 12H), 1,25 (s, 6H)

Ejemplo 6: bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico



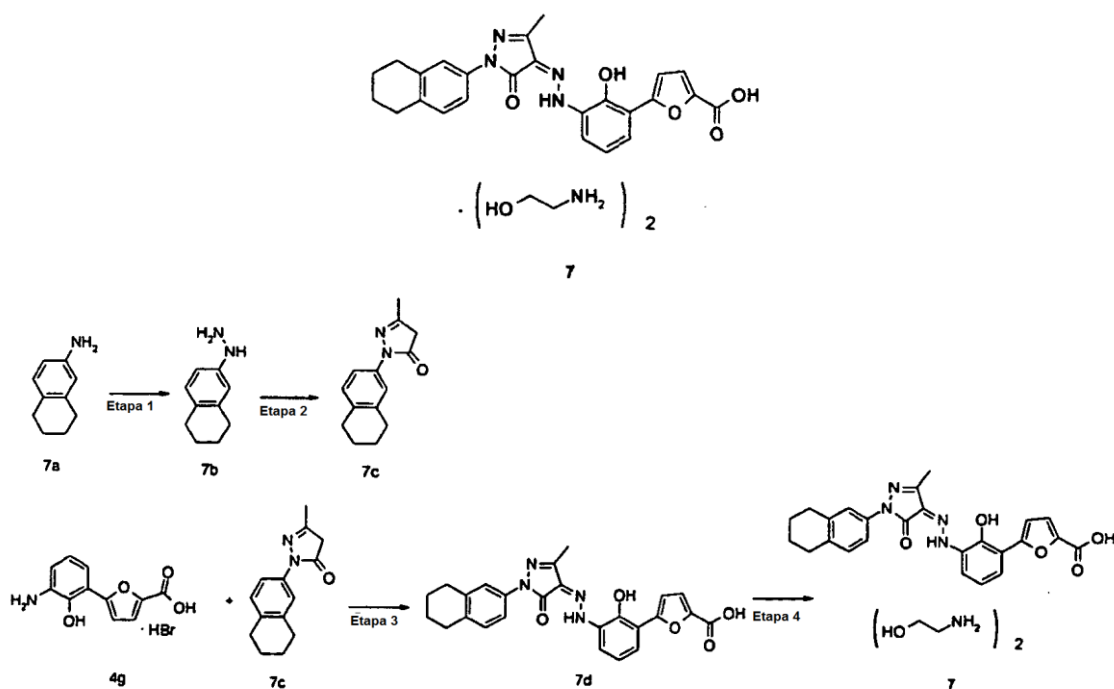
Se disolvió ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4h** (150 mg, 0,32 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con piperazina (55 mg, 0,64 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró, la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3), y el producto sólido se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **6** (158 mg, rendimiento: 77,1%) en forma de un sólido de color rojo.

HPLC: 99,28%

EM m/z (IEN): 471,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,64-7,66 (m, 3H), 7,55 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,21 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,04 (m, 1H), 6,87-6,88 (m, 2H), 3,01 (s, 16H), 2,90 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,38 (s, 3H), 1,97 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,29 (s, 6H)

Ejemplo 7: bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



Etapa 1

(5,6,7,8-Tetrahidro-naftalen-2-il)-hidrazina

Se disolvió 5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-ilamina **7a** (3,68 g, 25,0 mmol) en 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se agitó durante 10 minutos tras la refrigeración en un baño de hielo-agua. Se añadieron gota a gota 10 ml de una solución de nitrito sódico (1,72 g, 25,0 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 minutos más y se usó en la siguiente reacción.

Después de la refrigeración en un baño de hielo-sal, se disolvió cloruro estannoso dihidrato (22,6 g, 100 mmol) en 10 ml de ácido clorhídrico concentrado seguido de la adición de la mezcla auxiliar que se ha mencionado anteriormente. La mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se hizo reaccionar durante 1,5 horas. Después, la mezcla se ajustó a pH 9 con una solución al 40% de hidróxido sódico. La mezcla se extrajo con 400 ml de acetato de etilo, después los extractos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida y se secaron para obtener el compuesto del título (5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-hidrazina **7b** (2,19 g, rendimiento del 53,7%) en forma de un aceite de color amarillo.

EM m/z (IEN): 163 [M+1]

Etapa 2

5-Metil-2-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-2,4-dihidro-pirazol-3-ona

Se disolvió (5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-hidrazina **7b** (2,0 g, 12,3 mmol) en 50 ml de ácido acético seguido de la adición de acetoacetato de etilo (1,57 ml, 12,3 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante una noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título 5-metil-2-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **7c** (1,58 g, rendimiento del 56,2%) en forma de un aceite incoloro.

EM m/z (IEN): 457 [2M+1]

¹H RMN (CDCl₃): δ 7,54-7,58 (m, 2H), 7,09 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,43 (s, 2H), 2,77-2,81 (m, 4H), 2,21 (s, 3H), 1,80-1,83 (m, 4H).

Etapa 3

Ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvió bromhidrato del ácido 5-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4g** (292 mg, 0,98 mmol) en 3,3 ml de ácido clorhídrico 1 M tras la refrigeración en un baño de hielo-agua seguido de la adición gota a gota de 1,3 ml de una solución de nitrito sódico (74 mg, 1,07 mmol). Después de que la mezcla se agitara durante 20 minutos, se añadió 5-metil-2-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **7c** (200 mg, 0,88 mmol). La mezcla se ajustó a pH 8~9 mediante una adición en lotes de una solución de bicarbonato sódico (1,226 g, 14,6 mmol). Las burbujas generadas se inactivaron con 2 ml de etanol. La mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se hizo reaccionar durante una noche. La mezcla se filtró y la torta de filtro se disolvió en 20 ml de agua. Después de mezclarla bien, la mezcla se ajustó a pH 3~4 con ácido clorhídrico concentrado, se filtró y se secó. El producto en bruto se purificó por HPLC para obtener el compuesto del título ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (160 mg, rendimiento del 39,8%) en forma de un sólido de color rojo.

EM m/z (IEN): 457 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,71(d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,63 (m, 2H), 7,56 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,22 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,13 (m, 2H), 2,75 (m, 4H), 2,33 (s, 3H), 1,76 (m, 4H)

Etapas

bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

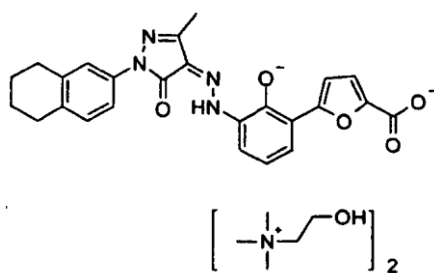
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (3,3 g, 7,2 mmol) en 15 ml de tetrahidrofurano. La solución de reacción se añadió gota a gota lentamente con etanolamina (0,88 g, 13 mmol), y se agitó durante 1,5 horas a 15~20 °C. Una gran cantidad de sólido se precipitó en la solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (10 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7** (3 g, rendimiento: 74%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 99,3%

EM m/z (IEN): 456,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CH₃OD): δ 7,51 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44-7,46 (m, 3H), 6,93-6,98 (m, 2H), 6,88 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,67 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,61 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,86 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,65-2,70 (m, 4H), 2,24 (s, 3H), 1,70-1,72 (s, 3H)

Ejemplo 8: bis-(colina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



8

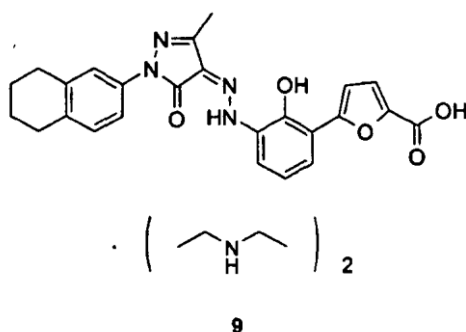
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con una solución al 45% de hidróxido de colina en metanol (45 mg, 0,44 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(colina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **8** (140 mg, rendimiento: 96,6%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 98,82%

EM m/z (IEN): 457,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,08 (m, 3H), 6,91 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,96 (m, 4H), 3,45 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,18 (s, 18H), 2,80 (m, 4H), 2,38 (s, 3H), 1,84 (m, 4H)

Ejemplo 9: bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



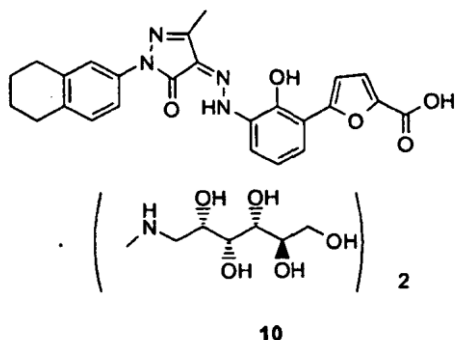
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió gota a gota con dietilamina (32 mg, 0,44 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, y la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3), el sólido se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **9** (77 mg, rendimiento: 58,3%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 99,1%

EM m/z (IEN): 457,9 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,59(m, 4H), 7,08 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,82 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 2,99 (c, J = 7,2 Hz, 8H), 2,79 (m, 4H), 2,36 (s, 3H), 1,82 (t, J = 3,2 Hz, 4H), 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 12H)

Ejemplo 10: bis-(meglumina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



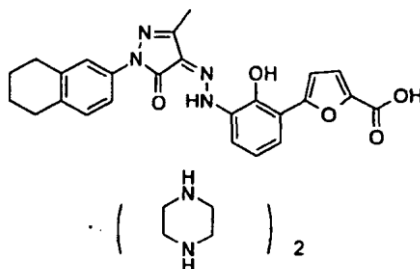
Se suspendió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con meglumina (85 mg, 0,44 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución resultante se añadió con 4 ml de metanol y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título bis-(meglumina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **10** (168 mg, rendimiento: 90,8%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 97,7%

EM m/z (IEN): 457,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,56 (m, 4H), 7,06 (m, 2H), 6,98 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,75 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 3,77 (m, 2H), 3,63 (m, 6H), 3,11 (m, 4H), 2,76 (m, 4H), 2,64 (s, 6H), 2,33 (s, 3H), 1,79 (m, 4H)

Ejemplo 11: bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



11

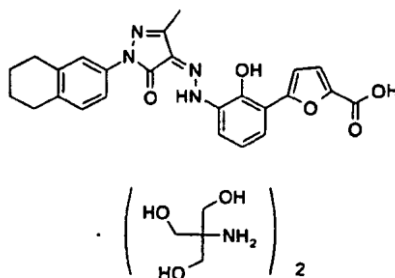
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con piperazina (37 mg, 0,44 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **11** (120 mg, rendimiento: 87,6%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 98,8%

EM m/z (IEN): 457,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,59(m, 4H), 7,08 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,82 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,00 (s, 16H), 2,78 (m, 4H), 2,36 (s, 3H), 1,81 (m, 4H)

Ejemplo 12: bis-(trometamol) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



12

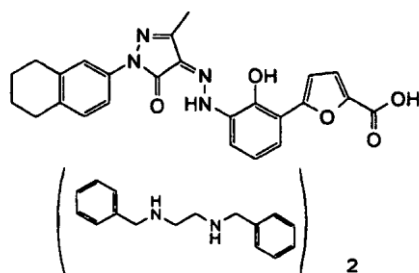
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con trometamol (53 mg, 0,44 mmol) para formar una solución de color pardo, y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(trometamol) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **12** (142 mg, rendimiento: 92,8%) en forma de un sólido de color oscuro.

HPLC: 94,0%

EM m/z (IEN): 457,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,58(m, 4H), 7,05 (m, 2H), 6,96 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,90 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,65 (s, 12H), 2,76 (m, 4H), 2,33 (s, 3H), 1,80 (m, 4H)

Ejemplo 13: bis-(dibenciletilendiamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



13

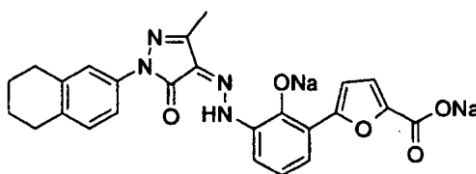
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con dibenciletilendiamina (104 mg, 0,44 mmol) para formar una solución de color pardo, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se añadió con 4 ml de metanol y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título bis-(dibenciletilendiamina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **13** (167 mg, rendimiento: 81,8%) en forma de un sólido de color oscuro.

HPLC: 96,8%

EM m/z (IEN): 457,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,52-7,54 (m, 3H), 7,39 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,24-7,28 (m, 20H), 7,01-7,04 (m, 2H), 6,65-6,72 (m, 1H), 3,89 (s, 8H), 3,01 (s, 8H), 2,73 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 1,78 (m, 4H)

Ejemplo 14: Sal disódica del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



14

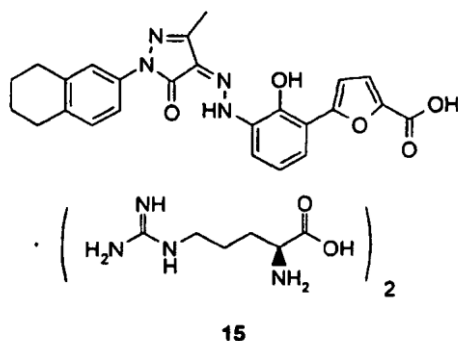
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (110 mg, 0,24 mmol) en 4 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió gota a gota con una solución 1 M de hidróxido sódico (0,4 ml, 0,44 mmol) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, después el filtrado se añadió con 4 ml de metanol y se concentró a presión reducida. El sólido resultante se lavó con hexano para obtener el compuesto del título sal disódica del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-di-hidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **14** (115 mg, rendimiento: 81,8%) en forma de un sólido de color oscuro.

HPLC: 96,8%

EM m/z (IEN): 457,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,79(dd, J1 = 7,6 Hz, J2 = 1,2 Hz, 1H), 7,52 (m, 3H), 7,18 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,05 (m, 2H), 6,70 (m, 1H), 2,78 (m, 4H), 2,41 (s, 3H), 1,82 (m, 4H)

Ejemplo 15: bis-(L-arginina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



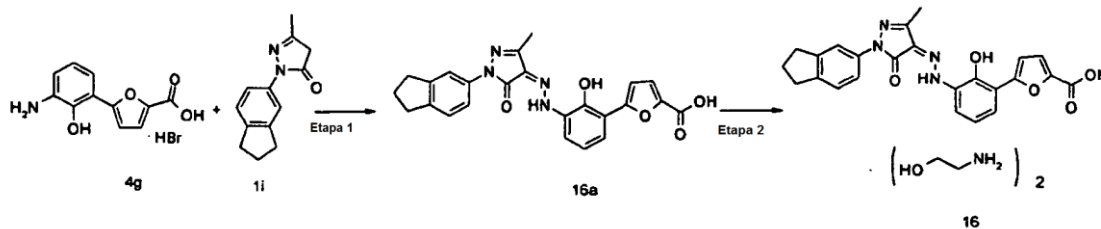
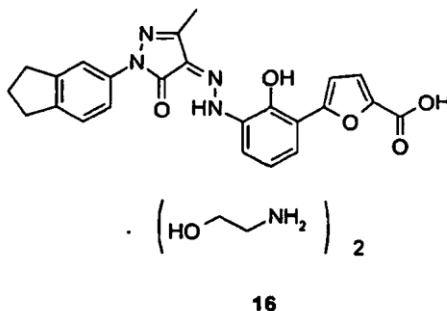
Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-(3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **7d** (100 mg, 0,22 mmol) en 5 ml 1 de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con L-arginina (76 mg, 0,44 mmol) y 2 ml de agua, se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción se concentró a presión reducida, se añadió con 5 ml de acetato de etilo. El sólido se precipitó en la solución, se filtró, después la torta de filtro se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(L-arginina) del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-(3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-di-hidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **15** (168 mg, rendimiento: 95,5%) en forma de un sólido de color oscuro.

HPLC: 97,5%

EM m/z (IEN): 457,9 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,59(m, 4H), 7,06 (m, 2H), 6,98 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,92 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,57 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,19 (m, 4H), 2,78 (m, 4H), 2,36 (s, 3H), 1,83 (m, 8H), 1,73 (m, 4H)

Ejemplo 16: bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico



Etapa 1

Ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico

Se disolvió bromhidrato del ácido 5-(3-Amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **4g** (300 mg, 1,0 mmol) en ácido clorhídrico (3,4 ml, 1 M) seguido de la adición gota a gota de 1,2 ml de una solución de nitrito sódico (73 mg, 1,05 mmol) tras la refrigeración en un baño de hielo-agua. Después de hacer reaccionar la mezcla durante 10 minutos, se añadieron sucesivamente 2-indan-5-il-5-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **1i** (193 mg, 0,9 mmol), bicarbonato sódico (1,26 g, 15 mmol) y 4,4 ml de etanol. La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se filtró y la torta de filtro se lavó con 20 ml de agua y después se disolvió en 20 ml de agua. Después de la refrigeración en un baño de hielo-agua, la mezcla se ajustó a pH <5 con ácido clorhídrico concentrado, se filtró y se secó para obtener el compuesto del título ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-

ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico **16a** (287 mg, rendimiento del 71,8%) en forma de un sólido de color amarillo.

EM m/z (IEN): 443 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13,73(s a, 1H), 9,97 (s a, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,57 (m, 1H), 7,36 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,22 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,15 (m, 1H), 2,89 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,03 (m, 2H)

Etapa 2

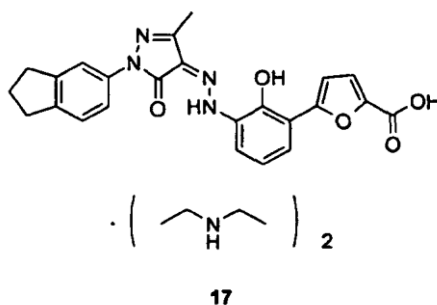
bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico

Se disolvió ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico **16a** (1,825 g, 4,11 mmol) en 20 ml de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se añadió con etanolamina (501 mg, 8,22 mmol), y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(etanolamina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico **16** (1,615 g, rendimiento: 69,4%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

EM m/z (IEN): 443 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,67(s, 1H), 7,53 (m, 3H), 7,21(d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,02 (m, 1H), 6,97 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,70 (m, 1H), 3,70 (m, 4H), 2,92 (m, 4H), 2,88 (m, 4H), 2,35 (s, 3H), 2,08 (m, 2H)

Ejemplo 17: bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico



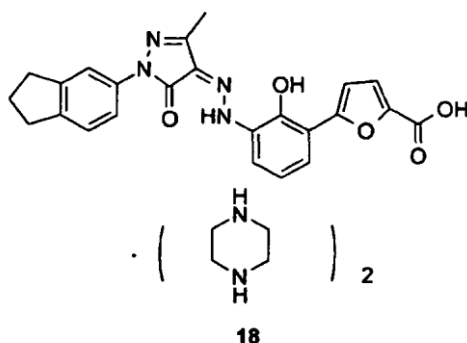
Se suspendió ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico **16a** (150 mg, 0,38 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió gota a gota con dietilamina (49 mg, 0,67 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(dietilamina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico **17** (163 mg, rendimiento: 81,9%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 99,18%

EM m/z (IEN): 442,7 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,71 (s, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,82 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 2,95 (m, 8H), 2,37 (s, 3H), 2,13 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,28 (m, 12H)

Ejemplo 18: bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil]-furan-2-carboxílico



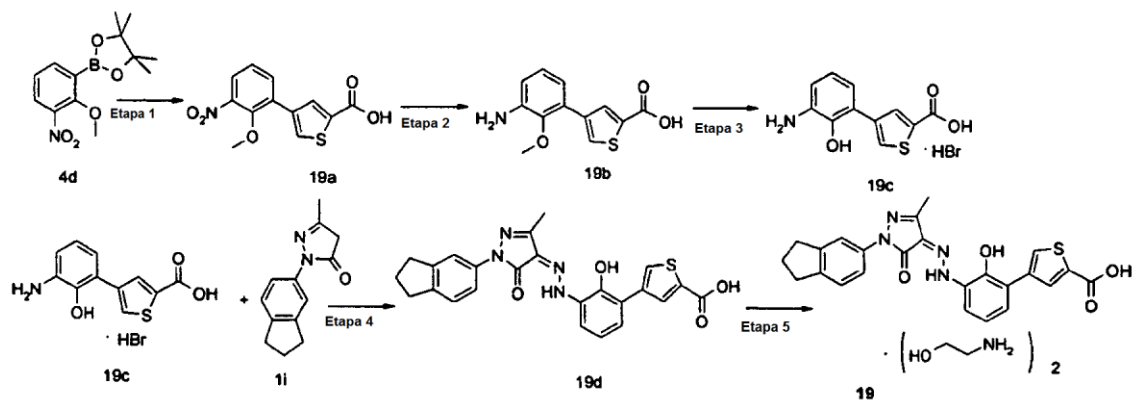
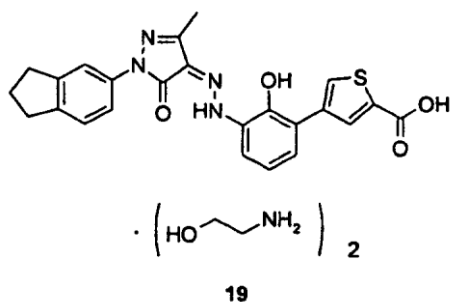
Se disolvió ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico **16a** (150 mg, 0,38 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con piperazina (58 mg, 0,68 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(piperazina) del ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico **18** (185 mg, rendimiento: 88,9%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

HPLC: 96,52%

EM m/z (IEN): 443,2 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ7,73 (s, 1H), 7,61-7,64 (m, 2H), 7,55 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,05 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,78-6,90 (m, 2H), 3,03 (s, 16H), 2,89-2,95 (m, 4H), 2,35 (s, 3H), 2,12 (t, J = 7,2 Hz, 4H)

Ejemplo 19: bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico



Etapa 1

Ácido 4-(3-nitro-2-metoxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico

Se disolvieron 2-(2-metoxi-3-nitro-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano **4d** (0,81 g, 2,9 mmol), ácido 4-bromotiofeno-2-carboxílico (0,3 g, 1,45 mmol), tetraquis (trifenilfosfina)paladio (80 mg, 0,073 mmol) y carbonato sódico (0,31 g, 2,9 mmol) en una mezcla de disolvente de 20 ml de 1,4-dioxano y 10 ml de agua. La reacción se calentó a

reflujo durante 0,5 horas. La mezcla se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico 1 N y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). Los extractos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título ácido 4-(3-nitro-2-metoxifenil)-tiofeno-2-carboxílico **19a** (0,54 g) en forma de un aceite de color pardo, que se usó directamente en la siguiente etapa.

EM m/z (IEN): 277,6 [M-1]

Etapa 2

Ácido 4-(3-amino-2-metoxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico

Se disolvió ácido 4-(3-nitro-2-metoxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico **19a** (400 mg, 1,45 mmol) en 30 ml de acetato de etilo seguido de la adición de 100 mg de paladio sobre carbono (10%) y formiato amónico (360 mg, 5,8 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título ácido 4-(3-amino-2-metoxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico **19b** (410 mg) en forma de un aceite de color pardo, que se usó directamente en la siguiente etapa.

EM m/z (IEN): 247,8 [M-1]

Etapa 3

Bromhidrato del ácido 4-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico

Se disolvió bromhidrato del ácido 4-(3-amino-2-metoxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico **19b** (360 mg, 1,45 mmol) en 5 ml de diclorometano seguido de la adición gota a gota de tribromuro de boro (2,8 ml, 5,6 mmol). La mezcla de reacción se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 4,5 horas. La mezcla de reacción se añadió con 5 ml de metanol y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con 10 ml de acetato de etilo y se agitó durante 0,5 horas. La mezcla se filtró y la torta de filtro se secó para obtener el compuesto del título bromhidrato del ácido 4-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico **19c** (80 mg, rendimiento del 17,5%) en forma de un sólido de color gris.

EM m/z (IEN): 236,1 [M+1]

Etapa 4

Ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico

Se disolvió bromhidrato del ácido 4-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-tiofeno-2-carboxílico **19c** (120 mg, 0,38 mmol) en 2,7 ml de ácido clorhídrico 1 M tras la refrigeración en un baño de hielo-agua seguido de la adición gota a gota de 0,45 ml de una solución de nitrito sódico (29 mg, 0,42 mmol). Después de que se hiciera reaccionar la mezcla durante 20 minutos, se añadió 2-indan-5-il-3-metil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **1i** (73 mg, 0,34 mmol). La mezcla se ajustó a pH 8 con una solución saturada de bicarbonato sódico seguido de la adición de 2 ml de etanol. La mezcla de reacción se hizo reaccionar durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y la torta de filtro se añadió a 20 ml de agua. La mezcla se ajustó a pH 3~4 con ácido clorhídrico concentrado y se filtró. Después, a la torta de filtro se le añadieron 5 ml de acetato de etilo y la mezcla se agitó durante 1 hora. La mezcla se filtró y la torta de filtro se secó para obtener el compuesto del título ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **19d** (45 mg, rendimiento del 28,7%) en forma de un sólido de color amarillo.

EM m/z (IEN): 458,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13,79 (s a, 1H), 9,68 (s a, 1H), 8,13 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,13 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 2,87 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,05 (m, 2H)

Etapa 5

bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico

Se disolvió ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **19d** (1,3 g, 2,83 mmol) en 40 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con etanolamina (344 mg, 5,65 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una gran cantidad de sólido se precipitó en la solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **19** (1,513 g, rendimiento: 92,0%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

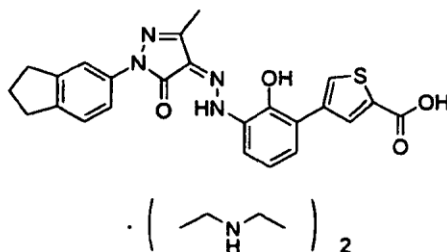
HPLC: 98,65%

EM m/z (IEN): 458,7 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,94 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,55-7,59 (m, 2H), 7,28-7,30 (m, 1H), 7,22 (d,

J = 8,4 Hz, 1H), 6,83 (t, J = 8,0 Hz, 3H), 3,65-3,68 (m, 4H), 2,88-2,92 (m, 8H), 2,38 (s, 3H), 2,06-2,14 (m, 2H)

Ejemplo 20: bis-(dietilamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico



20

5

Se disolvió ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **19d** (150 mg, 0,33 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió gota a gota con dietilamina (49 mg, 0,66 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(dietilamina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **20** (157 mg, en forma de un sólido de color rojo intenso). Rendimiento: 79,3%. HPLC: 98,98%

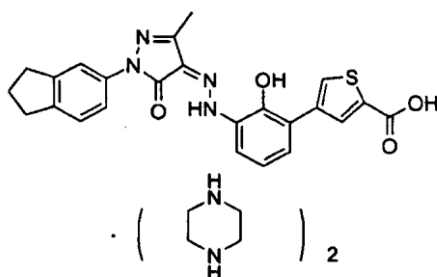
10

15 EM m/z (IEN): 458,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,81(s, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,68-7,70 (m, 2H), 7,62 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,22-7,26 (m, 2H), 7,06 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,03 (c, J = 7,2 Hz, 8H), 2,90-2,97 (m, 4H), 2,37 (s, 3H), 2,07-2,15 (m, 2H), 1,29 (t, J = 7,2 Hz, 12H)

20

Ejemplo 21: bis-(piperazina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico



21

Se disolvió ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **19d** (150 mg, 0,33 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con piperazina (56 mg, 0,65 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El sólido se precipitó en una solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(piperazina) del ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico **21** (195 mg, rendimiento: 94,7%) en forma de un sólido de color rojo intenso.

30

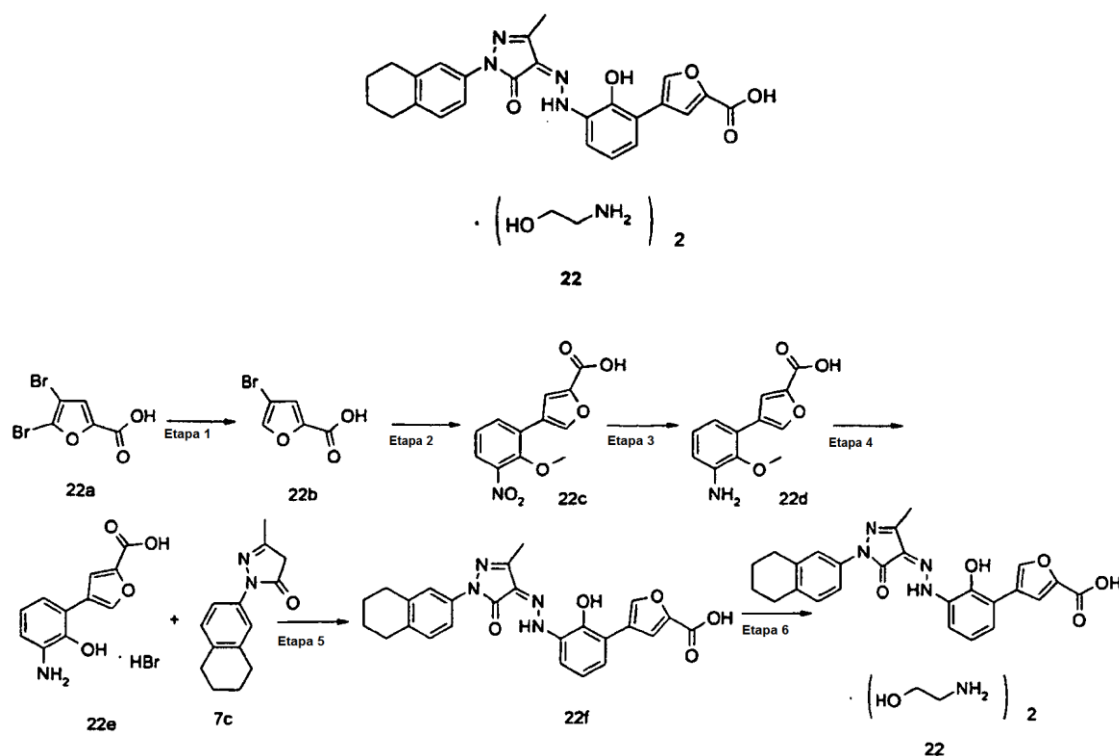
HPLC: 98,17%

EM m/z (IEN): 458,8 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,85 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,62 (m, 2H), 7,26 (m, 2H), 6,95 (t, 1H), 2,96 (m, 16H), 2,91 (m, 4H), 2,37 (s, 3H), 2,11 (m, 2H)

35

Ejemplo 22: bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-(2-Hidroxi-3-[N'-(3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil)-furan-2-carboxílico



Etapa 1

5

Ácido 4-bromo-furan-2-carboxílico

Se añadió una mezcla de ácido 4,5-dibromo-furan-2-carboxílico **22a** (5,5 g, 20,3 mmol) y 18 ml de hidróxido de amonio a 63 ml de agua seguido de la adición de polvo de cinc (1,46 g, 22,33 mmol). Después de que se completara la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico 1 M para formar una gran cantidad de precipitados. La mezcla se filtró y la torta de filtro se lavó con n-hexano (15 ml x 4) y se secó para obtener el compuesto del título ácido 4-bromo-furan-2-carboxílico **22b** (3,2 g, rendimiento del 83,1%) en forma de un sólido de color blanco.

10

EM m/z (IEN): 188,7 [M-1]

15

Etapa 2

Ácido 4-(3-nitro-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvieron 2-(2-metoxi-3-nitro-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano **4d** (4 g, 14,34 mmol), ácido 4-bromo-furan-2-carboxílico **22b** (2,18 g, 11,47 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (829 mg, 0,717 mmol) y carbonato potásico (3,96 g, 28,68 mmol) en la mezcla de disolvente de 80 ml de 1,4-dioxano y 30 ml de agua. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2,5 horas. La mezcla se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico 1 M y después se extrajo con acetato de etilo (80 ml x 3). Los extractos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título ácido 4-(3-nitro-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico **22c** (3,42 g, rendimiento del 90,7%) en forma de un aceite de color pardo.

EM m/z (IEN): 261,8 [M-1]

Etapa 3

Ácido 4-(3-amino-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico

Se disolvió ácido 4-(3-nitro-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico **22c** (500 mg, 1,9 mmol) en 15 ml de acetato de etilo seguido de la adición de 100 mg de paladio sobre carbono y formiato amónico (429 mg, 7,6 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se filtró para retirar paladio sobre carbono y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título ácido 4-(3-amino-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico **22d** (325 mg, rendimiento del 73,4%) en forma de un aceite de color amarillo.

35

EM m/z (IEN): 231,8 [M-1]

Etapa 4

Bromhidrato del ácido 4-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico

- 5 Se disolvió ácido 4-(3-amino-2-metoxi-fenil)-furan-2-carboxílico **22d** (325 mg, 1,4 mmol) en 5 ml de diclorometano seguido de la adición gota a gota de tribromuro de boro (2,8 ml, 5,6 mmol). La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 4,5 horas. Se añadieron 5 ml de metanol y después la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con 10 ml de acetato de etilo y se agitó durante 0,5 horas. La mezcla se filtró y la torta de filtro se secó para obtener el compuesto del título bromhidrato del ácido 4-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **22e** (174 mg, rendimiento del 57,1%) en forma de un sólido de color gris.
- 10 EM m/z (IEN): 217,7 [M-1]

Etapa 5

- 15 Ácido (Z)-4-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

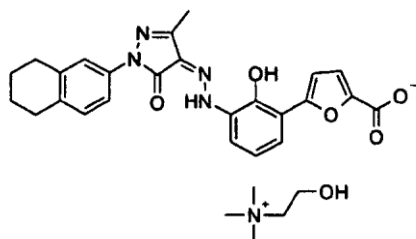
- Se disolvió ácido 4-(3-amino-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico **22e** (170 mg, 0,57 mmol) en ácido clorhídrico (1,9 ml, 1 M) tras la refrigeración en un baño de hielo-agua seguido de la adición gota a gota de 0,7 ml de una solución de nitrito sódico (43 mg, 0,63 mmol). Después de que la mezcla se hiciera reaccionar durante 20 minutos, se añadió 5-metil-2-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-2,4-dihidro-pirazol-3-ona **7c** (116 mg, 0,51 mmol). La mezcla se ajustó a pH 8~9 con una solución saturada de bicarbonato sódico seguido de la adición de 2 ml de etanol. La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se filtró y después a la torta de filtro se le añadieron 15 ml de agua. Después de la refrigeración en un baño de hielo-agua, la mezcla se ajustó a pH 2~3 con ácido clorhídrico concentrado y se filtró. La torta de filtro se lavó con acetato de etilo y se secó para obtener el compuesto del título ácido (Z)-4-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **22f** (13 mg, rendimiento del 5,5%) en forma de un sólido de color rojo.
- 20 EM m/z (IEN): 456,7 [M-1]
- ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13,75 (s a, 1H), 13,20 (s a, 1H), 9,68 (s a, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,62-7,68 (m, 4H), 7,41-7,43 (m, 1H), 7,11-7,15 (m, 2H), 2,67-2,76 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 1,75 (m, 4H)
- 30

Etapa 6

- 35 bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-di-hidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico

- Se disolvió ácido (Z)-4-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-di-hidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **22f** (1,2 g, 2,6 mmol) en 20 ml de tetrahidrofurano para formar una suspensión de color rojo intenso. La mezcla de reacción se añadió con etanolamina (399 mg, 6,5 mmol) para formar una solución de color púrpura, y se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Una gran cantidad del sólido se precipitó en la solución, se filtró, después la torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano (1 ml x 3) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título bis-(etanolamina) del ácido (Z)-4-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftal-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico **22** (1,51 g, en forma de un sólido de color rojo). Rendimiento del 72,8%. HPLC: 97,16%
- 40 EM m/z (IEN): 456,7 [M-1]
- ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,20 (s, 1H), 7,51-7,56 (m, 3H), 7,31-7,35 (m, 2H), 7,07 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 6,89 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,68-3,71 (m, 4H), 2,90-2,95 (m, 4H), 2,76-2,81 (m, 4H), 2,39 (s, 3H), 1,80-1,85 (m, 4H)
- 45

- 50 **Ejemplo 23:** Colina del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico



- Se disolvió ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico (1,1 g, 2,4 mmol) en 19 ml del disolvente de la mezcla de acetato de etilo y etanol (v/v = 12:7), después la mezcla de reacción se calentó a 40 °C y se agitó durante 15 minutos para formar una suspensión de color marrón. La mezcla de reacción se añadió lentamente con una solución 1 M de colina en
- 55

metanol (2,4 ml, 2,4 mmol) para formar una solución de color negro hasta que el sólido desapareció. La solución de reacción se añadió con 1 ml de agua, después se enfrió a 35 °C, se hizo reaccionar durante 3 horas y después se agitó durante 72 horas más a temperatura ambiente. El sólido de color naranja se precipitó, se filtró, después la torta de filtro se lavó con acetato de etilo (5 ml x 3) y se secó para obtener el compuesto del título colina del ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico (620 mg, rendimiento: 46,0%) en forma de un sólido de color naranja.

EM m/z (IEN): 456,7 [M-1]

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,66-7,57 (m, 4H), 7,09-7,04 (m, 3H), 6,92 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 4,03-3,99 (m, 2H), 3,51-3,48 (m, 2H), 3,22 (s, 9H), 2,81-2,75 (m, 4H), 2,33 (s, 3H), 1,83-1,81 (m, 4H).

Ejemplo 24: Composición de los Comprimidos

La lactosa, celulosa microcristalina, almidón glicolato sódico, estearato de magnesio y el Compuesto del Ejemplo 7 se mezclan en las proporciones mostradas en la Tabla 1 que se indica a continuación. Después, la mezcla se comprime en comprimidos.

Tabla 1	
INGREDIENTE	mg
Compuesto del Ejemplo 7	8,45
Celulosa microcristalina	112
Lactosa	70
Almidón glicolato sódico	8
Estearato de magnesio	2

Ejemplo 25: Composición Parenteral Inyectable

Una forma inyectable para administrar el Compuesto del Ejemplo 7 se produce agitando 5,0 mg del compuesto en 1,0 ml de solución salina normal.

Ejemplo de Prueba

Ensayo de Solubilidad

De acuerdo con el procedimiento convencional para la determinación de la solubilidad, la solubilidad de los compuestos de los Ejemplos y sus sales se ensayaron en tres sistemas diferentes: agua, ácido clorhídrico al 0,1% y metanol.

La solubilidad se caracterizó por:

La expresión "muy soluble" se refiere a que 1 g (ml) de soluto puede disolverse en menos de 1 ml de disolvente;

La expresión "soluble libremente" se refiere a que 1 g (ml) de soluto puede disolverse en de 1 ml a 10 ml, sin incluir 10 ml de disolvente;

El término "soluble" se refiere a que 1 g (ml) de soluto puede disolverse en de 10 ml a 30 ml, sin incluir 30 ml de disolvente;

La expresión "escasamente soluble" se refiere a que 1 g (ml) de soluto puede disolverse en de 30 ml a 100 ml, sin incluir 100 ml de disolvente;

La expresión "ligeramente soluble" se refiere a que 1 g (ml) de soluto puede disolverse en de 100 ml a 1000 ml, sin incluir 1000 ml de disolvente;

La expresión "muy ligeramente soluble" se refiere a que 1 g (ml) de soluto puede disolverse en de 1000 ml a 10000 ml, sin incluir 10000 ml de disolvente;

La expresión "prácticamente insoluble o insoluble" se refiere a que 1 g (ml) de soluto no puede disolverse por completo en 10000 ml de disolvente.

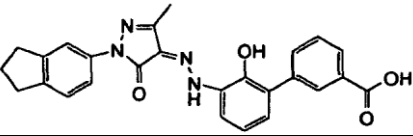
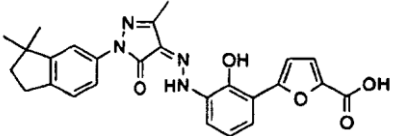
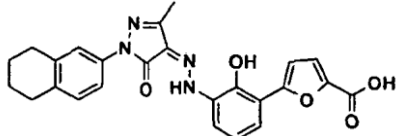
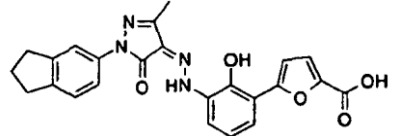
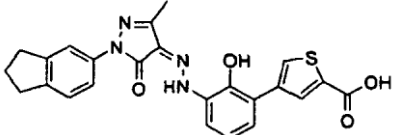
Los resultados de la solubilidad se mostraron como se indica a continuación:

Ejemplo N°	Solubilidad (mg/ml)		
	ácido clorhídrico al 0,1%	agua	metanol
1j	<0,001	<0,001	<0,001
1	<0,001	0,003	1,469
3	<0,001	2,290	1,534
4h	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,024	2,905	19,001
6	<0,001	0,001	3,009
7d	<0,001	<0,001	<0,001

7	0,029	3,960	22,377
8	<0,001	5,049	4,595
9	<0,001	9,974	19,331
10	<0,001	3,715	3,417
11	<0,001	3,003	3,617
12	<0,001	5,945	18,823
13	<0,001	<0,001	15,432
14	<0,001	1,876	3,722
15	<0,001	0,645	3,023
16a	<0,001	<0,001	<0,001
17	<0,001	2,000	5,849
18	<0,001	2,741	6,096
19d	<0,001	<0,001	<0,001
20	<0,001	0,068	2,221
21	<0,001	0,814	2,416
23	<0,001	0,286	22,597

El resultado mostró que en comparación con el compuesto del Ejemplo 1j, Ejemplo 4h, Ejemplo 7d, Ejemplo 16a y el Ejemplo 19d, la solubilidad de sus sales obviamente aumentó, especialmente en agua y metanol. Especialmente, las sales del Ejemplo 4 y el Ejemplo 7 tenían relativamente mejora solubilidad en ácido clorhídrico al 0,1%, y las dos sales fueron muy ligeramente solubles, mientras que las demás eran prácticamente insolubles o insolubles.

La estructura de los Compuestos del Ejemplo 1j, Ejemplo 4h, Ejemplo 7d, Ejemplo 16a y el Ejemplo 19d se mostró como se indica a continuación:

Ejemplo N°	Estructura	Compuesto
1j		ácido (Z)-2'-hidroxi-3'-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-carbonil-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-bifenil-3-carboxílico
4h		ácido (Z)-5-(3-{N'-[1-(3,3-dimetil-indan-5-il)-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-2-hidroxi-fenil)-furan-2-carboxílico
7d		ácido (Z)-5-(2-hidroxi-3-{N'-[3-metil-5-oxo-1-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno]-hidrazino}-fenil)-furan-2-carboxílico
16a		ácido (Z)-5-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-furan-2-carboxílico
19d		ácido (Z)-4-{2-hidroxi-3-[N'-(1-indan-5-il-3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-pirazol-4-ilideno)-hidrazino]-fenil}-tiofeno-2-carboxílico

Ensayo de Higroscopicidad

Prueba de higroscopicidad de los compuestos de la presente divulgación después un reposo durante 48 horas

Protocolo:

1. El frasco de pesadas de vidrio árido con un tapón (el diámetro externo es de 50 mm, la altura es 15 mm) se puso a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ adecuadamente en una secadora termostática (se puso una solución saturada de sulfato de amonio en la parte inferior, la humedad era del 79%) el día antes del ensayo, el peso exacto se midió como (m_1);

2. El frasco de pesadas anterior se cubrió con los compuestos de la invención (aproximadamente 1 g), y el espesor de los compuestos fue generalmente de 1 mm, el peso exacto se midió como (m_2);
3. La boca del frasco de pesadas se mantuvo abierto y se colocó con el tapón en las condiciones anteriores con temperatura y humedad constantes durante 48 horas;
4. Se puso el tapón de nuevo en la botella, el peso exacto se midió como (m_3)

$$\text{Porcentaje de ganancia de peso} = \frac{m_3 - m_2}{m_2 - m_1}$$

El grado de higroscopicidad se definió como se indica a continuación:

Deliquescer: Se vuelve líquido absorbiendo suficiente humedad.

Alta higroscopicidad: el porcentaje de ganancia de peso por higroscopicidad no es menor del 15%.

Higroscopicidad: el porcentaje de ganancia de peso por higroscopicidad es menor del 15%, pero no inferior del 2%.

Escasa higroscopicidad: el porcentaje de ganancia de peso por higroscopicidad es menor del 2%, pero no menor del 0,2%.

Sin higroscopicidad o casi sin higroscopicidad: el porcentaje de ganancia de peso por higroscopicidad es menor del 0,2%.

Los resultados de la higroscopicidad de los compuestos de la presente divulgación se mostraron como se indica a continuación:

Ejemplo N°	Porcentaje de ganancia de peso	Higroscopicidad
7	1,2%	Escasa higroscopicidad
8	13,9%	Higroscopicidad
10	15,7%	Alta higroscopicidad
12	2,71%	Higroscopicidad
23	8,48%	Higroscopicidad

Los resultados mostraron que en comparación con las demás sales, la sal del Ejemplo 7, es decir, sal bis-(etanolamina) del compuesto 7d, es menos higroscópica, y tenía mejora estabilidad en la humedad, lo que podría evitar los problemas potenciales del cambio de peso de los componentes activos durante la preparación de cápsulas o comprimidos, es estable en gas, y es adecuada para la preparación de una formulación convencional y podría almacenarse a largo plazo.

ENSAYO BIOLÓGICO

Ejemplo de Prueba 1: Efecto de la proliferación de una serie de compuestos de TPO en una célula BAF3-TPOR.

1. Material y reactivos.

- Medio RPMI 1640, polvo, 10 x 1 l, que contiene HEPES (Gibco, Catálogo N° 23400021).
- Suero Fetal Bovino (Gibco, Catálogo N° 10099-141).
- PENICILINA ESTREPTOMICINA SOL (Gibco, Catálogo N° 15140-122).
- Geneticina (G418) (Gibco, Catálogo N° 11811-098).
- IL-3 de ratón recombinante (chemicon, Catálogo N° IL015).
- Mab de trombopoyetina R humana (TPO) (R&D, Catálogo N° MAB1016).
- DMSO (AppliChem, Catálogo N° A3672).
- Kit de Mutagénesis Dirigida a Múltiples Sitios QuikChange®, 10 Realizaciones (Stratagene ST200515).
- Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Catálogo N° CK04-13)
- Célula BaF3 (Union cell culture center, Catálogo N° 0095)
- EX-EGFP-M02 (FulenGen, Catálogo N° EX-EGFP-M02 Control)
- EX-B0010-M02 (FulenGen, Catálogo N° EX-B0010-M02)

2. Proceso operativo:

- Construcciones plasmídicas: En base a la información de secuencia del receptor de TPO (TPOR) de Entrez (Gene ID: 4325, Refseq: NM_005373), la mutación de sitio dual se realizó en el

plásmido EX-B0010-M02 usando el Kit de Mutagénesis Dirigida a Múltiples Sitios QuikChange(R) (Stratagene). La secuencia de cebadores que contenían múltiples sitios de mutación se diseñó como se indica a continuación:

5 g491 a: 5'-gggaacttcagatcagctgggaggagccg-3'
g491a_antisentido: 5'-cggctcctcccagctgatctgaagttccc-3';
c965t: 5'-caggaccatgctagctcccaaggcttcttct-3',
c965t_antisentido: 5'-agaagaagccttgggagctagcatggtcctg-3'.

10 Las células competentes de *E. coli* DH5 α se transformaron con un plásmido mutado, y las colonias positivas se recogieron a través de la selección de ampicilina. El resultado de la mutación se confirmó por análisis de la secuencia.

15 (2) Línea celular transfectada estable BAF3-TPOR: El siguiente procedimiento se usó para construir la célula BaF3 que sobreexpresó de forma estable el TPOR humana funcional. El plásmido EX-B0010-M02 mutado con éxito (25 μ g) que expresó el TPOR humano y el gen neomicina de detección se transfectó en células BaF3 de tipo natural (1×10^7) por electroporación a 250 V durante 18 ms usando un generador de pulsos eléctrico (Electro Square Porator ECM830, BTX Division of Genetronic, Inc. Estados Unidos). Las células transfectadas estables BAF3-TPOR se seleccionaron con G418 (Gibco, Estados Unidos), después se incubaron en medio RPMI1640 más FBS al 10% (Gibco, Estados Unidos), 800 ng/ml de G418, 5 ng/ml, rmlL-3 (Chemicon, Estados Unidos).

3. Ensayo de compuestos de detección

25 (1) Lavado de células por centrifugación: Una cantidad adecuada de suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se desechó. Se añadieron 10 ml de medio de cultivo celular sin IL-3. Después, la suspensión celular resultante se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se desechó.
30 (2) Se añadió 1 ml de medio de cultivo celular sin IL-3 para su igualación, y se contó el número de una cantidad adecuada de suspensión celular después de la dilución.
(3) De acuerdo con el resultado del recuento celular, se preparó una suspensión celular en una concentración de 100.000 células/ml.
(4) Se transfirieron 100 μ l de suspensión celular a cada pocillo de la placa de cultivo de 96 pocillos, y hubo 3 pocillos paralelos, es decir, hubo un grupo de control en blanco (B), un grupo de control negativo (N), un grupo de control positivo de TPO (P) y un grupo de compuesto de prueba (S).
35 (5) El compuesto de prueba se disolvió en DMSO para preparar una solución madre 10 mM, y después la solución se diluyó con medio RPMI 1640 en una serie de muestras de prueba a diferente concentración: 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0,3 μ M, 0,1 μ M, 0,03 μ M, 0,01 μ M, 0,003 μ M, 0,001 μ M.
(6) Se transfirieron 10 μ l de compuesto de prueba a cada pocillo respectivamente; al pocillo de control positivo se le añadió 1 μ l de rhTPO (10 μ g/ml).
40 (7) Las placas se incubaron en una incubadora en CO₂ al 5% y a 37 °C durante 24 horas.
(8) Después de la incubación, a cada pocillo se le añadieron 10 μ l de solución CCK-8 y las placas se incubaron en la incubadora durante 24 horas más.
(9) El valor DO se detectó a 450 nm por el lector de placas VICTOR3 (Perkin Elmer 1420-120).

4. Cálculo Analítico

(1) La tasa de proliferación se calculó como se indica a continuación:

50 **Tasa = [(S-B)/(P-B)] x 100%**

S: Valor DO de los pocillos que contienen el compuesto de prueba.

B: Valor DO de los pocillos de control en blanco

P: Valor DO de los pocillos de control positivos

55 (2) El valor EC₅₀ se calculó mediante el software Origin 7.0.

5. Resultados: EC₅₀ de la actividad de TPO de los compuestos de la presente divulgación

Ejemplo	EC ₅₀
Eltrombopag	299
1j	200
1	150
4h	32
4	25

Ejemplo	EC ₅₀
5	19
6	36
7d	21
7	19
8	4.4
9	14
10	16
11	21
12	14
13	20
14	19
15	16
16a	100
16	18
17	55
18	29
19d	43
19	37
20	51
21	116
22f	42
22	39
23	43

Los resultados del estudio mostraron que en comparación con el ácido libre, las sales de la presente divulgación tenían efectos de proliferación más fuertes con respecto a la célula BAF3-TPOR. El orden fue como se indica a continuación: sales de la presente divulgación > ácido libre > Eltrombopag, y la actividad de las sales de la presente divulgación eran más activas que Eltrombopag.

ENSAYO DE LA FARMACOCINÉTICA

Ejemplo de Prueba 1: Ensayo de farmacocinética de los compuestos de la presente divulgación en ratas

1. Fin

Los compuestos de la presente divulgación se administraron por vía intragástrica a las ratas para determinar la concentración de fármaco en plasma en diferentes puntos de tiempo por HPLC-UV. La conducta farmacocinética de los compuestos de la presente divulgación se estudió y se evaluó en ratas.

2. Protocolo

2.1 Muestras

Compuestos del Ejemplo 1j, Ejemplo 1-3, Ejemplo 4h, Ejemplo 4, Ejemplo 5, Ejemplo 6, Ejemplo 7d, Ejemplo 7-15, Ejemplo 16a, Ejemplo 16-18, Ejemplo 19d, Ejemplo 19, Ejemplo 20, Ejemplo 21, Ejemplo 22f, Ejemplo 22 y Ejemplo 23.

2.2 Animales experimentales

Se adquirieron ratas SD adultas sanas, machos y hembras por igual, en SINO-BRITISH SIPPR/BK LAB.ANIMAL LTD., CO, Licencia número: SCXK (Shangai) 2003-0002

2.3 Instrumento

Cromatógrafo líquido de alto rendimiento Waters 2695-2996, Waters Corp., Estados Unidos;

2.4 Preparación de compuestos de prueba

El compuesto de prueba se diluyó con carboximetil celulosa sódica al 1% en 5 mg/ml (calculado como la forma de ácido libre) de suspensión antes de su uso.

2.5 Administración

Las ratas SD adultas sanas, machos y hembras por igual, se dividieron en 23 grupos. Después del ayuno durante una noche, a las ratas se les administró por vía intragástrica una dosis de 50,0 mg/kg (calculado como la forma de ácido libre), a un volumen de 10 ml/kg.

5 2.6 Recogida de Muestras

Se tomaron muestras de sangre (0,2 ml) de la cuenca ocular en una administración previa y 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0, 11,0, 14,0, 24,0, 36,0 y 48,0 horas después de la administración, que se almacenaron en tubos heparinizados y se centrifugaron durante 10 minutos a 3.500 rpm. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las ratas se alimentaron 2 horas después de la administración.

10 2.7 Procedimientos Analíticos

Se mezclaron bien 50 µl de plasma de rata, obtenido en diversos puntos de tiempo después de la administración, 50 µl de solución convencional interna y 20 µl de una mezcla de disolvente de metanol y agua (80:20, v/v), y después se añadieron 100 µl de para dar como resultado la precipitación de proteínas. Después, la mezcla se mezcló durante 3 minutos usando un agitador vortical y se centrifugó durante 10 minutos a 13.500 rpm. Se analizaron 40 µl del sobrenadante por HPLC-UV.

20 2.8 Cálculo de los Parámetros Farmacocinéticos

El modelo compartimental de la farmacocinética se ajustó para los compuestos de prueba y se calcularon los parámetros farmacocinéticos principales, en los que $C_{\text{máx}}$ y $t_{\text{máx}}$ fueron los valores medidos realmente.

25 3. Resultados de los Parámetros Farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de los compuestos de la presente divulgación se mostraron como se indica a continuación:

Número	Ensayo de la Farmacocinética (50 mg/kg)										Volumen de Distribución Aparente	
	Conc. Plasma Cmáx (µg/ml)	Tiempo a Pico Tmáx (h)	Área Bajo la Curva ABC (µg/ml x h)	Semivida t1/2 (h)	Tiempo de Residencia Medio TRM (h)	CL/F (l/h/kg)						Vz/F (l/kg)
Eltrombopag	61,8 ± 18,7	5,5 ± 1,0	680 ± 255	7,82 ± 1,34	11,2 ± 2,6	0,089 ± 0,052						0,95 ± 0,42
1j	29,05 ± 11,44	4,00 ± 1,41	131 ± 47	4,21 ± 1,86	3,89 ± 1,78	0,049 ± 0,035						0,29 ± 0,18
1	90,1 ± 35,3	3,25 ± 1,5	501 ± 178	5,39 ± 0,94	4,96 ± 1,16	0,098 ± 0,072						0,45 ± 0,32
2	83,9 ± 11,2	5,0 ± 1,16	833 ± 64	9,55 ± 1,44	11,08 ± 0,76	0,06 ± 0,005						0,83 ± 0,16
3	79 ± 9,3	5,5 ± 1,0	842 ± 185	8,87 ± 0,78	13,0 ± 0,9	0,062 ± 0,013						0,78 ± 0,15
4h	1,29 ± 0,38	2,5 ± 1,0	9,5 ± 8,3	19,8 ± 16,4	31,7 ± 24,6	3,26 ± 1,93						83,4 ± 54,8
4	2,32 ± 1,80	2,25 ± 2,47	19,0 ± 12,6	27,0 ± 31,5	38,3 ± 36,5	2,42 ± 1,60						58,1 ± 47,7
5	19,8 ± 3,8	3,25 ± 1,5	255 ± 95	15,0 ± 6,2	20,8 ± 9,1	0,22 ± 0,07						4,23 ± 0,42
6	13,0 ± 6,5	2,5 ± 1,0	175 ± 41	45,0 ± 70,3	60,4 ± 90,2	0,30 ± 0,084						16,0 ± 22,8
7d	16,2 ± 3,9	2,5 ± 1,0	132 ± 124	7,42 ± 7,19	11,0 ± 8,13	8,14 ± 8,44						36,1 ± 17,9
7	74,1 ± 34,5	1,75 ± 0,5	469 ± 274	13,9 ± 6,07	13,3 ± 5,12	0,175 ± 0,169						2,48 ± 0,92
8	36,2 ± 46,2	1,38 ± 1,11	352 ± 586	10,6 ± 9,02	12,1 ± 8,23	0,926 ± 1,013						8,55 ± 9,08
9	21,2 ± 10,4	2,88 ± 2,59	146 ± 69,7	9,65 ± 2,48	10,5 ± 1,18	0,391 ± 0,145						5,15 ± 1,46
10	65,6 ± 44,5	1,63 ± 0,75	381 ± 306	12,9 ± 6,32	11,5 ± 5,72	0,494 ± 0,754						4,54 ± 4,17
11	40,2 ± 24,3	1,5 ± 0,58	270 ± 178	12,1 ± 7,19	10,0 ± 3,90	0,877 ± 1,465						5,80 ± 5,30
12	17,8 ± 10,3	1,38 ± 1,11	58,5 ± 23,8	5,1 ± 2,41	5,87 ± 1,68	1,00 ± 0,504						6,35 ± 1,38
13	8,10 ± 3,35	1,38 ± 1,11	42,8 ± 33,2	5,70 ± 2,50	8,05 ± 2,01	1,63 ± 0,83						14,9 ± 12,1
14	17,8 ± 22,6	5,25 ± 1,5	132 ± 189	4,72 ± 2,82	7,20 ± 2,13	2,40 ± 2,41						9,54 ± 8,03
15	23,3 ± 13,6	2,0 ± 1,16	168 ± 118	6,56 ± 3,80	8,92 ± 2,04	0,758 ± 0,995						3,65 ± 1,79
16a	6,81 ± 6,23	2,75 ± 0,96	15,0 ± 17,2	1,82 ± 0,68	4,03 ± 2,55	2,98 ± 2,75						11,5 ± 7,5
16	19,6 ± 16,3	2,00 ± 0,82	52,4 ± 48,0	2,08 ± 1,74	3,84 ± 1,03	1,94 ± 0,64						6,33 ± 4,57
17	21,5 ± 10,5	3,38 ± 3,04	138 ± 33	12,7 ± 14,7	14,0 ± 12,0	0,38 ± 0,093						8,16 ± 11,09
18	23,3 ± 11,6	1,63 ± 1,63	119 ± 102	3,99 ± 1,60	5,31 ± 2,64	0,63 ± 0,35						3,02 ± 1,01
19d	7,91 ± 6,84	2,50 ± 0,58	36,1 ± 36,4	1,84 ± 1,05	3,01 ± 1,99	1,44 ± 0,83						10,4 ± 8,4
19	20,8 ± 17,3	1,81 ± 2,79	89,2 ± 7,2	5,71 ± 3,68	7,85 ± 2,92	0,88 ± 0,61						5,47 ± 2,72
20	46,1 ± 15,7	4,5 ± 1,0	275 ± 116	7,24 ± 2,45	7,59 ± 1,33	0,21 ± 0,088						2,05 ± 0,68
21	61,1 ± 1,38	5,5 ± 1,0	380 ± 109	6,86 ± 0,48	8,61 ± 0,31	0,14 ± 0,04						1,37 ± 0,32
22f	8,73 ± 2,58	4,25 ± 11,26	151 ± 97	9,21 ± 1,57	11,8 ± 4,5	0,69 ± 0,55						8,49 ± 2,16
22	39,8 ± 18,2	5,0 ± 2,0	603 ± 240	9,95 ± 0,60	14,8 ± 1,0	0,24 ± 0,11						3,41 ± 1,75
23	17,2 ± 12,3	3,25 ± 3,18	123 ± 89,5	7,61 ± 1,34	11,7 ± 1,15	0,527 ± 0,24						5,52 ± 2,18

Los resultados del estudio mostraron que después de la administración a ratas, en comparación con el ácido libre, la farmacocinética y la biodisponibilidad de las sales de la presente divulgación obviamente mejoró. Los datos farmacocinéticos de la sal del Ejemplo 7, es decir, las sales bi-(monoetanolamina) del Ejemplo 7d, son mejores, y tenían buenas características farmacocinéticas.

5 Ejemplo de Prueba 2: Ensayo de la farmacocinética de los compuestos de la presente divulgación en perros Beagle

1. Fin

10 Los compuestos del Ejemplo 7, Ejemplo 8, Ejemplo 10 y Ejemplo 12 se administraron por vía intragástrica a perros Beagle para determinar la concentración del fármaco en plasma en diferentes puntos de tiempo por HPLC-UV. La conducta farmacocinética de los compuestos de la presente divulgación se estudió y se evaluó en perros Beagle.

2. Protocolo

15 2.1 Muestras

Compuestos del Ejemplo 7, Ejemplo 8, Ejemplo 10 y Ejemplo 12

20 2.2 Animales experimentales

Se adquirieron 12 perros Beagles adultos sanos, macho, en Suzhou Xishan Drug Research and Development CO., LTD. Licencia número: SCXK(Suzhou)2007-0005.

25 2.3 Instrumento

Cromatógrafo líquido de alto rendimiento Agilent 1100, Agilent Corp., Estados Unidos.

30 2.4 Preparación de compuestos de prueba

El compuesto de prueba se diluyó con carboximetil celulosa sódica al 0,5% en 2,5 mg/ml (calculado como la forma de ácido libre) de suspensión antes de su uso.

35 2.5. Administración

Los 12 perros Beagles adultos, sanos, macho, se dividieron en 4 grupos. Después de una noche en ayuno, a los perros se les administró por vía intragástrica una dosis de 5,0 mg/kg (calculado como la forma de ácido libre), a un volumen de 2 ml/kg.

40 2.6 Recogida de Muestras

Se tomaron muestras de sangre (1,2 ml) de la vena de las patas delanteras previamente a la administración y 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 5,0, 6,0, 8,0, 12,0, 14,0, 24,0 y 48,0 horas después de la administración, que se almacenaron en tubos heparinizados y se centrifugaron durante 10 minutos a 3.500 rpm. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Los perros Beagles se alimentaron 2 horas después de la administración.

45 2.7 Procedimientos Analíticos

Se añadieron 50 µl de plasma de perro Beagles, obtenido en diversos puntos de tiempo después de la administración, 20 µl de una solución convencional interna y 150 µl de metanol para dar como resultado una precipitación de proteínas. Después, la mezcla se mezcló durante 1 minuto usando un agitador vortical y se centrifugó durante 5 minutos a 11.000 rpm. Se analizaron 50 µl del sobrenadante por HPLC-UV.

50 2.8 Cálculo de los Parámetros Farmacocinéticos

55 El modelo compartimental de la farmacocinética se ajustó para los compuestos de prueba y se calcularon los parámetros farmacocinéticos principales, en los que $C_{\text{máx}}$ y $t_{\text{máx}}$ fueron los valores medidos realmente.

Número	Ensayo de la Farmacocinética (5 mg/kg)						
	Conc. Plasma	Tiempo a Pico	Área Bajo la Curva	Semivida	Tiempo de Residencia Medio	Aclaramiento	Volumen de Distribución Aparente
	C _{máx} (µg/ml)	T _{máx} (h)	ABC (µg/ml x h)	t _{1/2} (h)	TRM (h)	CL/F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)
7	0,985	1,2	12,2	8,24	13,3	0,498	5,72
8	0,6	0,5	7,91	7,67	12,3	0,879	9,58
10	0,81	0,7	9,76	8,07	12,9	0,606	6,81
12	0,811	0,5	11,0	6,86	11,6	0,659	4,86

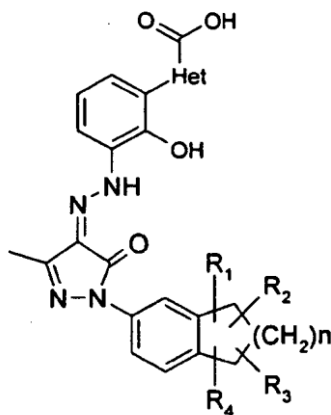
Los datos de las cuatro sales en el estudio actual mostraron que los compuestos del Ejemplo 7 eran obviamente superiores en la farmacocinética.

5 En resumen, la preparación de los compuestos de la presente divulgación era sencilla y tenía buen rendimiento. Especialmente, las sales etanolamina, sales colina, sales dietilamina y sales piperazina tenían superioridad en el proceso de síntesis ya que pueden cristalizar directamente. En comparación con los ácidos libres, la solubilidad de las sales de la presente divulgación obviamente aumento en los disolventes convencionales. Las sales etanolamina eran menos higroscópicas y eran adecuadas para preparar una formulación convencional y fácil de conservar. La bioactividad de las sales de la presente divulgación obviamente mejoró. La farmacocinética obviamente también mejoró en las ratas y beagles y tuvo mejores características farmacocinéticas, especialmente las sales etanolamina.

10

REIVINDICACIONES

1. Sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto que tiene fórmula (I):



(I)

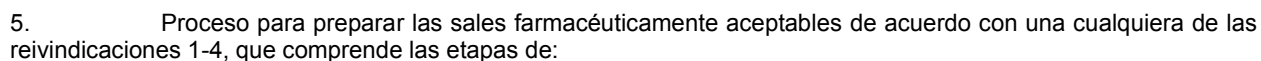
- 5 en la que:

Het se selecciona entre el grupo que consiste en fenilo, furilo y tienilo;
 cada uno de R₁, R₂, R₃ y R₄ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo;
 n es 0, 1 ó 2; y
 las sales son sales de adición de bases que se seleccionan entre el grupo que consiste en sal sódica, sal de litio, sal potásica, sal cálcica, sal de magnesio, sal de arginina, sal de lisina, sal de metanamina, sal de dimetilamina, sal de trimetilamina, sal de etilamina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de etanolamina, sal de piperazina, sal de dibencil etilendiamina, sal de meglumina, sal de trometamina, sal de tetrametil amonio cuaternario, sal de tetraetil amonio cuaternario y sal colina.

2. Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en las que las sales se seleccionan entre el grupo que consiste en sal de dietilamina, sal de etanolamina, sal colina, sal de piperazina, sal de meglumina y sal de trometamina, preferiblemente sal de etanolamina, sal colina, sal de meglumina y sal de trometamina, y mucho más preferiblemente sal de etanolamina.

3. Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en las que n es 2.

4. Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que las sales se seleccionan entre el grupo que consiste en:



41

tetrahidrofurano, preferiblemente tetrahidrofurano;

(b) añadir una base a la mezcla con agitación;

(c) obtener las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto que tiene la fórmula (1).

- 5 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la base se selecciona entre el grupo que consiste en hidróxido sódico, hidróxido de litio, hidróxido potásico, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, lisina, arginina, metanamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, etanolamina, piperazina, dibencil etilendiamina, meglumina, trometamina, tetrametil amonio cuaternario, tetraetil amonio cuaternario e hidróxido de colina, preferiblemente dietilamina, etanolamina, hidróxido de colina, piperazina, meglumina y trometamina, más preferiblemente etanolamina, hidróxido de colina, meglumina y trometamina, y mucho más preferiblemente etanolamina.
- 10 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que la proporción de equivalencia del compuesto que tiene la fórmula (I) y la base es 1:5~5:1, preferiblemente 1:1~1:3, y más preferiblemente 1:1~1:2.
- 15 8. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y vehículos y agentes diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 20 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la composición se co-administra con una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un factor estimulador de colonias, una citocina, una quimiocina, una interleucina y un agonista del receptor de citocina.
- 25 10. Proceso para preparar la composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende la etapa de combinar el compuesto de la reivindicación 1 con los vehículos o agentes diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 30 11. Uso de las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto que tienen la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la preparación de un agonista del receptor de trombopoyetina.
- 35 12. Sales farmacéuticamente aceptables del compuesto que tiene la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso como un medicamento para el tratamiento de la trombocitopenia.
- 40 13. Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 12, en las que el medicamento se co-administra con un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un factor estimulador de colonias, una citocina, una quimiocina, una interleucina o agonista o antagonista del receptor de citocina, un receptor soluble, un anticuerpo agonista o antagonista de receptor, o uno o más péptidos o compuestos de moléculas pequeñas que tienen el mismo mecanismo con el fármaco.
14. Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 12, en las que el medicamento está en forma de forma de dosificación oral.
15. Las sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 12, en las que el medicamento está en forma de forma de dosificación parenteral.