

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 521**

51 Int. Cl.:

C07D 495/04 (2006.01)

A61K 31/4365 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 12006019 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2527345**

54 Título: **Pirazolil tienopiridinas terapéuticas**

30 Prioridad:

16.10.2006 US 851982 P

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

12.02.2016

73 Titular/es:

**THESAN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
392 Camino de Estrella
San Clemente, CA 92672, US**

72 Inventor/es:

**BARRETT, STEPHEN DOUGLAS;
CHEN, HUIFEN;
BOYS, MARK LAURENCE y
KRAMER, JAMES B.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 559 521 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

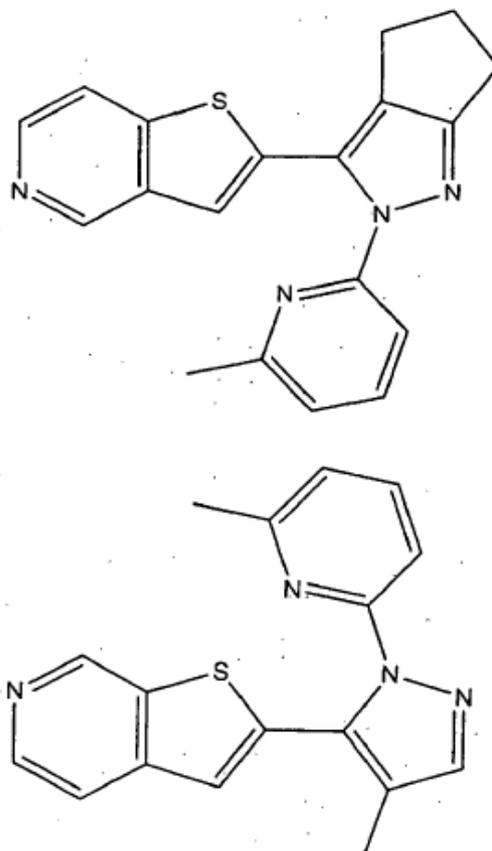
Pirazolil tienopiridinas terapéuticas

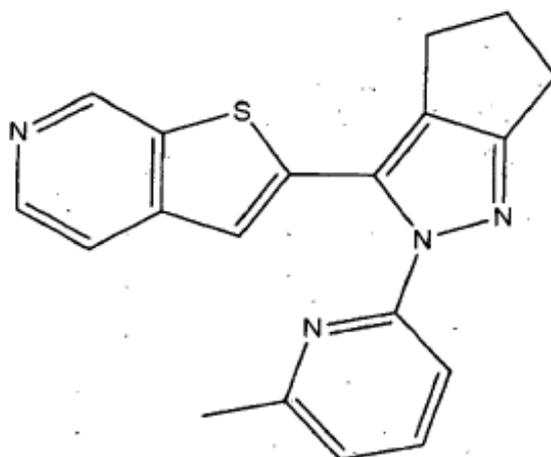
5 Los TGF- β 's (factor de crecimiento transformante- β) activan las cascadas de señalización promotoras de tumores y fibróticas. Tres TGF β 's mamífero, TGF β ₁, TGF β ₂, y TGF β ₃, pueden activar la vía TGF β . La unión de TGF β 's y la señal a través de los receptores de la superficie celular (véase Singh et al. (2004) Curr. Opin. Drug Disc. and Dev., 7: 437-445).
 10 Un primer TGF β se une a un receptor de tipo II (T β RII), que luego se une a y fosforila un receptor de tipo I (T β RI) (i.e., una quinasa similar al receptor de la activina (ALK)). Existe una familia de proteínas ALK incluyendo ALK-5, que es la ALK más específica para TGF β . La activación de ALK-5, conduce a la fosforilación de proteínas intracelulares, que resulta en la regulación de la fibrosis y la tumorigénesis. Por lo tanto, el descubrimiento de inhibidores de ALK-5 es un área activa de investigación para descubrir inhibidores para tratar el cáncer, y condiciones que involucran la fibrosis (véase Singh et al. (2004)).

15 Un ejemplo de una condición que implica la fibrosis es la formación de cicatrices durante la reparación de la herida. Las cicatrices, incluyendo cicatrices hipertróficas y queloides, por lo general son el resultado de la deposición de colágeno en los sitios de la herida. Las heridas pueden ser producidas a través de muchos tipos diferentes de mecanismos que incluyen cirugía, lesiones accidentales, quemaduras, trauma, etc. Se ha informado de que la aplicación de TGF β ₃, los anticuerpos para TGF β ₁ y TGF β ₂ que inhiben la vía TGF β puede ayudar en la reducción de cicatrices (O'Kane and Ferguson, (1997) Int. J. Biochem. Cell Biol., 29: 63-78). De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad continua en la técnica de inhibidores de ALK-5 de moléculas pequeñas que se puedan utilizar, para reducir la formación de cicatrices, y para el tratamiento de otras condiciones fibróticas, así como el cáncer.

20 WO 2006/026305 describe derivados de pirimidina sustituidos con pirazolilo, que son útiles para el tratamiento de condiciones mediadas por TGF β .

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos seleccionados del grupo que consiste en:





y

una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos anteriores para uso en métodos de reducción de la formación de cicatrices, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas realizaciones, el compuesto se administra por vía tópica.

10 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona los compuestos anteriores para uso en métodos de reducción de cicatrices existentes, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos anteriores para uso en métodos de tratamiento de una condición mediada por TGF β , que comprende administrar a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas realizaciones, la condición mediada por TGF β se selecciona del grupo que comprende: cáncer, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, melanoma, enfermedades fibróticas, glomerulonefritis, nefropatía diabética, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, hiperplasia arterial, restenosis, escleroderma, y cicatrices dérmicas. En ciertas realizaciones, la condición mediada por TGF β es la cicatrización dérmica.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas que comprenden: una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas tópicas que comprenden: una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado para aplicación tópica.

25 En una realización adicional, la invención se refiere a un kit que contiene al menos uno de los compuestos de la presente invención empaquetado para su distribución al por menor, en asociación con las instrucciones, aconsejando al consumidor sobre cómo utilizar el compuesto que alivia una condición mediada por TGF β . Una realización adicional se refiere al uso de un compuesto como un agente de diagnóstico para detectar la activación inapropiada de una vía activada por TGF β .

Definiciones

30 Como se utiliza en toda esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones, los siguientes términos tienen los significados definidos a continuación, salvo que se indique específicamente lo contrario.

El plural y singular deben ser tratados como intercambiables, con excepción de la indicación del número:

35 Una "cicatriz" es una marca que está presente después de la reparación de la herida en el sitio de una herida. El término "cicatriz" incluye las cicatrices queloides, cicatrices hipertróficas y cicatrices que predominantemente no se elevan y predominantemente no crecen más allá de los límites de la herida original.

Una "cicatriz queloide" es un crecimiento excesivo de tejido cicatricial en un sitio de la herida, que normalmente crece más allá de los límites de la herida original.

Una "cicatriz hipertrófica" es una cicatriz elevada que predominantemente no crece más allá de los límites de la herida original.

- 5 El término "herida" se refiere a una lesión que altera la integridad normal de un tejido, tal como la piel. Un "herida" puede ocurrir intencional o accidentalmente. Ejemplos de heridas incluyen laceraciones, heridas contusas, heridas cerradas, heridas abiertas, heridas perforadas, heridas incisas, heridas punzantes, quemaduras, etc.

El término "paciente" se refiere a animales de sangre caliente tales como, por ejemplo, cobayas, ratones, ratas, jerbos, gatos, conejos, perros, monos, chimpancés, macacos de cola de tocón, y los seres humanos.

- 10 El término "tratar" se refiere a la capacidad de los compuestos para mitigar, aliviar, o ralentizar la progresión de la enfermedad del paciente (o condición) o cualquier daño tisular asociado con la enfermedad.

El término "mamífero" se refiere a un miembro de la clase Mammalia. Los ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitación, seres humanos, primates, chimpancés, roedores, ratones, ratas, conejos, caballos, ganado, perros, gatos, ovejas y vacas. En una realización particular, un mamífero es un humano.

- 15 El término "isómero" significa "estereoisómero" e "isómero geométrico", como se define a continuación.

El término "estereoisómero" significa compuestos que poseen uno o más centros quirales y cada centro puede existir en la configuración R o S. Los estereoisómeros incluyen todas las formas diastereoméricas, enantioméricas y epiméricas así como racematos y mezclas de los mismos.

- 20 El término "isómero geométrico" significa compuestos que puedan existir en las formas cis, trans, anti, entgegen (E), y zusammen (Z), así como mezclas de las mismas.

Algunos de los compuestos pueden existir como isómeros geométricos. Los compuestos pueden poseer uno o más centros asimétricos, por lo tanto, existentes como dos, o más, formas estereoisoméricas. La presente invención incluye todos los estereoisómeros individuales e isómeros geométricos de los compuestos y mezclas de los mismos. Los enantiómeros individuales se pueden obtener por separación quiral, mediante el uso de bloques de construcción sintética disponibles que incorporan el centro asimétrico relevante con la estereoquímica apropiada en la síntesis, o mediante síntesis asimétrica a partir de bloques de construcción sintéticos aquirales.

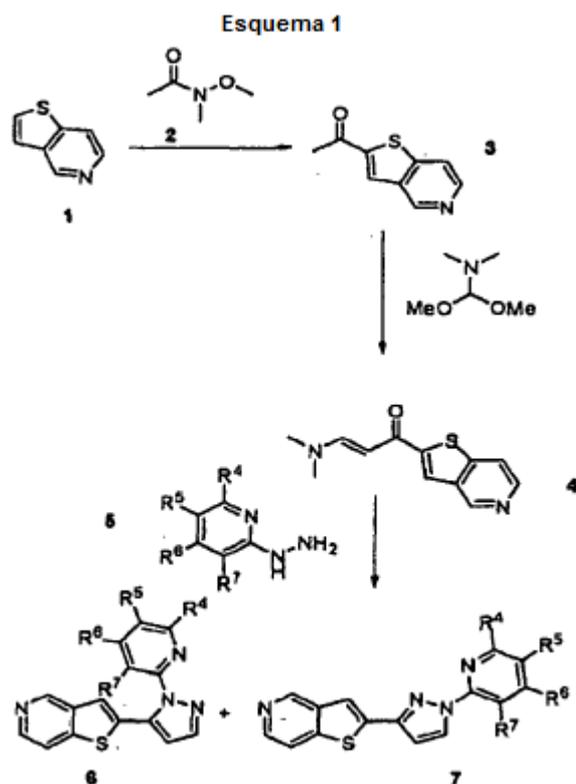
- 25

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir como formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

- 30 Además, los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas, con solventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y similares. Los compuestos también pueden existir en uno o más estados cristalinos, i.e., polimorfos, o pueden existir como sólidos amorfos. Todas estas formas están destinadas a ser abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

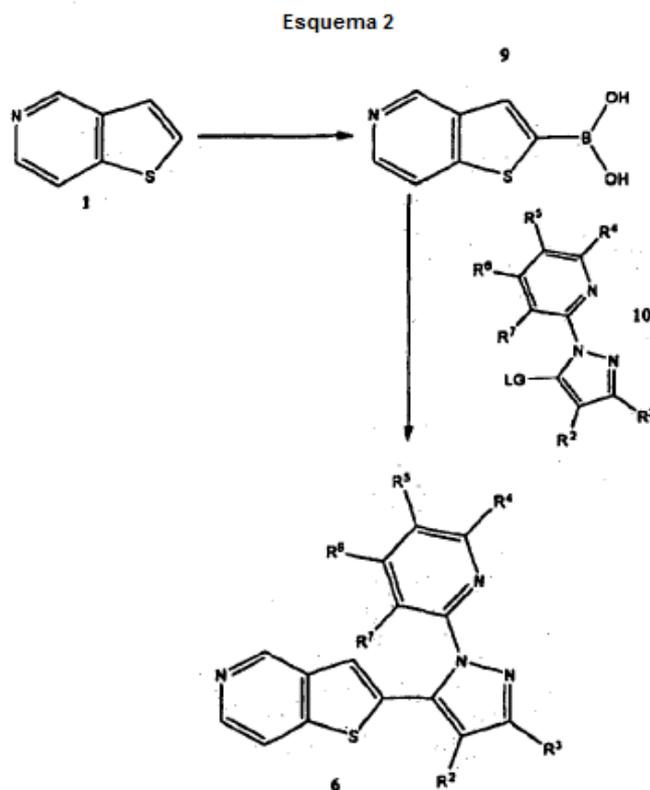
Preparación de los compuestos

- 35 Los esquemas de síntesis general para la preparación de tales compuestos se exponen a continuación.



El esquema 1 representa la síntesis de pirazol 6. Una tieno[3,2-c] piridina 1 (véase, por ejemplo, Wikel et al. (1993) J. Het. Chem., 30: 289-290) en un solvente aprótico tal como THF (tetrahidrofurano), éter dietílico, etc. se puede hacer reaccionar con un reactivo de alquilatio tal como n-butilitio en o por debajo de aproximadamente -40 °C. La tieno [3,2-c] piridina se muestra como no sustituida en el Esquema 1, sin embargo, puede estar opcionalmente sustituida como se describe en este documento. A continuación, se adicionan N-metil-N-metoxiacetamida 2 (u otros agentes de acilación apropiados, tales como N-acetil-morfolina, anhídrido acético, y cloruro de acetilo) a la reacción y se deja que la reacción prosiga de -30 a -45 °C para proporcionar la cetona 3 (por ejemplo, 1-(tieno [3,2-c] piridin-2-il) etanona).

A continuación, la cetona 3 se hace reaccionar con dimetoxi-N,N-dimetilmetanamina ("DMF-DMA") en DMF (dimetilformamida) a aproximadamente 70 °C, para proporcionar 4 (por ejemplo (E)-3-(dimetilamino)-1-(tieno[3,2-c]piridin-2-il)prop-2-en-1-ona). 4 se trata con una piridinil-hidrazina 5 (por ejemplo, 1-(6-metilpiridin-2-il)hidrazina) en ácido acético a aproximadamente 80 °C para dar los regioisómeros 6 y 7. El regioisómero 7 se puede separar desde 6 para proporcionar 8 usando técnicas de purificación convencionales tales como precipitación, filtración y cromatografía en columna.



El Esquema 2 representa una ruta de síntesis alternativa para el pirazol 6. Una solución de un tieno [3,2-c] piridina 1 se puede hacer reaccionar en una atmósfera de gas nitrógeno, en un solvente tal como THF a aproximadamente -50 °C a -78 °C con un reactivo alquilítico tal como n-butillitio. El tieno [3,2-c] piridina se muestra como no sustituido en el Esquema 2, sin embargo, puede estar opcionalmente sustituido como se describe en este documento. La adición de borato de triisopropilo y ácido fosfórico produce la sal de ácido fosfórico del ácido borónico 9. A continuación, el boronato 9 se acopla al piridinil-pirazol 10 para proporcionar el pirazol 6, mediante la adición de una base tal como una base carbonato inorgánica (por ejemplo, Na₂CO₃, K₂CO₃, NaHCO₃, etc.) o fosfato tribásico de potasio, y un catalizador de paladio tal como Pd(Cl₂) dppf (dicloro(1,1 bis (difenilfosfino)ferroceno) paladio (II)) y dppf [(1,1 bis (difenilfosfino) ferroceno). La reacción se puede llevar a cabo por calentamiento a reflujo, durante 1-24 horas en un solvente apropiado tal como THF o 1,2-dimetoxietano, o a aproximadamente 80-100 °C en dioxano. Esta reacción también se puede llevar a cabo en presencia de KF y agua. Los ésteres de boronato correspondientes se pueden utilizar en lugar del ácido bórico 9. El grupo LG de 10 representa un grupo saliente apropiado tal como trifluorometanosulfonilo, Br, I, o Cl. Los correspondientes análogos tieno[3,2- b]piridin-2-il, tieno[2,3-c]piridin-2-il, y tieno[2,3-b]piridin-2-il de 6, se pueden preparar utilizando tieno[3,2-b] piridina, tieno[2,3-c]piridina, y tieno[2,3-b]piridina, respectivamente, en lugar de 1.

Sales farmacéuticamente aceptables

Los compuestos de la presente invención pueden ser capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero no limitando a, sales de adición de ácido y/o base. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluyen las sales de adición de ácido y base (incluyendo disales) de los mismos. Ejemplos de sales apropiadas se pueden encontrar por ejemplo en Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2002); y Berge et al., 'Pharmaceutical Salts,' J. of Pharmaceutical Science, 1977;66: 1-19.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluyen sales no tóxicas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fósforo, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxil alcanicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y sulfónicos aromáticos, etc. Tales sales incluyen de este modo las sales acetato, aspartato, benzoato, besilato (bencenosulfonato), bicarbonato/carbonato, bisulfato, caprilato, camsilato (alcanforsulfonato), clorobenzoato, citrato, edisilato (1,2-etano disulfonato), dihidrogenofosfato, dinitrobenzoato, esilato (etano sulfonato), fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, hidroyoduro/yoduro, isobutirato, monohidrogenofosfato, isetionato, D-lactato, L-lactato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato (metanosulfonato), metafosfato, metilbenzoato, metilsulfato, 2-napsilato (2-naftaleno sulfonato), nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmoato, fenilacetato, fosfato, ftalato, propionato, pirofosfato, piro-sulfato, sacarato, sebacato, estearato, suberato, succinato sulfato, sulfito, D-tartrato,

L-tartrato, tosilato (tolueno sulfonato), y sales de xinafoato, y similares de los compuestos de Fórmula I. También se contemplan las sales de aminoácidos tales como arginato, gluconato, galacturonato, y similares.

5 Las sales de adición de ácido de los compuestos básicos se pueden preparar poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal particular. La forma de base libre se puede regenerar poniendo en contacto la forma de sal con una base y aislando la base libre. Las formas de base libre pueden diferir de sus respectivas formas de sal en ciertas propiedades físicas tales como la solubilidad en solventes polares.

10 Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden formar con metales o aminas, tales como hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, o de aminas orgánicas. Ejemplos de metales usados como cationes son aluminio, calcio, magnesio, potasio, sodio, y similares. Ejemplos de aminas apropiadas incluyen arginina, colina, cloroprocaína, N, N'-dibenciletlenodiamina, dietilamina, dietanolamina, diolamina, etilendiamina (etano-1,2-diamina), glicina, lisina, meglumina, N-metilglucamina, olamina, procaína (benzatina) y trometamina.

15 Las sales de adición de base de compuestos ácidos se pueden preparar poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de la manera convencional. La forma de ácido libre se puede regenerar poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre. Las formas de ácido libre pueden diferir desde sus respectivas formas de sal un poco en ciertas propiedades físicas tales como solubilidad en solventes polares.

Composiciones farmacéuticas

20 En general, los compuestos de la presente invención se pueden administrar como una composición farmacéutica, que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La frase "composición farmacéutica" se refiere a una composición apropiada para la administración en uso médico o veterinario. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para inhibir, detener, o permitir una mejora en la enfermedad que se está tratando cuando se administra sola o en combinación con otro agente farmacéutico o tratamiento en un sujeto particular o población de sujetos. Por ejemplo, en un humano u otro mamífero, una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar experimentalmente en un laboratorio o entorno clínico, por la enfermedad particular y sujeto que se va a tratar.

Se debe apreciar que la determinación de formas de dosificación apropiadas, cantidades de dosificación y vías de administración está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica farmacéutica y médica, y se describe a continuación.

30 El término "excipiente" se usa en este documento para describir cualquier ingrediente distinto del(los) compuesto(s) de la invención. Por lo general, la elección del excipiente depende en gran medida de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. De acuerdo con lo anterior, hay una amplia variedad de formulaciones apropiadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennaro et al. Eds., Lippincott Williams and Wilkins, 2000).

Un compuesto de la presente invención se puede formular como una composición farmacéutica en forma de un jarabe, un elixir, una suspensión, un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, un comprimido para deshacerse en la boca, un troscito, una solución acuosa, una crema, un ungüento, una loción, un gel, una emulsión, etc.

40 Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la presente invención, los excipientes farmacéuticamente aceptables por lo general son excipientes sólidos y líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un excipiente sólido puede ser una o más sustancias que pueden actuar también como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos, o un material encapsulante.

45 En los polvos, el excipiente es por lo general un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el excipiente que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones apropiadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

50 Los polvos y comprimidos contienen por lo general desde 1% a 95% (peso/peso) del compuesto activo. En ciertas realizaciones, el compuesto activo varía desde 5% a 70% (peso/peso). Los excipientes apropiados son carbonato de magnesio; estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material encapsulante como un excipiente que proporciona una cápsula en la que el componente activo con o sin otros excipientes, está rodeado por un excipiente, que está así en asociación con este. Del mismo modo, están incluidos sellos y comprimidos para deshacer en la boca. Los comprimidos,

polvos, cápsulas, píldoras, sellos y comprimidos para deshacer en la boca se pueden utilizar como formas de dosificación sólidas apropiadas para administración oral.

5 Para preparar supositorios, una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, se funde primero y el componente activo se dispersa homogéneamente en este, como por agitación. La mezcla homogénea fundida puede entonces ser vertida en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y de ese modo solidificar.

10 Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Las preparaciones líquidas se pueden preparar disolviendo el ingrediente activo en un solvente farmacéuticamente aceptable acuoso o no acuoso, que también puede contener agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, y agentes conservantes como son conocidos en la técnica.

15 También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas, poco antes del uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizantes, soluciones reguladoras, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

Un compuesto de la presente invención, solo o en combinación con otros componentes apropiados, se puede hacer en formulaciones en aerosol (i.e., pueden ser "nebulizados") para administrarse por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden colocar en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano nitrógeno, y similares.

20 Una composición tópica de acuerdo con la presente invención puede estar en la forma de soluciones, lociones, bálsamos, cremas, ungüentos, liposomas, aerosol, geles, espumas, palos de rodillos, o cualquier otra formulación usada rutinariamente para entregar una composición farmacéutica tópica.

25 Las formulaciones apropiadas para la administración parenteral, tales como, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea, incluyen soluciones de inyección acuosas y no acuosas isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, soluciones reguladoras, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

30 La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosificación unitaria. En tal forma la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. También, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello, o comprimido para deshacer en la boca en sí, o puede ser el número apropiado de cualquiera de éstos en forma envasada. Las formulaciones de compuestos se pueden presentar en dosis unitarias o recipientes multidosis sellados, tales como ampollas y viales.

35 Las composiciones que contienen un compuesto de la presente invención se pueden envasar para la distribución minorista (i.e., un artículo de fabricación). Tales artículos pueden ser etiquetados y envasados en la forma que indique al paciente cómo utilizar el producto. Tales instrucciones pueden incluir la condición que se va a tratar, la duración del tratamiento, esquema de dosificación, etc.

40 La cantidad del componente activo en una preparación de dosis unitaria se puede variar o ajustar desde 0.1 mg a 1000 mg, preferiblemente desde 1.0 mg a 100 mg, o desde 0.01% a 95% (peso/peso) de una dosis unitaria, de acuerdo a la aplicación particular y la potencia del componente activo. La dosis administrada a un sujeto, en el contexto de la presente invención debe ser suficiente para afectar a una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto con el tiempo. La composición puede, si se desea, contener también otros agentes terapéuticos compatibles.

45 La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de la experiencia del médico. Por lo general la dosis será determinada por la eficacia del compuesto particular empleado y la condición del sujeto, la gravedad de la enfermedad que se va a tratar, así como el peso corporal o el área de la superficie del sujeto a tratar. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un compuesto particular en un sujeto particular. En la determinación de la cantidad eficaz del compuesto que se va a administrar en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad que se está tratando, el médico puede evaluar factores tales como los niveles circulantes en plasma del compuesto, toxicidades del compuesto, y/o la progresión de la enfermedad, etc. Además, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a una velocidad determinada por factores que pueden incluir el perfil farmacocinético del compuesto, fármacos contraindicados y los efectos secundarios del compuesto a diversas concentraciones, tal como se aplica a la masa y salud general del sujeto.

Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. En lo sucesivo, la dosificación se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por conveniencia, la dosificación diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día, si se desea.

5 Métodos de uso

Mientras que un compuesto de la presente invención se puede utilizar más por vía tópica para reducir la cicatrización, la invención no se limita a esta condición específica. Un compuesto de la presente invención se puede utilizar para reducir una cicatriz existente. Un compuesto de la presente invención también se puede utilizar para aliviar cualquier tipo de condición mediada por TGF β . Ejemplos de las condiciones mediadas por TGF β incluyen todos los tipos de cáncer (por ejemplo, mama, pulmón, colon, próstata, ovario, páncreas, melanoma, todas las neoplasias hematológicas, etc.), así como todos los tipos de enfermedades fibróticas (por ejemplo, glomerulonefritis, nefropatía diabética, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, hiperplasia arterial y reestenosis, esclerodermia y cicatrización dérmica). En una realización particular, la condición mediada por TGF β es la cicatrización dérmica.

El término "administración" se refiere al método de poner en contacto un compuesto con un sujeto. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por una variedad de rutas incluyendo la inyección, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal, parenteral, o intraperitoneal. También, los compuestos descritos en este documento se pueden administrar por inhalación, por ejemplo, por vía intranasal. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía transdérmica, tópica, y por medio de la implantación. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención se suministran por vía oral. Los compuestos también pueden ser entregados por vía rectal, bucal, intravaginal, u ocular.

Cuando se administra para reducir las cicatrices, un compuesto de la presente invención por lo general se puede aplicar a la herida y/o el área alrededor de una herida. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención se puede administrar por vía tópica a una herida en forma de un parche, solución, loción, bálsamo, crema, ungüento, liposoma, aerosol, gel, espuma, palo de rodillo, o cualquier otra formulación usada rutinariamente para entregar una composición farmacéutica tópica. Alternativamente, un compuesto de la presente invención se puede administrar a través de inyección en una herida o el área alrededor de una herida. En ciertas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra a una herida que ha sido suturada, grapada, pegada, y/o vendada, etc. En ciertas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra inmediatamente después de producirse la herida. En otras realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra dentro de 1 hora, 8 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 6 meses, 1 año, o más de 1 año, después de la aparición de heridas. En una realización particular, la herida se produce a través de una incisión. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se pueden administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento para inhibir la formación de cicatriz queloide. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento para inhibir la formación de cicatriz hipertrófica. En ciertas realizaciones son métodos para inhibir la formación de cicatrices, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde se produciría la cicatriz en la piel.

La reducción de la cicatrización o la inhibición de la formación de cicatrices está destinada a transmitir que los compuestos de la presente invención se refieren a la reducción de la aparición de una cicatriz como se juzga por el paciente o un profesional de la salud (por ejemplo, un médico). La reducción de la formación de cicatrices o la inhibición de la formación de cicatrices puede ser acompañada por una mejora en uno o más de los siguientes indicios, incluyendo, reducción de la deposición de matriz extracelular durante la curación, reducción de la deposición de colágeno, reducción del tamaño, reducción de la forma, reducción del espesor, reducción del área superficial, reducción de la severidad, reducción de la altura, mejora en la coloración etc.

En una realización típica, el compuesto se administra por vía tópica. Como se utiliza en este documento, tópica se refiere a la aplicación de los compuestos (y el portador opcional) directamente sobre la piel o área de la herida. La administración tópica es especialmente apropiada para heridas a la piel. La dosis puede variar, pero como una directriz general, el compuesto puede estar presente en un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad desde aproximadamente 0.01 a 50 % peso/peso, y más por lo general desde aproximadamente 0.1 a 10 % peso/peso. La composición farmacéutica puede ser aplicada al área afectada desde 1 a 4 veces al día.

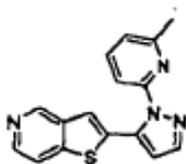
En otras realizaciones de la invención, el compuesto puede ser coadministrado con otros compuestos, agentes, o apósitos para mejorar aún más su actividad, o para reducir al mínimo los posibles efectos secundarios. Como se utiliza en esta aplicación, coadministrado se refiere a la administración del compuesto de Fórmula I con un segundo medicamento, que por lo general tiene un mecanismo de acción diferente, utilizando un régimen de dosificación que promueve el resultado deseado. Esto se puede referir a dosificación simultánea, la dosificación en diferentes momentos durante un único día, o incluso dosificación en diferentes días. Los compuestos se pueden administrar por separado o se pueden combinar en una única formulación. Para la reducción de la cicatrización, se pueden administrar agentes,

5 compuestos, o apósitos conjuntamente con un compuesto de la presente invención, incluyendo TGF β ₃, anticuerpos TGF β ₁, anticuerpos TGF β ₂, acetónido de triamcinolona (9-fluoro-11,16,17-trihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,6,9,10,11,12, 13,14,15,16,17-dodecahidrociclopenta[*a*]fenantren-3-ona), esteroides, corticoides, antibióticos, antibióticos tópicos y láminas de silicona. Además, los agentes, compuestos, o apósitos se pueden administrar conjuntamente a una herida que mejoran la cicatrización de heridas, incluyendo 5-fluorouracilo, estrógeno, agonistas del receptor nACh (nicotínico de la acetilcolina), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

10 Además, los siguientes agentes terapéuticos pueden ser coadministrados con un compuesto de la presente invención para tratar una condición mediada por TGF β . Ejemplos de agente(s) terapéutico(s) apropiado(s) incluyen, pero no se limitan a, agentes no esteroideos antiinflamatorios estándar (en adelante NSAID) (por ejemplo, piroxicam, diclofenaco), ácidos propiónicos (por ejemplo, naproxeno, flubiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno e ibuprofeno), fenamatos (por ejemplo, ácido mefenámico, indometacina, sulindac, apazona), pirazolonas (por ejemplo, fenilbutazona), salicilatos (por ejemplo, aspirina), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib, valdecoxib y etoricoxib), analgésicos y terapias intraarticulares (por ejemplo, corticosteroides) y ácidos hialurónicos (por ejemplo, Hyalgan y Synvisc), agentes contra el cáncer (por ejemplo, endostatina y anglostatin), fármacos citotóxicos (por ejemplo, adriamicina, daunomicina, cis-platino, etopósido, taxol, taxotere), alcaloides (por ejemplo, vincristina), y antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato), agentes cardiovasculares (por ejemplo, bloqueadores de los canales de calcio), agentes hipolipemiantes (por ejemplo, estatinas), fibratos, betabloqueantes, inhibidores de la ACE. Antagonistas de los receptores de Angiotensina-2 e inhibidores de la agregación plaquetaria, agentes del CNS (por ejemplo, como antidepresivos (tales como sertralina)), fármacos contra el parkinson (por ejemplo, deprenil, L-dopa, Requip, Mirapex), inhibidores de MAOB (por ejemplo, selegina y rasagilina), inhibidores de comP (por ejemplo, Tasmara), inhibidores de A-2, inhibidores de la recaptación de dopamina, antagonistas de NMDA, agonistas de nicotina, agonistas de la dopamina e inhibidores de óxido nítrico sintasa neuronal), fármacos contra el Alzheimer (por ejemplo, donepezil, tacrina, inhibidores de COX-2, propentofilina o metrifonato), agentes contra la osteoporosis (por ejemplo, roloxifeno, droloxifeno, lasofoxifeno o fosomax) y agentes inmunosupresores (por ejemplo, FK-506 y rapamicina).

Aunque la invención se ha descrito en relación con las realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales. Los siguientes ejemplos y datos biológicos se presentan con el fin de ilustrar adicionalmente la invención. Esta divulgación no se debe interpretar como limitante de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS



30

Ejemplo 1. 2-(1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il)tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

Etapa i: Tieno[3,2-c]piridina. Tieno[3,2-c]piridina (9.20 g; sólido de color naranja marrón oscuro; véase Wikel et al. (1993) J. Het. Chem., 30: 289-290) se disolvió en CH₂Cl₂ y se sometió a cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, columna Isco RediSep de 120 g, equilibrada con hexanos, se eluye con EtOAc al 45% ("acetato de etilo")/hexanos, isocrático). Las fracciones recolectadas fueron un aceite de color amarillo pálido que se concentró a vacío para proporcionar 8.48 g de un sólido.

40 Alternativamente, tieno[3,2-c]piridina también se purificó de la siguiente manera: se disolvió tieno[3,2-c]piridina (84.6 g) en aproximadamente 180 mL de diclorometano. La solución se dividió en tres porciones aproximadamente iguales. Cada porción se aplicó a un cartucho instantáneo de sílica (Analogix SuperFlash SF65-400) y se eluyó con un método isocrático (45 % o 50 % de acetato de etilo en hexanos). Las fracciones deseadas se concentraron para proporcionar tieno[3,2-c]piridina como un sólido de color amarillo claro. Tres cromatografías combinadas proporcionaron un total de 75 g del compuesto del título; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9.12 (d, 1H, J=1.0 Hz), 8.44 (d, 1H, J=5.7 Hz), 7.79 (dt, 1H, J=5.7, 1.0 Hz), 7.47 (m, 1H), 7.43 (m, 1H); MS (APCI+) *m/z* 136 (MH⁺).

45 Etapa ii: 1-(tieno[3,2-c]piridin-2-il)etanona. Una solución de tieno[3,2-c]piridina (5.0 g) en 75 mL de THF (tetrahidrofurano) se enfrió a -45 °C en un baño de hielo seco/CH₃CN. Se adicionó n-butillitio (1.6M en hexanos) (35.0 mL) gota a gota manteniendo la temperatura interna a o por debajo de -40 °C. La adición llevó unos 45 minutos. La reacción se agitó, durante 1 hora a -45 °C. Se adicionó N-metil-N-metoxiacetamida en 5 mL de THF y como resultado la reacción se calentó a -30 °C. La reacción se agitó a -45 °C, durante 1.5 horas. La reacción se inactivó con NH₄Cl saturado. La capa acuosa tenía un pH de aproximadamente 8. La capa acuosa se extrajo tres veces en EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. El material se filtró, se concentró en un evaporador rotatorio y se sometió a cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, columna Analogix de 120 g, equilibrada con hexanos, se eluye con EtOAc al 50 %/hexanos). Las fracciones más puras se concentraron en un

50

evaporador rotatorio y a continuación, se trituraron con Et₂O para eliminar algo de color y recoger un sólido de color naranja pálido por filtración (2.667 g).

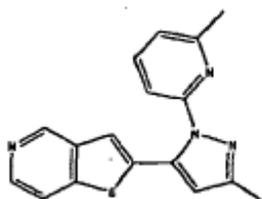
5 Etapa iii: (E)-3-(dimetilamino)-1-(tieno[3,2-c]piridin-2-il)prop-2-en-1-ona. Se adicionó N,N-dimetilformamidadimetilacetal (DMF-DMA) (9.5 mL) a una solución de 1-(tieno[3,2-c]piridin-2-il)etanona (3.17 g) en 20 mL de DMF. La reacción se calentó a 70 °C, durante la noche. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La DMF se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener un sólido de color naranja marrón oscuro. El residuo se diluyó con EtOAc y agua. Una gran cantidad de sólido de color amarillo fue evidente. Este se recolectó por filtración (3.54 g). Este sólido se secó en un horno de vacío a 50°C.

Etapa iv: 2-(1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il)tieno[3,2-c]piridina.

10 La (E)-3-(dimetilamino)-1-(tieno[3,2-c]piridin-2-il)prop-2-en-1-ona (3.69 g) y la 1-(6-metilpiridin-2-il)hidrazina (3.3 g) (que se puede sintetizar como se describe a continuación para el ejemplo 7, Etapa ii) se disolvieron en 40 mL de ácido acético. La reacción se calentó a 80 °C, durante 4.5 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se eliminó en un evaporador rotatorio.

15 EL residuo de color rojo naranja intenso se disolvió en EtOAc y se le adicionó NaHCO₃ saturado hasta que el pH de la capa acuosa fue aproximadamente 7-8 (aproximadamente 250 mL). La capa acuosa se extrajo cuatro veces en EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. El material se filtró, se concentró, y se sometió a cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, columna Isco RediSep de 80 g, 0-50%, se mantiene a 50%. 50-75%, se mantiene a 75% de EtOAc/hexano).

20 Las fracciones que contienen el material deseado se combinaron y concentraron. El material resultante se disolvió en MeOH caliente y se formó un precipitado al enfriar a temperatura ambiente. Después de una hora a temperatura ambiente, el matraz se almacenó a 4°C, durante 3 horas. El sólido se recolectó por filtración, aclarando con hexanos dando 2.79 g. El material se disolvió en acetonitrilo hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez que un precipitado se hizo evidente, el precipitado se recolectó por filtración. El precipitado fue el regioisómero no deseado (2-(1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)tieno[3,2-c]piridina). Este proceso se repitió cuatro veces para enriquecer el filtrado de acetoneitrilo con el regioisómero deseado (2-(1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il)tieno[3,2-c]piridina). El filtrado de acetoneitrilo en el enfriamiento contenía un precipitado de color blanco que fue el producto deseado. Un rendimiento total de 1.21 g del producto deseado fue obtenido (2-(1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il)tieno[3,2-c]piridina).



Ejemplo 2. 2-[3-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

30 Etapa i: Ácido tieno[3,2-c]piridin-2-il borónico. Un matraz de tres cuellos equipado con un termómetro interno que contiene tieno[3,2-c]piridina (5.0 g, 37 mmol, 1 equivalente) se evacuó y luego se llenó con una atmósfera de gas nitrógeno. Se adicionó THF (60 mL) y la solución se enfrió a -44 °C (CH₃CN/hielo seco). Se adicionó n-butilitio (1.6M/hexano, 25 mL, 41 mmol, 1.1 equivalentes) durante 10 minutos, mientras se mantenía la temperatura interna a o por debajo de -33 °C. La reacción se agitó a -33 a -45 °C, durante 60 minutos. Se adicionó borato de trisopropilo (10.2 mL, 44 mmol, 1.2 equivalentes) y el baño de enfriamiento se eliminó. La reacción se dejó proceder, durante 105 minutos. A continuación, se adicionaron 3.0 mL de ácido fosfórico (85% acuoso, 3.0 mL, 44 mmol, 1.2 equivalentes). Un sólido de color amarillo formado, que se diluyó con agua y Et₂O (aproximadamente 150 mL cada uno). Un sólido de color amarillo se recolectó por filtración y se secó por succión durante la noche (5.05 g). Datos analíticos: ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 7.95 (1 H, s), 8.09 (1 H, d, J= 5.9 Hz), 8.34 (1 H, d, J=6.1 Hz), 9.09 (1 H, s). MS (APCI, M+1) 180.1. Microanálisis de C₇H₆BNSO₂ H₃PO₄: C calculado, 30.35; H, 3.27; N, 5.06; P, 11.18. Encontrado: C, 41.12; H, 3.19; N, 6.53; P, 0.68%.

45 Etapa ii. 3-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol. Se combinaron acetoacetato de etilo (10 mL, 78 mmol) y (6-metilpiridin-2-il)hidrazina (10.1 g, 82 mmol) en 100 mL de ácido acético. La reacción se calentó a 80 °C, durante 4 horas y 15 minutos. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. El solvente se eliminó en un evaporador rotatorio para proporcionar un residuo oscuro, que se disolvió en EtOAc. La solución se lavó dos veces con NaHCO₃ saturado, a continuación, una vez con agua, y luego una vez con salmuera. Un sólido de color marrón rojizo se hace evidente en la mezcla bifásica. La mezcla bifásica se filtró, recolectando el sólido. El sólido se lavó con Et₂O para proporcionar un primer sólido (6.02 g). Las capas del filtrado se separaron utilizando un embudo de separación. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄. El material se filtró y se concentró por evaporación rotatoria. El sólido de color marrón resultante se

trituró con Et₂O y se sometió a filtración para proporcionar un segundo sólido (1.98 g) y un primer filtrado. Un sólido se precipitó fuera del primer filtrado, que se recolectó vertiendo el filtrado en otro filtro para proporcionar 1.69 g de un tercer sólido. El primer filtrado y el 1.98 g (segundo sólido) se concentraron a sequedad. El sólido resultante se disolvió en EtOAc caliente y se adicionaron hexanos hasta que una turbidez persistió. La solución se dejó reposar durante la noche.
 5 Un sólido muy oscuro se aisló por filtración y se sometió a cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, columna Analogix de 35 g, EtOAc al 30 %/hexano). Se aisló un sólido de color amarillo que se disolvió en EtOAc caliente y se adicionaron hexanos hasta que una turbidez persistió. La solución se dejó reposar durante la noche. El licor madre se decantó y el sólido se secó sólido en el horno de vacío a 50 °C, durante varias horas para proporcionar un cuarto sólido.
 10 El primer sólido (6.02 g), tercer sólido (1.69 g), y cuarto sólido (4.03 g) se combinaron para proporcionar 11.74 g del compuesto del título.

Etapa iii. 3-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il trifluorometanosulfonato. Una mezcla de 3-metil- 1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol (10.0 g en CH₂Cl₂ (100 mL) y Et₃N (trietilamina) (8.1 mL) se enfrió a -70 °C. Se adicionó anhídrido tríflico (9.8 mL) durante 10 minutos mientras se mantenía la temperatura por debajo de -50 °C. La suspensión de reacción se calentó a temperatura ambiente y se convirtió en una solución. La solución se concentró para eliminar la mayor parte del CH₂Cl₂. La solución se cargó directamente sobre una Analogix SuperFlash SF65-400: utilizando un colector de fracciones Biotage auto; EtOAc/hexanos (20/80). Las fracciones que contienen un líquido incoloro se aislaron (9.46 g).
 15

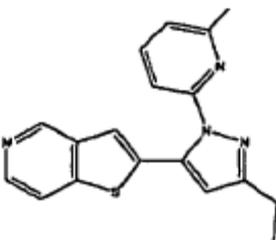
Etapa iv: 2-[3-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina.

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL equipado con un condensador de reflujo se adicionaron 3-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ilo (1.16 g), ácido tieno [3,2 -c] piridin-2-ilborónico (1.0 g), fosfato tribásico de potasio (2,3 g) y 30 mL de dioxano. El matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. A este se le adicionó PdCl₂ (dppf) (Corriente, aducto dicloro [1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno] paladio (II) diclorometano, 0.60 g). De nuevo, el matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. La reacción se calentó a 100 °C y se dejó funcionar durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de Celite, eluyendo con EtOAc (-600 mL). El filtrado de EtOAc se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ y un sólido de color beige se separó por filtración. El filtrado de CH₂Cl₂ se purificó por cromatografía en columna (sistema Horizonte Biotage, columna Analogix de 34 g, 0-100% EtOAc/hep, se mantiene a 100% EtOAc seguido por MeOH al 10%/EtOAc). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron en el evaporador rotatorio para dar un aceite oscuro. El aceite oscuro (aproximadamente 800 mg) se sometió a cromatografía en columna preparativa en una Phenomenex, columna Gemini C-18 (150x19 mm, 5 μM; fase móvil A: agua (+NH₄OH al 0.1%), B: CH₃CN (+NH₄OH al 0.1%); Gradiente: 90-10% A durante 10 min, se mantiene a 90% A durante 1.5 minutos; Velocidad de flujo: 28 mL/min; Volumen de inyección: 2 mL; Detección: DAD 210-350 nm, MS APCI+, MS APCI-).
 20
 25
 30

Las fracciones deseadas se secaron en un evaporador rotatorio. El sólido se disolvió en EtOH caliente y después se adicionaron 2-5 mL de heptano. Después de reposar, el material se filtró.
 35

El filtrado se concentró a sequedad. Se adicionó éter dietílico y la solución se filtró en un embudo de vidrio sinterizado. Se usó éter dietílico adicional para lavar el material hasta que <10 mg del sólido de color marrón permaneció en el embudo de vidrio sinterizado. El filtrado se concentró a sequedad dando un sólido de color blanco crema.

El sólido de color blanco crema se disolvió en EtOH caliente (aproximadamente 1-2 mL) y se diluyó con heptano hasta que una turbidez persistió, y se dejó reposar. A continuación, agujas (ligero color amarillo) comenzaron a precipitar a partir de la solución. Después de aproximadamente 3 horas, los licores madre se decantaron en otro matraz. Las agujas se secaron en un horno de vacío a 40 °C, durante más de 48 horas, para proporcionar 65 mg de un sólido de color blanco. pf 131-132 °C.
 40



45 **Ejemplo 3. 2-[3-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)**

Etapa i: 5-etil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-ol. Una mezcla en agitación de 6-metil-piridin-2-il)-hidrazina (10.0 g) y propionilacetato de etilo (12 mL) en ácido acético glacial (100 mL) se calentó a 80 °C, durante cinco horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el evaporado se trató con bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 mL).

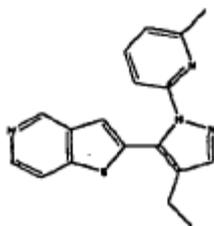
La mezcla se extrajo con acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se lavó con una porción fresca de bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 mL), agua (200 mL) y solución de salmuera (200 mL). La fase orgánica se secó posteriormente sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida. El evaporado se purificó por cromatografía instantánea en columna de sílica gel. La elución a través de un cartucho de sílica (Analogix, 400 g) con un gradiente (hexanos al 100% con acetato de etilo al 60% en hexanos) proporcionó un aceite. El aceite se reconstituyó en cloroformo y la solución se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite (7.2 g); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 13.07 (ancho s, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.64 (d, 1H, $J=8.2$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J=7.4$ Hz), 5.42 (s, 1H), 2.59 (cuarteto, 2H, $J=7.6$ Hz), 2.51 (s, 3H), 1.24 (t, 3H, $J=7.6$ Hz); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 227, 23.8, 86.8, 108.8, 119.2, 140.2, 154.3, 155.0, 157.2, 157.4; MS (APCI+) 204 (MH+).

Etapa ii: 5-etil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico. A una mezcla en agitación de 5-etil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-ol (7.1 g) y trietilamina (5.4 mL) en diclorometano (75 mL) a -78 °C bajo una atmósfera de nitrógeno se le adicionó anhídrido trifluorometanosulfónico (6.5 mL) durante 5 minutos. El baño frío se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el concentrado se purificó por cromatografía instantánea en columna de sílica gel. La elución a través de un cartucho de sílica (Analogix SuperFlash SF65-400) con un gradiente (100% hexanos a 35% de acetato de etilo en hexanos sobre 2400 mL) proporciona el compuesto del título como un aceite (10.38) después de aislarlo con cloroformo; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (m, 1H), 7.59 (dd, 1H, $J=8.2$, 0.6 Hz), 7.07 (dd, 1H, $J=7.6$, 0.4 Hz), 6.10 (s, 1H), 2.68 (cuarteto, 2H, $J=7.6$ Hz), 2.57 (s, 3H), 1.28 (t, 3H, $J=7.6$ Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -73.9 (s); MS (APCI+) 336 (MH+). 204 (MH+- SO_2CF_3).

Etapa iii: 2-[3-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL equipado con un condensador de reflujo se adicionaron 3-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il trifluorometanosulfonato (1.21 g), ácido tieno[3,2-c]piridin-2-ilborónico (1.0 g), fosfato tribásico de potasio (2.3 g) y 30 mL de dioxano. El matraz se evacuó bajo vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. A este se le adicionó PdCl_2 (dppf) (Corriente, aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) diclorometano, 0.60 g). De nuevo, el matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. La reacción se calentó a 100 °C y se dejó proceder durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Después, la reacción se filtró a través de Celite, aclarando bien con EtOAc. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio y el material oleoso oscuro se diluyó con CH_2Cl_2 . Se filtró un sólido de color blanco crema desde el CH_2Cl_2 . El filtrado se cargó en una columna (sistema Biotage Horizon, columna Analogix de 34 g, 0-100% heptano/EtOAc), a continuación, se mantiene a 100% de EtOAc). Las fracciones deseadas se recolectaron para dar un aceite oscuro (aproximadamente 900 mg). Las fracciones se sometieron a cromatografía en una Phenomenex, columna Gemini C-18 como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2.

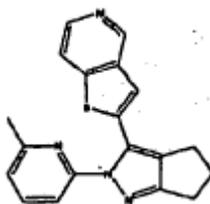
Las fracciones deseadas se combinaron y se secaron en un evaporador rotatorio para proporcionar una muestra sólida. La muestra sólida se disolvió en EtOH caliente. La solución se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio para obtener un residuo oscuro. El residuo se secó en horno de vacío a 45 °C, durante 2 horas. El material resultante fue parte de aceite oscuro y parte sólida. Se adicionó éter dietílico y el material se filtró para proporcionar un sólido de color marrón oscuro, y un filtrado de color amarillo anaranjado claro. El filtrado se concentró a sequedad para obtener un sólido de color marrón claro (231 mg).

Se adicionó éter dietílico al sólido de color marrón claro. El material se filtró a través de papel filtro plegado, dejando un residuo marrón sobre papel de filtro. El filtrado se concentró a sequedad en el evaporador rotatorio. Los sólidos resultantes se disolvieron de nuevo en EtOH caliente (1-2 mL) y se diluyó con heptano hasta que una turbidez persistió. Después de 2 horas de reposo, ningún precipitado fue evidente. El líquido se concentró luego a sequedad. Mientras que, en un evaporador rotatorio, cuando el líquido se había reducido a aproximadamente la mitad del volumen original, un sólido de color marrón fue evidente. El líquido fue retirado del evaporador rotatorio y la solución comenzó a mostrar una turbidez blanca. El líquido se filtró en otro matraz con papel de filtro para eliminar el sólido de color marrón. Un sólido de color blanco comenzó a precipitar en el filtrado. Después de aproximadamente 15 minutos, no se observó más precipitación, y el material se filtró para obtener un sólido. El sólido se secó en un horno de vacío a 40 °C, durante aproximadamente 48 horas para proporcionar 71 mg. pf 89-90 °C.



Ejemplo 4. 2-[4-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

- 5 Etapa i: 4-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol. Una suspensión de KOMe (14.0 g) y butirato de etilo (19.8 mL) en DMF (15 mL) se agitó a temperatura ambiente. Se adicionó formiato de etilo (8.1 mL) durante 15 minutos, lo que resultó en mucha formación de espuma. La reacción se agitó durante una hora adicional, y la reacción se convirtió en una mezcla muy agitable sin capa espumosa. Una solución de 1-(6-metilpiridin-2-il)hidrazina (12.3 g), MeOH (35 mL) y HOAc (5.7 mL) se adicionaron durante 20 minutos. La reacción fue exotérmica y alcanzó una temperatura de 30 °C, después de una adición inicial. Un baño de agua helada se utiliza para mantener la reacción por debajo de 20 °C, para la adición de la solución restante. La reacción se calentó a reflujo durante 3 horas y después se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas.
- 10 La reacción se enfrió a 10 °C con un baño de agua congelada. El pH se ajustó a aproximadamente 7 con HOAc (10 mL) para obtener una masa espesa, no agitable. La reacción se diluyó con H₂O (100 mL) para dar como resultado una solución de color rojo oscuro. La solución se extrajo con EtOAc (200 mL). La fase orgánica se lavó con H₂O (2 x 100 mL), se secó (MgSO₄) y SiO₂ (30 mL), y se filtró a través de SiO₂ (30 mL). El material se concentró para proporcionar 10.50 g de un aceite de color marrón oscuro. El aceite se sometió a cromatografía utilizando un Analogix SuperFlash SF65-400 y autocolector de fracciones Biotage; EtOAc/hexanos (40/60). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron para dar 6.40 g de un líquido de color amarillo-naranja.
- 15 Etapa ii: 4-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il trifluorometanosulfonato. Una solución de 4-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol (6.40 g) en CH₂Cl₂ (65 mL) y Et₃N (4.8 mL) se enfrió a -70 °C. Se adicionó anhídrido triflico (Tf₂O) (5.83 mL) durante 10 minutos manteniendo la temperatura por debajo de 50 °C. La reacción es exotérmica. La reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a menos de -50 °C y después se calentó a temperatura ambiente. Después, la reacción se enfrió a menos de -50 a °C y una porción adicional de Tf₂O (1.1 mL; 20%) y Et₃N (1.0 mL; 20%) se adicionó. Después de una hora de incubación, a continuación, la reacción se concentró para eliminar la mayor parte del CH₂Cl₂. La reacción se cargó directamente en una SF40-150 Analogix SuperFlash; utilizando un autocolector de fracciones Horizon EtOAc/heptano (20/80). La columna se lavó con EtOAc/heptano (30/70). Las fracciones que contenían el producto deseado se recolectaron para proporcionar 6.98 g de un líquido de color amarillo pálido.
- 20 Etapa iii: 2-[4-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL equipado con un condensador de reflujo se adicionaron 4-etil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il trifluorometanosulfonato (1.2 g), ácido tieno[3,2-c]piridin-2-ilborónico (1.2 g), fosfato tribásico de potasio (2.3 g) y 30 mL de dioxano. El matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. A este se le adicionó PdCl₂(dppf) (Corriente, aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) diclorometano, 0.60 g). De nuevo, el matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. La reacción se calentó a 100 °C, durante la noche. A continuación, se adicionaron 0.295 g de PdCl₂(dppf) (Corriente, aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) diclorometano) y la reacción se continuó, durante 4 horas y 15 minutos. La reacción se enfrió a temperatura ambiente.
- 25 Los contenidos de la reacción se filtraron a través de Celite aclarando bien con EtOAc, hasta que el producto deseado se había eluido. El filtrado se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio para formar un residuo oscuro. El residuo oscuro se recolectó en CH₂Cl₂ y los sólidos se filtraron a distancia. El filtrado resultante se redujo por la concentración en un evaporador rotatorio antes de cargar el material en una columna (sistema Biotage Horizon, 0-100% EtOAc sobre 700 mL a continuación, se mantiene a 100% de EtOAc, 500 mL). Los tubos con más producto evidente tenían un sólido de color blanco en los lados del matraz.
- 30 Los tubos que contenían el producto deseado se concentraron por evaporación rotatoria para proporcionar un aceite oscuro. El aceite oscuro se trituró con Et₂O y el sólido se separó por filtración. El precipitado sólido adicional fue aislado a partir del filtrado y se combinó con el sólido de la filtración inicial. Los sólidos combinados se disolvieron en EtOH caliente (aproximadamente 2 mL). Se adicionó heptano hasta que un precipitado comenzó a formarse. A continuación, un sólido oscuro se formó. Después de unos 10 minutos, parecía que el sólido había terminado la precipitación. La mezcla se filtró a través de filtro de papel en otro matraz. El filtrado se diluyó con más heptano hasta que una turbidez persistió. El filtrado se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Se formaron agujas de color blanco en el matraz con un residuo oscuro en la parte inferior del matraz. Los contenidos del matraz se concentraron a sequedad en un evaporador rotatorio y se disolvieron en 1-2 mL de EtOH caliente, se filtraron a través de papel de filtro y se diluyeron con heptanos hasta que una turbidez persistió. El matraz se dejó reposar durante 2 horas. A continuación, la mezcla se puso en un evaporador rotatorio para reducir el volumen del material. Mientras que, en el evaporador rotatorio, se hizo evidente un sólido de color pardo, cuando aproximadamente la mitad del volumen original estaba presente. Se retiró el matraz del evaporador rotatorio y se filtró en otro matraz con papel de filtro para eliminar un sólido de color marrón. Un sólido de color blanco comenzó a precipitar en el filtrado. El sólido de color blanco se recolectó por filtración y se secó en un horno de vacío a 40 °C, durante más de 48 horas para obtener 85 mg del compuesto del título.
- 35
- 40
- 45
- 50



Ejemplo 5. 2-(2-(6-metilpiridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidrociclopenta[c]pirazol-3-il)tieno[3,2-c]piridina.

5 Etapa i: ácido tieno[3,2-c]piridina-2-borónico. A una mezcla en agitación, que consta de tieno[3,2-c]piridina (2.0 g) en tetrahidrofurano anhidro (25 mL) a -40 °C, se le adicionó una solución que consta de n-butillitio 1.6 M en hexanos (10 mL) durante varios minutos (gota a gota al principio seguido por una corriente suave, constante). La mezcla de reacción se agitó, durante cinco minutos y se adicionó posteriormente borato de isopropilo (4.2 mL). El baño frío se retiró y la mezcla se dejó agitar durante una hora. Se adicionó agua (2 mL) a la mezcla en agitación, lo que causó que un sólido de color amarillo pálido precipitara instantáneamente. El precipitado se recolectó mediante filtración por vacío y los sólidos se aclararon ligeramente con agua (dando un filtrado de color amarillo turbio) y posteriormente con éter dietílico (dando un filtrado de color naranja oscuro). La porción acuosa del filtrado se separó a partir del solvente orgánico, y luego se diluyó con 1,4-dioxano (100 mL) y la solución se concentró bajo presión reducida. La adición de 1,4-dioxano (100 mL) al concentrado y la posterior concentración bajo presión reducida se repitió dos veces para proporcionar un polvo de color amarillo (0.8 g) después de la evaporación final.

15 Etapa ii: éster etílico del ácido 2-[(8-metil-piridin-2-il)-hidrazono]-ciclopentanocarboxílico. Una solución de etil 2-oxociclopentanocarboxilato (6.34 g, 5.88 mL) y (6-metil-piridin-2-il)-hidrazina (5 g) en etanol (100 mL) se calentó a 80 °C, bajo una atmósfera de nitrógeno, durante aproximadamente 19 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se eliminó por vacío para proporcionar un material en bruto (7.72 g), que se tomó directamente para la siguiente reacción.

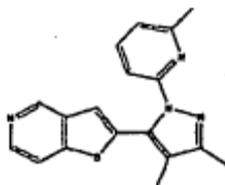
20 Etapa iii: 2-(6-metil-piridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidro-ciclopentapirazol-3-ol. Una solución de éster etílico del ácido 2-[(6-metil-piridin-2-il)-hidrazono]-ciclopentanocarboxílico en bruto (6.6 g) y metóxido de sodio (2.73 g) en metanol (250 mL) se concentró bajo presión reducida, casi hasta sequedad, para proporcionar una pasta de color marrón. A continuación, esta pasta se calentó a 160 °C, durante 2 horas siendo cauteloso el burbujeo excesivo. Después de 2 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó agua (100 mL). El pH se ajustó a 7 con HCl 1 N, luego se adicionó acetato de etilo (200 mL) y la mezcla resultante se agitó hasta que la disolución del precipitado ocurrió. Las capas se separaron y la capa acuosa se lavó con otra porción de acetato de etilo (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (200 mL) y salmuera (200 mL) y se secaron sobre MgSO₄, se filtraron, y se concentraron por vacío para proporcionar (3.6 g) del producto para utilizar, sin ninguna purificación adicional.

30 Alternativamente: La misma reacción se puede llevar a cabo a una temperatura inferior de 125 °C a partir de 21.0 g de éster etílico del ácido 2-[(6-metil-piridin-2-il)-hidrazono]-ciclopentanocarboxílico, para proporcionar 17.3 g del producto en bruto.

35 Etapa iv: 2-(6-metil-piridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidro-ciclopentapirazol- 3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico. A un matraz de fondo redondo secado en horno se le adicionó 2-(6-metil-piridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidro-ciclopentapirazol- 3-ol (17.3 g) y trietilamina (9.76 g, 13.44 mL) en diclorometano (350 mL) y la mezcla de reacción se enfrió a -78 °C. A este se le adicionó anhídrido trifluorometano sulfónico (16.23 mL) a través de un embudo igualador de presión, durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a -78 °C, durante 1 hora y luego se dejó calentar a temperatura ambiente y agitar por una hora adicional. El solvente se eliminó a vacío para proporcionar un precipitado de color marrón. El precipitado de color marrón se purificó a través de cromatografía instantánea de sílica gel (60% de hexanos/40% de acetato de etilo) para proporcionar un sólido de color blanco crema (8.848 g) seguido por otro lote de material (12.2 g) de material ligeramente menos puro.

40 Etapa iv: 2-(2-(6-metilpiridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidrociclopenta[c]pirazol-3-il)tieno[3,2-c]piridina. Un matraz de fondo redondo de tres bocas secado en horno equipado con condensador de reflujo y válvula de entrada de gas se cargó con ácido tieno[3,2-c]piridina-2-borónico (0.7 g). El matraz se evacuó y purgó con gas nitrógeno tres veces. El contenido del matraz se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno, durante cuatro días. Al matraz de reacción se le adicionó 2-(6-metil-piridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidro-ciclopentapirazol-3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico (0.7 g), fosfato tribásico de potasio (2.5 g), y 1,4-dioxano (30 mL). El matraz se evacuó y purgó con nitrógeno tres veces más. Se adicionaron aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino) ferroceno]paladio (II) diclorometano (0.65 g) y 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (0.43 g) y la mezcla se desgasificó y purgó con nitrógeno tres veces más. La mezcla de agitación se llevó a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (250 mL) y la solución se trató con carbón activado y se filtró a través de Celite.

El filtrado resultante se concentró a presión reducida y el concentrado se purificó en un cartucho instantáneo de sílica RediSep de 120 g en el sistema Biotage con 100% de hexanos a 100% de acetato de etilo sobre 1800 mL seguido por 100% de acetato de etilo hasta que eluyó el material deseado. El material deseado fue un residuo oscuro. Un líquido oscuro separado de un sólido que se adhirió al interior del matraz. El líquido se eliminó con etanol absoluto extrayendo con una pipeta y la solución oscura se evaporó durante la noche para dar un residuo viscoso oscuro. El material se disolvió en acetonitrilo (15 mL) y se purificó por HPLC preparativa (Waters prep HPLC system; Stationary phase: Waters DeltPak C18 5 μ m, 100 Angstrom, 300x50 mm I.D., P/N 011801, WAT 011801, No. 330C09125W; Fase móvil 80:20 a 40:60 agua-acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico durante 30 minutos). Las fracciones combinadas se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar una solución acuosa incolora transparente. La solución se trató con carbonato de potasio acuoso saturado para dar una suspensión lechosa. La extracción con una porción de éter dietílico y dos porciones de acetato de etilo, el secado de los extractos combinados sobre carbonato de potasio anhidro, y la concentración bajo presión reducida dio una película que comenzó a solidificar con el tiempo. La película se disolvió en etanol absoluto y se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo claro que solidificó con el tiempo. El material se sometió a alto vacío a temperatura ambiente para dar el compuesto del título como un sólido (21 mg) de color amarillo claro; punto de fusión: forma sólida se transforma desde 121-126 °C, se funde a 146-148 °C.



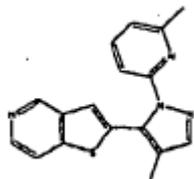
Ejemplo 6. 2-[3,4-dimetil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

Etapa i. 3,4-dimetil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol. A un matraz de fondo redondo de 250 mL se le adicionaron etil 2-metil acetoacetato (5.0 g, 35 mmol), 1-(6-metilpiridin-2-il)hidrazina (4.48 g, 36 mmol), y 12 mL de ácido acético. La mezcla se calentó a 80°C, durante 9 horas. Se adicionaron agua y EtOAc a la mezcla. Las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío (6.68 g).

Etapa ii. 3,4-dimetil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il trifluorometanosulfonato. Al matraz de fondo redondo de 500 mL con 3,4-dimetil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol (6.68 g, 33 mmol) se le adicionaron Et₃N (5.5 mL, 39 mmol) y 35 mL de CH₂Cl₂, la solución se enfrió en baño de acetona hielo seco. Se adicionó lentamente Tf₂O (6.1 mL, 36 mmol). La mezcla se agitó a -78°C y se dejó calentar a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó utilizando un Sistema Biotage Horizon (0 a 25% de EtOAc/hexano) para proporcionar un aceite incoloro (8.28 g).

Etapa iii: 2-[3,4-dimetil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il]tieno[3,2-c]piridina. En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL equipado con un condensador de reflujo se adicionaron 3,4-dimetil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il trifluorometanosulfonato (0.90 g, 2.7 mmol, 1.2 equivalentes), trihidrógeno fosfato del ácido tieno[3,2-c]piridin-2-ilborónico (0.72 g, 2.6 mmol, 1 equivalente), fosfato tribásico de potasio y 20 mL de dioxano. El matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. A este se le adicionó PdCl₂(dppf) (Corriente, aducto dicloro[1,1'- bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) diclorometano, 0.54 g, 0.65 mmol, 0.3 equivalentes). De nuevo, el matraz se evacuó bajo un vacío y la suspensión se burbujeó con gas nitrógeno. La reacción se calentó a 100 °C, durante 16 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente.

La reacción se filtró a través de Celite, aclarando bien con EtOAc hasta que todo el material deseado se eluyó (aproximadamente 400 mL). El filtrado de EtOAc se concentró a un residuo oscuro. El residuo oscuro se recolectó en CH₂Cl₂ y los sólidos se separaron por filtración. El CH₂Cl₂ se sometió a cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, 0-100% de heptano/EtOAc más de 800 mL a continuación, se sostiene a 100% de EtOAc. 500 mL). Las fracciones se concentraron en 3 porciones: la porción que contenía un aceite ligeramente coloreado (420 mg) parcialmente solidificado después de reposar durante la noche. El material se disolvió en EtOH caliente y se adicionó heptano. Al reposar durante la noche no apareció ningún sólido precipitado. El material se concentró a sequedad. Se adicionaron aproximadamente 15 mL de Et₂O y se filtró el material a través de un filtro de papel, dejando una cantidad menor de un residuo de color marrón claro. El residuo se concentró a sequedad y se adicionaron aproximadamente 1 mL de Et₂O. Luego se adicionaron aproximadamente 15 mL de heptano hasta que la mezcla se mantuvo nublada. Un precipitado no era evidente después de permanecer a 4 °C, durante aproximadamente 2 horas. El material se concentró después a sequedad para obtener un aceite de color marrón claro. Se adicionó heptano y se formaron pequeños círculos de sólidos, algunos eran de color blanco crema, otros fueron de color marrón. El heptano se decantó y el sólido se secó en un horno de vacío a 50 °C, durante aproximadamente 48 horas para proporcionar 229 mg de un sólido de color marrón claro. pf 108-109 °C.



Ejemplo 7. 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

Etapa i: trihidrógeno fosfato del ácido tieno[3,2-c]piridina 2-borónico. A una mezcla en agitación de tieno[3,2-c] piridina (2.0 g) en tetrahidrofurano anhidro (25 mL) a -40 °C se le adicionó una solución de *n*-butilitio 1.6 M en hexanos (10 mL) gota a gota, durante cinco minutos. La mezcla de reacción se agitó, durante diez minutos y borato de isopropilo (4.2 mL) se adicionó posteriormente. El baño frío se retiró y la mezcla se dejó agitar durante tres horas. Se adicionó ácido fosfórico (85 % de solución acuosa, 1.2 mL) a la mezcla en agitación. Posteriormente, se le adicionó agua (10 mL), lo que causó que se precipitara un sólido de color amarillo pálido instantáneamente. Se adicionó más agua (100 mL) y se adicionó éter dietílico (100 mL). La suspensión se filtró por vacío. Los sólidos se secaron por succión para proporcionar el compuesto del título como un polvo de color amarillo pálido (2.73 g); microanálisis de C₇H₆BNO₂S·H₃PO₄ %C(calc/encontrado) 30.35/31.41, %H 3.27/3.24. %N 5.06/5.04, %S 11.58/11.93, %P 11.18/8.58; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₅, CDCl₃, CD₃OD, mezcla D₂O) δ 9.01 (d, 1H, J=1.0 Hz), 8.26 (d, 1H, J=6.0 Hz), 7.94 (s, 1H), 7.91-7.83 (m, 1H); MS (APCI+) *m/z* 180 (MH+).

Etapa ii: 1-(6-metilpiridin-2-il)hidrazina. Una mezcla de 2-bromo-6-metil-piridina (602.10g) e hidrato de hidrazina (1570 mL) se calentó a reflujo a 120°C, durante 6 horas, y luego se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas. El sólido separado se extrajo con éter dietílico (3 x 1.5L) y los extractos de éter combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron (-430g). El residuo se agitó en una mezcla de éter (200ml) y hexano (1.5L), se filtraron y lavaron con 5% de éter dietílico en hexano para dar un sólido de color amarillo pálido (pegajoso). El sólido se destiló con vacío a 106-113°C/2mm, que se solidificó instantáneamente. El sólido luego se disolvió en 2L de éter dietílico y se precipitó por la adición de 2L de hexano, se filtró y se secó al vacío para dar la 1-(6-metilpiridin-2-il)hidrazina como sólido de color blanco (240 g).

Alternativamente, la 1- (6-metil-piridin-2-il) -hidrazina también se sintetizó de la siguiente manera:

Un matraz de reacción con chaqueta estaba equipado con agitador mecánico, entrada de nitrógeno y condensador de reflujo y la chaqueta se enfrió a 10 °C. El reactor fue programado para enfriar automáticamente a 0 °C si en algún momento la temperatura interna supera los 80 °C. El reactor se purgó con una corriente constante de gas nitrógeno. El reactor se cargó con 25 g (0.225 mol) de 2-fluoro-6-metilpiridina, seguido de 100 mL de isopropanol y la temperatura de la chaqueta se ajustó a 73 °C (correspondiente a una temperatura interna de 70 °C). El reactor se cargó con 44 g (0.90 mol) de hidrazina acuosa al 65% y la mezcla se agitó durante la noche con la chaqueta fijado a 70 °C. Los contenidos del reactor se diluyeron con 125 mL de metil-t-butil éter (MTBE) y 13 mL de salmuera saturada para dar dos capas que se separaron. La capa acuosa se extrajo con 2x60 mL de MTBE. Las capas orgánicas combinadas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio (anhidro). El agente de secado se retiró por filtración y el filtrado orgánico se concentró por evaporación rotatoria. El aceite resultante solidificó al dejarlo en reposo para dar el producto deseado (21.1 g) como un sólido de color blanco.

Etapa iii: 4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-ol. A una mezcla en agitación de metóxido de sodio (13.6 g) en tetrahidrofurano anhidro (50 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente en un recipiente de reacción de tres bocas de 500 mL secados al horno se le adicionó formiato de metil anhidro (12.6 mL). La mezcla se espumó y a la suspensión se le adicionó formiato de etilo (28.7 mL) con una corriente lenta, constante mediante una jeringa mientras se agita el recipiente de reacción con la mano para facilitar una mezcla más eficiente de la suspensión. La mezcla posterior se agitó a temperatura ambiente durante cinco horas. Se adicionó ácido acético glacial (14 mL) mientras que el recipiente de reacción se agitó vigorosamente a mano durante varios minutos para facilitar la mezcla más eficiente. La posterior suspensión se agitó durante la noche y se filtró a través de Celite. El tapón de filtro de Celite se lavó dos veces con éter dietílico (2 x 200 mL) y se filtró con succión. El filtrado produjo un precipitado sólido de color blanco escaso que se eliminó por una filtración al vacío adicional a través de un embudo fritado medio Büchner. El filtrado posterior se concentró bajo presión reducida (temperatura del baño de agua = 45 °C) para dar un aceite claro, ligeramente coloreado (aproximadamente 15 g). El aceite poseía el olor distintivo del ácido acético. El aceite se disolvió en etanol absoluto (50 mL). A esta solución se le adicionó (6-metil-piridin-2-il) -hidrazina sólido (5,4 g). La mezcla en agitación se llevó a reflujo suave bajo una atmósfera de nitrógeno durante cuatro días. La mezcla se concentró a presión reducida y el aceite de color naranja suministrado se disolvió en diclorometano (50 mL). La solución de diclorometano se aplicó a un cartucho instantáneo de sílica Analogix de 400-g en un instrumento Biotage. La elución en el instrumento Biotage con un gradiente (100% de heptano a 70% acetato de etilo en heptano durante cuatro volúmenes de columna, o 2400 mL). Las fracciones se secaron para proporcionar un sólido (7.1 g).

Alternativamente, 4-metil-2- (6-metil-piridin-2-il) -2H-pirazol-3-ol también fue producido de la siguiente manera:

A una solución de formiato de etilo (117.5g) y propionato de etilo (54.0g) en 40 mL de tetrahidrofurano (THF) se le adicionó, gota a gota, t-butóxido de potasio (502 mL de una solución 1.0 molar en THF) a temperatura ambiente durante aproximadamente 0.5 horas. Un precipitado de color blanco se comenzó a formar junto con algo de burbujeo. Después de otras 7.5 horas la reacción se filtró, el sólido se lavó con éter dietílico y después se secó a vacío a 40 °C, durante 16 horas para dar potasio 2- etoxicarbonil-propen-1-olato como un polvo de color gris (23.5g). A una solución de esta sal de potasio (17.6 g) en 450 mL de 1- propanol se le adicionó (6-metil-piridin-2-il) -hidrazina (11.7 g) seguido de ácido acético (6.5 mL). Después de agitar durante 10 minutos la mezcla se calentó a reflujo suave durante 5 horas. Se adicionó más ácido acético (5.5 mL) y se continuó el reflujo durante otras 16 horas.

El solvente se eliminó a vacío. El residuo resultante se diluyó con acetato de etilo (350 mL) y la solución se lavó cuidadosamente con solución saturada de bicarbonato de sodio (200 mL) hasta que el ácido acético restante se neutralizó. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL). Las fases orgánicas se combinaron y a continuación se lavaron con agua (100 mL), después con salmuera (100 mL) y se secaron sobre sulfato de magnesio. El agente de secado se retiró por filtración y el solvente se eliminó a vacío para dar el producto como un sólido de color naranja (16.26g).

Etapa iv: 4-metil-246-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico. A una mezcla en agitación de una solución en diclorometano de 4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-ol (13.39 g en 50 mL de diclorometano) y trietilamina (11 mL) en diclorometano adicional (50 mL más, 100 mL de diclorometano total) a -78 °C bajo una atmósfera de nitrógeno se adicionó anhídrido trifílico (13.3 mL) con una corriente lenta, constante a través de una jeringa durante cinco minutos. El baño frío se retiró y la mezcla se dejó calentar gradualmente durante una hora, treinta minutos a temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el concentrado se purificó por cromatografía instantánea en sílica. La elución con un gradiente (100 % de heptano a 30 % de acetato de etilo en heptano durante tres volúmenes de columna, o 1800 mL, luego 30 % a 45 % de acetato de etilo durante dos volúmenes de columna adicionales, o 1200 mL) a través de un cartucho instantáneo de sílica Analogix de 400 g en el instrumento Biotage proporcionó el compuesto del título como un aceite incoloro claro (18.04 g). ¹H-RMN (400 MHz. CDCl₃) δ 7.68 (m, 1H), 7.59 (d, J=8.0 Hz, 1H). 7.50 (s, 1H), 7.07 (d, J=7.4 Hz, 1H), 2.56 (s, 3H), 207 (s, 3H); ¹⁹F-RMN (376 MHz. CDCl₃) δ -74.12 (s, 3F); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 157.9. 151.1. 141.3, 139.5, 139.0, 122.0, 118.6 (cuarteto, JC-F=321.0 Hz), 111.9, 108.7, 23.6, 7.3; MS (APCI*) m/z 322.

Etapa v: 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina. Un matraz de fondo redondo de tres bocas secado en horno equipado con condensador de reflujo y válvula de entrada de gas se cargó con ácido tieno[3,2-c]piridina-2-borónico trihidrógeno fosfato (1.0 g), 4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico (1.16 g), fosfato tribásico de potasio (2.3 g), 1,4-dioxano (30 mL), aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] paladio (II) diclorometano (0.60 g), y 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (0.40 g) y la mezcla agitada se llevó a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (250 mL) y la solución se trató con carbón activado y se filtraron a través de Celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el concentrado se purificó por cromatografía de sílica gel. La elución a través de un cartucho instantáneo de sílica RediSep de 120 g en un Sistema Biotage con 100 % de heptano a 100 % de acetato de etilo sobre 1800 mL seguido de 100 % de acetato de etilo hasta que el material, con la masa deseada eluya proporciona un aceite (1.2 g); MS (APCI+) m/z 307 (MH+). El producto se purificó adicionalmente disolviendo en acetonitrilo (30 mL) y dividiendo en dos porciones iguales. Después de la filtración, las soluciones se purificaron secuencialmente por HPLC preparativa (Sistema Waters de HPLC preparativa: Fase estacionaria: Waters DeltPak C18 5 µm. 100 Angstrom, 300x50 mm I.D., P/N 011801, WAT 011801, No. 330C09125W; Fase móvil 90:10 a 50:50 agua-acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 % durante 30 minutos). Las fracciones combinadas se concentraron bajo presión reducida a una solución acuosa, eliminando el acetonitrilo. La solución acuosa clara se trató con carbonato de potasio acuoso saturado para dar una suspensión turbia de color blanco. La suspensión se dejó en reposo a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado sólido de color blanco que se había formado se recolectó mediante filtración por vacío y se secó en el horno de vacío (77 °C) durante la noche para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (0.506 g). Punto de fusión 157-158 °C.

Los datos analíticos de ¹H RMN y espectrometría de masas, para los Ejemplos 1-7 se presentan a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1

Ejemplo	¹ H RMN	MS
1	¹ H RMN (400 MHz, d ₆ -DMSO) δ 9.06 (d, J = 0.975 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 5.5 Hz, 1H). 7.98 (m, 1H), 7.91 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 3.29 (s, 3H)	MS (APCI) m/z 293.1 (M+H)+

Ejemplo	¹ H RMN	MS
2	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 9.08 (s, 1H), 8.40 (d, <i>J</i> =5.5 Hz, 1H), 8.01 (dd, <i>J</i> =0.78, 5.7 Hz, 1H), 7.89 (t, <i>J</i> =7.9 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.31 (s, 3H)	MS (APCI, M+1) 307.3
3	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 9.07 (s, 1H), 8.40 (d, <i>J</i> =5.7 Hz, 1H), 8.00 (dd, <i>J</i> =0.78, 5.7 Hz, 1H), 7.89 (t, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 2.68 (q, <i>J</i> =7.5 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.27 (t, <i>J</i> =7.6 Hz, 3H)	MS (APCI) <i>m/z</i> 321.2 (M+H)+
4	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 9.12 (s, 1H), 8.42 (dd, <i>J</i> =5.6, 1.3 Hz, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> =5.5 Hz, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 7.19 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 2.53 (q, bajo pico de DMSO, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.17 (t, <i>J</i> =7.4 Hz, 3H) MS (APCI) <i>m/z</i>	321.2 (M+H)+
5	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8.99 (s, 1H), 8.41 (d, 1H, <i>J</i> =5.5 Hz), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.36 (d, 1H, <i>J</i> =8.0 Hz), 7.27 (d, 1H, <i>J</i> =0.5 Hz), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> =7.6 Hz), 2.89-2.83 (m, 4H), 2.56-2.49 (m, 2H), 2.47 (s, 3H);	MS (APCI+) <i>m/z</i> 333 (MH+).
6	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 9.11 (s, 1H), 8.41 (d, <i>J</i> =5.5 Hz, 1H), 8.01 (d, <i>J</i> =5.5 Hz, 1H), 7.79 (t, <i>J</i> =7.7 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.46 (d, <i>J</i> =8.2 Hz, 1H), 7.14 (d, <i>J</i> =7.4 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)	MS (APCI) <i>m/z</i> 321.2 (M+H)+
7	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 9.06 (s, 1H), 8.44 (d, <i>J</i> =5.7 Hz, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> =5.7 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.37 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.04 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.18 (s, 3H)	(APCI+) <i>m/z</i> 307 (M+H)+

Ejemplo 8. 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina.

Etapa 1. 2-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

- 5 Una solución de tieno[3,2-c]piridina (5.0 g) en 100 mL de THF bajo una atmósfera de N₂ se enfrió a -78 °C (acetona/hielo seco). *n*-butillitio (28 mL, 1.6M en hexanos, botella recién abierta) se adicionó gota a gota durante veinte minutos, mientras se mantenía la temperatura interna a o por debajo de -64 °C. La mezcla se agitó, durante una hora a -78 °C y se adicionó posteriormente borato de isopropilo (botella recién abierta, 10.2 mL). El baño frío se retiró, permitiendo que la mezcla se caliente a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por una hora. Una mezcla de pinacol (5.9 g) en éter dietílico (20 mL) se adicionó a la mezcla de reacción. Después de veinte minutos, se adicionó ácido acético glacial (2.2 mL) y se formó un precipitado en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, aclarando con cloroformo hasta que el material activo UV se eluyó (aproximadamente 2500 mL). El filtrado se extrajo dos veces con solución acuosa de hidróxido de sodio al 5% (aproximadamente 500 mL en total). La fase acuosa básica se puso a temperatura ambiente durante la noche. La capa acuosa se enfrió en un baño de hielo seco/CH₃CN y se neutralizó con ácido clorhídrico acuoso al 10 % mientras se mantenía la temperatura interna a o por debajo de 5 °C. La solución acuosa neutralizada se extrajo en cloroformo diez veces. Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron bajo presión reducida para obtener un sólido. Este producto se combinó con los productos de tres otras reacciones realizadas en la misma escala de una manera similar para proporcionar un sólido combinado (23.52 g). El sólido combinado se disolvió en aproximadamente 1 L de etanol en ebullición. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de aproximadamente cuatro horas a temperatura ambiente, la solución se almacenó a 4 °C, durante la noche. Un material de color marrón claro precipitado a partir de solución. El líquido se separó por decantación a través de un filtro. El sólido se secó en un horno de vacío (50 °C), durante una hora para proporcionar el compuesto del título (14.02 g) como un sólido de color marrón claro; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃ con una gota de D₂O para disolver completamente) δ 1.39 (12 H, s), 7.89 (1 H, d, *J*=5.3 Hz), 7.97 (1 H, s), 8.45 (1 H, d, *J*=4.5 Hz), 9.18 (1 H, s); MS (APCI+) *m/z* 262.

Alternativamente, 2-(4,4,5,5-Tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-tieno[3,2-c]piridina también se produjo de la siguiente manera:

- 30 A una solución a -70 °C de tieno[3,2-c]piridina (21.6g) en 400 mL de tetrahidrofurano seco bajo gas nitrógeno se adicionó *n*-butil litio (99.9 mL de una solución 1.6 molar en hexanos) durante aproximadamente 15-20 minutos manteniendo la temperatura por debajo de -65 °C. La solución se convirtió marrón oscuro y turbio. Después de 45 minutos se adicionó borato de isopropilo (33.06g) y la mezcla se convirtió homogénea. La mezcla se agitó a -70 a -75 °C, durante 2 horas. La mezcla se dejó calentar a -30 °C, luego una solución de pinacol en 100 mL de éter dietílico se

5 adición durante 4 minutos. La mezcla de reacción se convirtió en una solución homogénea de color naranja. La temperatura se dejó calentar a 5 °C y se mantuvo a esta temperatura, durante 1 hora. La mezcla de reacción se neutralizó (pH 7) muy lentamente con 40 mL de ácido clorhídrico 4 M en 1,4-dioxano, manteniendo la temperatura por debajo de 10 °C. Se formó un precipitado. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y luego el sólido se recolectó por filtración. El sólido se secó bajo vacío a 40 °C, durante 16 horas. El sólido seco (36 g) se agitó con 400 mL de agua durante 1.5 horas. La suspensión se filtró y el sólido se recolectó. El sólido se secó bajo un flujo de aire durante 60 horas para dar el producto deseado (34.5g). ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ ppm 1.21 (s, 12 H) 7.66 - 7.70 (m, 1 H) 7.80 (d, *J*=0.78 Hz, 1 H) 8.28 (d, *J*=5.65 Hz, 1 H) 8.98 (d, *J*=0.97 Hz, 1 H).

10 Etapa ii: 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-*c*]piridina. Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 mL secado al horno equipado con condensador de reflujo y válvula de entrada de gas se cargó con 2-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-tieno[3,2-*c*]piridina (11.56 g), 5-etil-2-(6-metilpiridin- 2-il)-2H-pirazol-3-il éster del ácido trifluorometanosulfónico (16.4 g), fosfato tribásico de potasio (28 g), y 1,4-dioxano (300 mL). El recipiente de reacción se evacuó y se purgó con gas nitrógeno. La desgasificación y purga de nitrógeno se repitió dos veces. A la mezcla se le adicionaron aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) diclorometano (7.3 g), y 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (5.0 g) y la mezcla agitada se desgasificó y se purgó con gas nitrógeno tres veces más, y posteriormente se llevó gradualmente a reflujo suave durante un periodo de treinta minutos. La mezcla se agitó a reflujo bajo nitrógeno durante 2.5 horas, y se adicionaron posteriormente fluoruro de potasio (13 g) y agua (1.2 mL). La mezcla de agitación continuó a reflujo durante quince minutos y posteriormente se enfrió ligeramente y se filtró a través de Celite. La almohadilla de filtro se lavó con acetato de etilo (1 L) y el filtrado se trató con carbón activado. La suspensión de carbono se filtró a través de Celite. Esta almohadilla de filtro se lavó con acetato de etilo adicional (300 mL), y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo en bruto, aceitoso de color marrón rojizo (aproximadamente 35 g). El residuo se trató con varios mililitros de etanol absoluto y se concentró bajo presión reducida. El residuo se mezcló con sílica gel instantánea (100 g) y una solución de metanol al 5% en acetato de etilo (200 mL). La mezcla se filtró y la sílica se lavó dos veces con 200 mL de metanol al 5% fresco en solución de acetato de etilo. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo oleoso de color marrón rojizo (aproximadamente 25 g). El residuo se disolvió en varios mililitros de etanol. Se formó un precipitado posteriormente al ponerse de reposo, y se recolectó mediante filtración por vacío. Los sólidos se lavaron con heptano para producir un polvo de color rojo-naranja, pegajoso (4.6 g). El filtrado de etanol-heptano dio un precipitado que se recolectó mediante filtración por vacío para dar un sólido de color beige (4.3 g). El sólido de color beige se disolvió en etanol absoluto sobre vapor. El enfriamiento gradual de la solución clara produjo un precipitado que se recolectó mediante filtración por vacío. El secado por succión proporcionó un sólido (2.25 g). El sólido se hirvió en y se precipitó a partir de etanol absoluto (15 mL) para dar un sólido de color blanco (1.62 g). El sólido se hirvió en y se precipitó de nuevo a partir de etanol para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (1.20 g). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9.12 (s, 1H), 8.46 (d, *J*=5.9 Hz, 1H), 7.94 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 7.68-7.64 (m, 2H), 7.48-7.43 (m, 2H), 7.04 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.19 (s, 3H); MS (APCI+) *m/z* 307.

Ejemplo 9. 2- (4-metil-2- (6-metil-piridin-2-il) -2H-pirazol-3-il) tieno [3,2, c] piridina. (Ejemplo de referencia)

Etapa I: 2-metil-6-(4-metil-pirazol-1-il)-piridina.

Condición de reacción 1

40 A una solución de 4-metil-pirazol (1.0 g) en 50 mL de acetonitrilo anhidro se le adicionó carbonato de cesio (5.9 g), seguido de 2-flouro-6-metilpiridina (1.5 g). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró para eliminar las sales de cesio y luego el filtrado se evaporó para dar un aceite en bruto. La purificación por cromatografía instantánea (sílica gel, 20% acetato de etilo en heptano) proporcionó, después del secado, 1.32 g del compuesto del título como un aceite de color amarillo. ¹H-RMN (400 MHz: DMSO-*d*6) δ 6.34 (s, 1H), 7.80 (t, 1H), 7.63 (d, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.13 (d, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.08 (s, 3H); MS (APCI+) *m/z* 174 (MH+).

45 Condición de reacción 2

La reacción realizada en la etapa i para la reacción 1 se llevó a cabo de una manera similar a gran escala, iniciando con 4-metil-pirazol (5.0 g). Se produjeron 5.92 g del compuesto del título.

Condición de reacción 3

50 Alternativamente: iniciando con 4-metil-pirazol (1.0 g) en acetonitrilo utilizando 1.1 eq de t-butóxido de potasio como base, se produjeron 1.75 g del compuesto del título.

Condición de reacción 4

Alternativamente: iniciando con 4-metil-pirazol (1.0 g) en THF utilizando 1.1 eq de t-butóxido de potasio como base, se produjeron 0.238 g del compuesto del título.

Condición de reacción 5

Además, el compuesto del título de la etapa i se preparó de la siguiente manera: A una suspensión de hidruro de sodio al 60% (8.04 g) en DMF anhidro (40 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno se le adicionó gota a gota una solución de 4-metil-pirazol (15 g) en 30 mL de DMF en un baño de hielo durante un período de 40 minutos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 horas y después se adicionó gota a gota 2-fluoro-6-metilpiridina (22.33 g). La mezcla se agitó a 80 °C, durante 3 horas y se enfrió. La mezcla de reacción se vertió en agua congelada y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se concentró a vacío para dar un residuo, que se purificó por cromatografía (2% -10% de acetato de etilo en heptanos) para dar 29.9 g del compuesto del título como un aceite incoloro.

Etapa II: 2-(5-bromo-4-metilpirazol-1-il)-6-metilpiridina. A una solución fría (-60 °C) de 2-metil-6- (4- metil-pirazol-1-il) piridina (0.52 g,) (preparado mediante la condición de reacción 1 en la etapa i) en 14 mL de THF anhidro se le adicionaron 1.33 mL de una solución de n-butilitio 2.5M (0.21 g) en hexanos. La mezcla de reacción se agitó a -60 °C, durante una hora. Se adicionaron 10 mL de una solución de N-bromosuccinimida (0.59 g) en THF y luego la solución final se agitó a -60 °C, durante 2 horas. Se adicionó cloruro de amonio saturado (20 mL) y después la mezcla de reacción se dejó calentar a 24 °C. La mezcla de reacción se diluyó con 300 mL de acetato de etilo y después la fase acuosa se separó. La fase orgánica se lavó con cloruro de amonio saturado adicional (50 mL) y después con salmuera (50 mL). La capa orgánica se separó, se secó (sulfato de sodio), se filtró y después el filtrado se evaporó para dar un aceite de color rojo en bruto. La purificación por cromatografía instantánea (sílica gel, 20% de acetato de etilo en heptano) proporcionó, después de secar, 0.377 g del compuesto del título como un aceite de color amarillo; ¹H-RMN (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 7.88 (t, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.02 (s, 3H); MS (APCI+) *m/z* 254 (MH⁺).

Condiciones de reacción alternativas: El compuesto de la etapa ii, 2- (5-bromo-etilpirazol-1-il) -6-metilpiridina, también se preparó de la siguiente manera.

1.) Utilizando condiciones de reacción similares a las descritas anteriormente, 2- (5-bromo-4-metilpirazol-1-il) -6-metilpiridina, se preparó iniciando con 2-metil-6- (4-metil-pirazol-1- il) piridina (1.0 g) para proporcionar el compuesto del título (829 mg).

2.) Utilizando condiciones de reacción similares a las descritas anteriormente, 2- (5-bromo-4-metilpirazol-1-il) -6-metilpiridina, se preparó iniciando con 2-metil-6- (4-metil-pirazol-1- il) piridina (5.0 g) para proporcionar el compuesto del título (2.64 g).

3.) Utilizando condiciones de reacción similares a las descritas anteriormente, 2- (5-bromo-4-metilpirazol-1-il) -6-metilpiridina, se preparó iniciando con 2-metil-6- (4-metil-pirazol-1- il) piridina (1.0 g) para proporcionar el compuesto del título. Además, se utilizó 1,2-dibromotetrafluoroetano (1.5 equivalentes) en lugar de N-bromosuccinimida (NBS) como el agente de bromación (756mg).

Etapa iii: 2-[4-metil-2-(8-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina. A una solución de 2- (5- bromo-4-metilpirazol-1-il) -6-metilpiridina (2.0 g) en 20 mL de 1,2-dimetoxietano anhidro (DME) se le adicionó dicloruro de bistrifenilfosfina de paladio (0.153 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se adicionaron 20 mL de agua, seguido de bicarbonato de sodio (2.0 g) y se adicionó 5- etil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il éster ácido trifluoro-metanosulfónico (3.1 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 18 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con 400 mL de éter dietílico y después la fase orgánica se lavó con agua (100 mL), bicarbonato de sodio saturado (2 x 100 mL), y salmuera (100 mL). La capa orgánica se secó (sulfato de magnesio), se filtró, y luego el filtrado se evaporó para dar una suspensión de color amarillo. La mezcla se diluyó con 25 mL de acetato de etilo. El material no todo fue a la solución. La mezcla se trituró durante 15 minutos y luego se filtró (primera filtración) para eliminar un sólido amarillo, que se aclaró con acetato de etilo (2 x 10 mL). El sólido se secó al aire durante 15 minutos para proporcionar 448 mg de producto ligeramente impuro. El filtrado desde la primera filtración anterior se evaporó sobre 6 g de sílica gel y se sometió a cromatografía instantánea (sílica gel, 80% de acetato de etilo en heptano, acetato de etilo, seguido de 95% acetato de etilo en metanol) para dar 0.565 g. El peso combinado del compuesto del título fue 1.01 g como un sólido de color amarillo. La precipitación a partir de etanol dio el compuesto del título (0.764 g) como un sólido de color amarillo; punto de fusión 155-156 °C; MS (APCI+) *m/z* 307 (MH⁺).

50 Ejemplo 10. 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina. (Ejemplo de referencia)

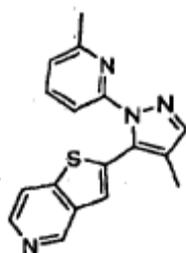
Etapa i: 4-Bromo-piridina. El clorhidrato de 4-bromopiridina (20.0 g, 102.9 mmol) se sometió a repartición entre EtOAc y NaHCO₃ al 5%. Las capas se separaron, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, y se evaporaron a presión reducida en un baño de 40 °C para proporcionar 13.7 g (84%) de un aceite volátil que se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

Etapa ii: 4-Bromo-piridina-3-carbaldehído. Una suspensión de 4-bromopiridina (13.7 g, 86.8 mmol) en 300 mL de THF se purgó con N₂ y se enfrió a -78 °C bajo una atmósfera de N₂ seco. Se adicionó una solución de diisopropilamida de litio

(solución 2.0 M en heptano/THF/etilbenceno, 43.4 mL, 86.8 mmol), durante aproximadamente 3 minutos. Después de 30 minutos, se adicionó DMF (dimetilformamida). La mezcla de reacción se mantuvo a -78 °C, durante 3 horas antes de permitir que se caliente a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl saturado y se concentró bajo presión reducida para eliminar la mayor parte del THF. La mezcla acuosa se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se evaporaron y se sometieron a cromatografía (columna de sílica gel Analogix de 150 g, eluyendo con un gradiente de 100% de heptano a 30 % de EtOAc/heptano más de 45 minutos). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para dar 2.20 g (13.6%) del compuesto del título. MS *m/z* 186 (M + H)⁺.

Etapa III: 1-tieno [3,2-c] piridin-2-il-propan-1-ona. A una solución de hidrato de hidrosulfuro de sodio (1.31 g, 17.7 mmol) en 5 mL de agua, se le adicionó DMF (30 mL) y K₂CO₃ (3.27 g, 23.7 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de hielo antes de la adición de 1-bromo-2-butanona (2.68 g, 17.7 mmol). Después de 15 minutos, se adicionó una solución de 4-bromopiridina-3- carbaldehído (2.20 g, 11.8 mmol) en DMF (20 mL) La mezcla de reacción se agitó a 45 °C, durante 2.5 días. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, y se evaporaron para dar el producto bruto (1.80 g, 80%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. MS *m/z* 192 (M + H)⁺.

Etapa iv: 3-Dimetilamino-2-metil-1-tieno[3,2-c]piridin-2-il-propenona. Una solución de 1-tieno[3,2-c]piridin- 2-il-propan-1-ona (1.80 g, 9.41 mmol) y dimetoximetil-dimetil-amina (5.32 mL, 37.8 mmol) en DMF (20 mL) se purgó con N₂ y se calentó a 80 °C, durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua/salmuera 1: 1 y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con agua/salmuera 1:1 y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, y se evaporaron para dar 2.1 g de material bruto. El residuo se disolvió repetidamente en tolueno y se evaporó hasta que se obtuvo un residuo de peso constante. MS *m/z* 247 (M + H)⁺.



Etapa v: 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina. Una solución de 3- dimetilamino-2-metil-1-tieno[3,2-c]piridin-2-il-propenona (1.31 g, 5.32 mmol) en ácido acético (20 mL) se calentó a 90°C. Una solución de (6-metil-piridin-2-il)-hidrazina en ácido acético (8 mL) se calentó a 90°C antes de adicionar a la solución 3- dimetilamino-2-metil-1-tieno[3,2-c]piridin-2-il-propenona. La mezcla se calentó a 95°C, durante 15 minutos antes de retirar del calor y la agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. El solvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se evaporó dos veces a partir de tolueno. El residuo así obtenido se sometió a cromatografía (columna Analogix de 110 g de sílica gel eluyendo con 100% de CH₃CN) para proporcionar 0.45 g (28%) de un aceite de color naranja.

Un segundo método de preparación del compuesto de la etapa iii del Ejemplo 10, (1-tieno[3,2-c]piridin-2-il-propan-1-ona) también se llevó a cabo de la siguiente manera:

Etapa i. 4-Bromo-piridina-3-carbaldehído. Una suspensión de clorhidrato de 4-bromopiridina (5.0 g, 25.7 mmol) en THF (100 mL) se purgó con N₂ y se enfrió a -78°C. Una solución de diisopropilamida de litio (solución 2.0 M en heptano/THF/etilbenceno, 27.0 mL, 54.0 mmol) se adicionó durante 3 minutos. Después de 30 minutos, se adicionó DMF (8.56 mL, 110.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C, durante 15 minutos antes de calentar rápidamente a temperatura ambiente en un baño de agua. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente, durante 18 horas. La reacción se inactivó con NH₄Cl saturado (100 mL) y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se evaporaron y se sometieron a cromatografía (columna Analogix de 150 g de sílica gel eluyendo con un gradiente de 100% de heptano 50% de EtOAc/heptano más de 1 hora) para dar 1.50 g (31%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo claro. MS *m/z* 186 (M + H)⁺.

Etapa ii. éster metílico del ácido tieno [3,2-c] piridina-2-carboxílico. A una solución de 4-bromo-piridina-3-carbaldehído (1.50 g, 8.06 mmol) en DMF (10 mL) y agua (1 mL), se le adicionó K₂CO₃ (1.34 g, 9.68 mmol) y tioglicolato de metilo (0.87 mL, 9.68 mmol). La mezcla se calentó a 45 °C, durante 18 horas. La mezcla de reacción se retiró del baño de calentamiento y se diluyó con agua (50 mL). Después de 1 hora, el sólido esponjoso que se formó se filtró y se lavó con agua. El material así obtenido se secó en un horno de vacío a 60 °C, hasta un peso constante de 0.92 g (59%). MS *m/z* 194 (M + H)⁺.

Etapa iii). metoxi-metilamida del ácido tieno[3,2-c]piridina-2-carboxílico. Una suspensión de O,N-dimetilhidroxilamina clorhidrato (2.32 g, 23.8 mmol) en THF (20 mL) se purgó con N₂ y se enfrió a -78°C antes de adicionar n-butillitio (1.6 M

5 en hexanos, 30.0 mL, 48.1 mmol). Se retiró el baño y se agitó 15 minutos antes de sustituir el baño y la adición de una solución de éster metílico del ácido tieno[3,2-c]piridina-2-carboxílico (0.92 g, 4.76 mmol) en THF (10 mL). Después de 45 minutos, se adicionó NH₄Cl saturado. La mezcla se diluyó con EtOAc; se lavó con agua, HCl 1 M, agua, NaHCO₃ al 5%, agua, y salmuera; se secó sobre Na₂SO₄, y se evaporó para dar 0.54 g (51%) de un aceite que solidificó al reposar. El producto así obtenido se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. MS *m/z* 223 (M + H)⁺.

Etapa iv. 1-Tieno[3,2-c]piridin-2-il-propan-1-ona. La metoximetilamida del ácido tieno[3,2-c]piridina-2-carboxílico (0.54 g, 2.43 mmol) se disolvió en THF (10 mL), purgado con N₂, y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se adicionó bromuro de etil magnesio (3 M en éter, 2.43 mL, 7.29 mmol) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción no se purificó adicionalmente. MS *m/z* 192 (M + H)⁺.

10 Un tercer segundo método de preparación del compuesto de la etapa iii del Ejemplo 10, (1-tieno[3,2-c]piridin-2-il-propan-1-ona) también se llevó a cabo de la siguiente manera:

15 Etapa i: *N*-metoxi-*N*-metil-propionamida. A una mezcla en agitación de *O,N*-dimetil-hidroxi-*l*amina clorhidrato (11.1 g) y cloruro de propionilo (9.4 mL) en diclorometano (300 mL) a 0 °C, bajo una atmósfera de nitrógeno, se le adicionó piridina (18.2 mL). El baño frío se retiró y la mezcla se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente, temperatura a la cual se agitó durante el fin de semana. Un precipitado blanco se había formado en la mezcla de agitación. La mezcla se trató con ácido clorhídrico acuoso al 10% y se agitó hasta que el precipitado se había disuelto en la solución bifásica. Las capas se separaron y la fase de diclorometano se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 mL) y solución de salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro transparente (12.05 g): ¹H-RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 3.62 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 2.38 (cuarteto, J=7.6 Hz, 2H), 1.07 (t, J=7.6 Hz, 3H); ¹³C-RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 175.5, 61.3, 325, 25.4, 8.9; MS (APCI+) *m/z* 118 (MH⁺).

25 Etapa ii: 1-tieno[3,2-c]piridin-2-il-propan-1-ona. A una mezcla en agitación de tieno [3,2-c] piridina (1.0 g) en tetrahidrofurano anhidro (50 mL) a -40 °C (baño de hielo seco-acetonitrilo) se le adicionó una solución de *n*-butillitio (1.6 M, 4.7 mL) en hexanos. La mezcla se enfrió a -78 °C seguido de la posterior adición de una solución de *N*-metoxi-*N*-metil-propionamida (0.97 g) en tetrahidrofurano anhidro (10 mL). El baño frío se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante la noche (14 horas). La mezcla se trató con cloruro de amonio acuoso saturado (150 mL). Después, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (500 mL), y el extracto se lavó con solución de salmuera (100 mL). La fase orgánica se secó sobre carbonato de potasio anhidro y se concentró bajo presión reducida, se reconstituyó en cloroformo, y se concentró de nuevo a presión reducida para proporcionar el semisólido de color naranja-marrón (1.17 g). El semisólido se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica utilizando una columna Analogix de sílica (115 g de sílica), eluyendo con 0-30% de acetato de etilo/heptano, a continuación, 30-60% del acetato de etilo/heptano. La concentración de las fracciones que contienen el producto proporcionó 0.49 g del producto. El material inicial (0.45 g) también se aisló por evaporación de las fracciones apropiadas.

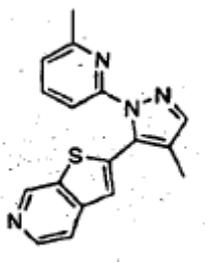
35 **Ejemplo 11. 2-[4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina (Ejemplo de referencia).** Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 mL equipado con un condensador de reflujo y válvula de entrada de gas se cargó con 2- (4,4,5,5- tetrametil [1,3,2] dioxaborolan-2-il) tieno [3, 2-c] piridina (10 g), 4-metil-2-(6-metilpiridin- 2-il)-2H-pirazol-3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico (14 g), fosfato tribásico de potasio (24 g), y 1,4-dioxano (200 mL). El recipiente de reacción se evacuó y se purgó con gas nitrógeno. La desgasificación y purga de nitrógeno se repitió dos veces. A la mezcla se le adicionaron dicloro [1,1'-bis (difenilfosfino) ferrocenopaladio (II) diclorometano (3.2 g), 1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno (2.2 g), fluoruro de potasio (11 g), y agua (1 mL) y la mezcla en agitación se desgasificó y se purgó con gas nitrógeno tres veces más, y posteriormente se llevó gradualmente a 80 °C, durante un período de veinte minutos. La mezcla se agitó a 80 °C, durante diez minutos y posteriormente se enfrió gradualmente a temperatura ambiente tal como estaba durante la noche. La mezcla se filtró por vacío a través de Celite y se lavó a través del tapón de filtro con dos porciones de acetato de etilo (800 mL y 600 mL). Los filtrados se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo oscuro. El residuo se disolvió en diclorometano (200 mL). Un sólido precipitó y se separó mediante filtración por vacío. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido de color naranja-marrón (20 g). El sólido se trató con acetonitrilo (200 mL) a temperatura ambiente y la suspensión resultante se agitó y se filtró por vacío para dar un sólido de color amarillo (9.1 g). Este segundo sólido se disolvió en acetonitrilo hirviendo sobre un baño de vapor de agua (volumen de la solución caliente 75 mL) y la solución naranja se dejó enfriar a temperatura ambiente durante treinta minutos. Un sólido se precipitó, y el matraz se selló y se almacenó a 4 °C, durante la noche. El precipitado se filtró por vacío y se secó por succión para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco crema (4.80 g). Este sólido se combinó con lotes de sólido aislado de una manera similar a partir de otros experimentos (21.5 g de masa total) para dar un sólido combinado.

55 El sólido combinado se combinó además con el sólido (8.92 g) obtenido a partir del siguiente experimento:

Las soluciones de 3-dimetilamino-2-metil-1-tieno [3,2-c] piridin-2-il-propenona (31,35 g) en ácido acético glacial (500 mL) y (6-metil-piridin 2-il) -hidrazina (15.67 g) en ácido acético glacial (200 mL) se purgaron con nitrógeno seco y se calentaron a 90 °C bajo gas nitrógeno. Las dos mezclas se combinaron y se calentaron a 95 °C, durante 15 minutos. Se

5 interrumpió el calentamiento y la mezcla de reacción se dejó enfriar y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción en bruto se concentró hasta aproximadamente 100 g de un aceite oscuro bajo presión reducida. El residuo se disolvió en tolueno y se evaporó a aproximadamente 70 g. Un fuerte olor a ácido acético fue evidente, por lo que el evaporado se disolvió en tolueno y se evaporó a aproximadamente 70 g de un aceite. Aunque el residuo así
 10 obtenido todavía tenía un olor débil a ácido acético, se disolvió en acetonitrilo (200 mL) y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2.5 días, no se había formado precipitado, por lo que la solución se evaporó bajo presión reducida en un baño de 60 °C. El aceite resultante se disolvió en acetonitrilo (aproximadamente 200 mL) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una pequeña cantidad de precipitado se había formado, que se recolectó y se lavó con una pequeña cantidad de acetonitrilo. Tras la filtración, una gran cantidad de sólido precipitó a partir del licor madre. El precipitado se recolectó y se lavó con una pequeña cantidad de acetonitrilo. Tras el secado en un horno de vacío a 60 °C, se obtuvieron 12.05 g de material. El sólido así obtenido se fue aislado otra vez a partir de 250 mL de acetonitrilo hirviendo para proporcionar, después de secado hasta peso constante en un horno de vacío a 60 °C, el sólido (8.92 g) de 2-[4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2Hpirazol-3-il]tieno[3,2-c]piridina.

15 Los lotes combinados 21.5 g y 8.92 g se suspendieron en acetonitrilo a 500 mL de volumen total. La suspensión se calentó sobre un baño de vapor de agua a ebullición. La mayor parte del sólido se disuelve en solución, pero algunas partículas permanecieron sin disolver y se eliminaron mediante filtración por vacío caliente. El filtrado recogido en el matraz de filtro de 2 L produjo rápidamente un precipitado sólido de color blanco. El acetonitrilo se adicionó a un volumen de 600 mL. El filtrado se llevó a ebullición sobre un baño de vapor hasta que todos los sólidos se disuelven. El matraz se retiró del baño de vapor y la mezcla se enfrió gradualmente a temperatura ambiente, tal como estaba en reserva durante 2.5 horas. Se formó un sólido de color blanco desde la solución durante ese tiempo y se recolectó mediante filtración por vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (24.85 g); ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9.06 (d, J=0.8 Hz, 1H), 8.43 (d, J=5.7 Hz, 1H), 7.72 (ddd, J=5.7, 1.0, 0.8 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.61 (t, J=7.8 Hz, 1H), 7.36 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J=0.8 Hz, 1H), 7.03 (d, J=7.6 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.18 (s, 3H); MS (APCI+) *m/z* 307 (MH⁺), (APCI-) *m/z* 305 (M-H⁺).



25

Ejemplo 12. 2-(4-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il)tieno[2,3-c]piridina.

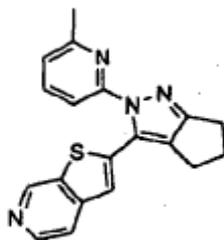
Tieno[2,3-c]piridina de la etapa iii, Ejemplo 12 se ha sintetizado previamente (véase, por ejemplo, Graulich et al. (2004) Synthesis 12: 1935-1937; Graulich et al. (2005) J. Med. Chem. 48(15): 4972-4982).

30 Etapa i. (2,2-Dimetoxi-etil)-tiofen-2-ilmetilen-amina. Una solución de tiofen-2-carboxaldehído (7.5 mL, 82.3 mmol, Alfa Aesar), aminoacetaldehído dimetil acetal (8.82 mL, 82.3 mmol, Alfa Aesar) en 100 mL de tolueno se calentó a 115 °C, utilizando una trampa Dean-Stark para eliminar agua. Después de 3 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se colocó en un evaporador rotatorio para evaporar el tolueno, que dio un líquido de color marrón (aproximadamente 17.3 g), que se usó sin manipulación adicional en la siguiente etapa. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 3.42 (6 H, s), 3.73 (1 H, d, J=5.3 Hz), 4.65 (1 H, t, J=5.3 Hz), 7.07-7.41 (3 H, m).

35 Etapa ii. éster dimetílico del ácido {(2,2-dimetoxi-etil)-etoxicarbonil-amino}-tiofen-2-il-metil}-fosfónico. Al aceite obtenido en la etapa i (16.3 g, 82.3 mmol) se le adicionaron 60 mL de THF bajo una atmósfera de N₂. La reacción se enfrió a -10 °C (MeOH/hielo) y equipado con un termómetro interno. Se adicionó gota a gota cloroforniato de etilo (7.9 mL, 82.3 mmol) manteniendo la temperatura interna igual o por debajo de -9,5 °C. La reacción se agitó durante 10 minutos a -10 °C y luego se retiró el baño y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Utilizando un baño de hielo como un disipador de calor, se adicionó fosfito de trimetilo (10.7 mL, 90.5 mmol). La reacción se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El solvente se eliminó en un evaporador rotatorio. Se adicionó tolueno y se evaporó en un evaporador rotatorio. A continuación, se llevó a cabo la adición de tolueno y la evaporación por segunda vez.

45 El aceite de color marrón espeso resultante se purificó mediante cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, columna Isco RediSep de 330 g, 0-100% de EtOAc/hexano durante 1 volumen de columna a continuación, se mantiene a 100% de EtOAc). Las fracciones deseadas se combinaron y concentraron para dar 23.48 g de un aceite espeso, de color marrón.

- Etapa iii. Tieno[2,3-c]piridina. El material desde la etapa ii (23.5 g, 61.6 mmol), se disolvió en 100 mL de CH₂Cl₂. El matraz de tres bocas se equipó con un condensador de reflujo y termómetro interno bajo atmósfera de N₂. El matraz se evacuó y se purgó con nitrógeno. Se adicionó lentamente cloruro de titanio (IV) (40 mL, 369 mmol) a la reacción. La temperatura de reacción se mantuvo a alrededor de 40 °C. Después se adicionaron aproximadamente 15 mL, la reacción se colocó en un baño de hielo para controlar la temperatura. La reacción se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente antes de calentar a 40 °C, durante la noche. La reacción se calentó a 40 °C, durante 18 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. Los contenidos de la reacción se vertieron en porciones en un gran vaso de precipitados que contiene 200 g de hielo y 200 mL de NH₄OH observando una gran emisión de gases. La reacción se agitó vigorosamente durante unos minutos. La reacción se filtró y el sólido se lavó con CHCl₃ (3x100 mL).
- 5 El filtrado bifásico se transfirió a un embudo de separación y se separaron las capas. La capa orgánica se extrajo en HCl 1 N (2x100 mL). La capa acuosa de HCl se lavó con 20 mL de CH₂Cl₂ y cuidadosamente basificó con NH₄OH concentrado hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 9. El producto se extrajo en CH₂Cl₂ (3x100). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró hasta un aceite de color naranja que solidificó a un sólido de color naranja. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna (sistema Biotage Horizon, columna Isco RediSep de 120 g, equilibrada con 100% de heptano, se eluye con 45% de EtOAc/heptano). Un sólido de color blanco se aisló (4.20 g). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.56 (1 H, dd, *J*=5.5, 0.8 Hz), 7.86 (1 H, dd, *J*=5.5, 1.0 Hz), 8.10 (1 H, d, *J*=5.3 Hz), 8.46 (1 H, d, *J*=5.5 Hz), 9.25 (1 H, s). ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 7.40 (1 H, d, *J*=5.5 Hz), 7.74 (2 H, m), 8.52 (1 H, d, *J*=5.5 Hz), 9.19 (1 H, s). MS (APCI, M+1) 136.0.
- 10 Etapa iv. trihidrógeno fosfato del ácido tieno[2,3-c]piridin-2-ilborónico. Un matraz de tres bocas equipado con un termómetro interno que contiene el material de la etapa III (4.12 g, 30.5 mmol) se evacuó y luego se llenó con una atmósfera de nitrógeno. Se adicionó THF (50 mL) y la solución se enfrió a -44 °C (CH₃CN/hielo seco). Se adicionó *n*-butillitio (1.6 M/hexano, 21 mL, 34 mmol) durante 10 minutos, manteniendo la temperatura interna igual o por debajo de -35 °C. La reacción se agitó a -33 a -45 °C, durante 75 minutos. Se adicionó borato de triisopropilo (8.4 mL, 36.6 mmol) y el baño de enfriamiento se eliminó. La reacción se agitó durante una hora y luego se adicionó ácido fosfórico (85% acuoso, 2.5 mL, 33.5 mmol). La reacción se diluyó con 10 mL de agua que producirá un precipitado. La reacción se agitó vigorosamente durante 15 minutos. Un sólido de color amarillo se recolectó por filtración, aclarando con EtOAc (aproximadamente 50 mL) para proporcionar un sólido en polvo de color blanco (9.57 g). Aproximadamente la mitad del material se lavó con 50 mL de agua para aislar 3.16 g de un sólido de color rosa pálido. Ambos cultivos de material son iguales como se determina por los datos espectrales. ¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 7.87 (1 H, d, *J*=5.5 Hz), 7.95 (1 H, s), 8.41 (1 H, d, *J*=5.7 Hz), 9.11 (1 H, s).
- 20 Etapa v. 2-(4-metil-1-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-5-il)tieno[2,3-c]piridina. En un matraz de tres bocas de 250 mL se adicionó 4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico (1.23 g, que se puede sintetizar como se describe en el ejemplo 7, etapa iv), el material de la etapa iv (2.00 g), fluoruro de potasio (1.11 g), fosfato de potasio tribásico (2.44 g) en 50 mL de dioxano. El matraz fue evacuado con un vacío y se purgó con gas nitrógeno. A este se le adicionó PdCl₂ (dppf) (Corriente, aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) diclorometano 280 mg)) y ligando de dppfo (Corriente, 1,1-bis (difenilfosfino) ferroceno, 212 mg) y agua (0.10 mL). La reacción se calentó a 80-111 °C, durante 2.5 horas después se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se combinó con material desde otra reacción que se ejecutan de una manera similar. El material de reacción en bruto se filtró a través de un lecho de Celite aclarando con EtOAc (aproximadamente 750 mL). El filtrado se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo oscuro se diluyó con CH₂Cl₂ y el sólido se separó por filtración. El filtrado de CH₂Cl₂ se concentró en un evaporador rotatorio para dar un residuo negro. El material en bruto se purificó por filtración a través de un tapón de sílica gel eluyendo con 50% EtOAc/hexano (aproximadamente 800 mL en total). Las fracciones desde la filtración del tapón de sílica gel produjeron dos lotes de material (uno puro, uno impuro). Estos se concentraron a sequedad por separado. El material impuro se trituró con Et₂O y un sólido de color blanco se recolectó por filtración. El filtrado se concentró y se repitió la trituración con Et₂O para dar 83 mg. Las fracciones que contenían solamente el producto deseado más el lote de 83 mg se combinaron y se purificaron junto con el lote puro. Aproximadamente 5-10 mL de EtOH se adicionaron al material, que se calentó hasta ebullición. Una vez que todo el material se disolvió, se retira del calor y se dejó reposar. Un sólido de color beige entonces comenzó a precipitar. Los licores madre se decantaron y el precipitado se aclaró con una pequeña cantidad de EtOH frío. El precipitado se secó en un horno de vacío a 50 °C, durante la noche para proporcionar 550 mg de un sólido de color beige. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.09 (1 H, s), 8.50 (1 H, d, *J*= 5.7 Hz), 7.62-7.69 (3 H, m), 7.39 (1 H, d, *J*= 7.99 Hz), 7.27 (1 H, d, *J*= 0.6 Hz), 7.04 (1 H, d, *J*= 7.4 Hz), 2.25 (3 H, s), 2.19 (3 H, s). MS (APCI, M+1) 307.1. pf 124.-125 °C
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50



Ejemplo 13. 2-(2-(6-metilpiridin-2-il)-2,4,5,6-tetrahidrociclopenta[c]pirazol-3-il)tieno[2,3-c]piridina.

En un matraz de tres bocas de 250 mL se adicionó 2- (6-metil) piridin-2-il) -2,4,5,6- tetrahidrociclopentapirazol- 3-il éster del ácido trifluoro-metanosulfónico (1.33 g, que puede ser sintetizado como se describe en el ejemplo 5, Etapa iv), el material del Ejemplo 12, Etapa iv (2.00 g), fluoruro de potasio (1.11 g), fosfato de potasio tribásico (2.44 g) en 45 mL de dioxano. El matraz se evacuó a presión reducida y se purgó con gas y nitrógeno. A este se le adicionó PdCl₂ (dppf) (Corriente, aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocenopaladio (II) diclorometano, 280 mg)) y ligando de dppf (Corriente, 1.1'-bis(difenilfosfino)ferroceno. 212 mg) y agua (0.10 mL). La reacción se calentó a 80-111 °C, durante 3.5 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. El material de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite aclarando con EtOAc (aproximadamente 250 mL). El filtrado de EtOAc se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo oscuro resultante se diluyó con CH₂Cl₂ y el sólido se separó por filtración. El filtrado de CH₂Cl₂ se concentró en un evaporador rotatorio para dar un residuo negro que se diluyó con CH₃CN y se sonicó. Un sólido de color marrón claro (0.520 g) se recolectó por filtración. El filtrado se concentró hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna (sistema Horizon Biotage, columna Analogix de 12 g, 0-50% de EtOAc/heptano, a continuación, se mantiene a 50% de EtOAc/heptano) para producir aproximadamente 300 mg de un sólido. Los 300 mg del sólido y el sólido de color marrón claro (0.520 g) se combinaron y se diluyeron con aproximadamente 10 mL de EtOH, se calentaron a ebullición, se filtraron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El material sólido comenzó a precipitar. Después de reposar durante la noche a temperatura ambiente, los licores madre se decantaron y el material restante se aclaró con una pequeña cantidad de EtOH frío. El sólido se secó en un horno de vacío a 45 °C, durante 1.5 horas para proporcionar 410 mg de un sólido. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.05 (1 H, s), 8.45 (1 H, d, J= 5.7 Hz), 7.70 (1 H, t, J= 7.7 Hz), 7.62 (1H, d, J= 5.7 Hz), 7.38 (1 H, d, J= 7.9 Hz), 7.25 (1 H, d, J= 1.2 Hz), 7.15 (1 H, d, J= 7.6 Hz), 2.85-2.91 (4 H, m), 2.51-2.58 (2 H, m), 2.46 (3 H, s). MS (APCI, M+1) 333.1. pf 145-146 °C.

Ejemplo 14. 2-[4-metil-2-(6-metilpiridin-2-il)2H-pirazolo-3-il]tieno[3,2-c]piridina (Ejemplo de referencia).

4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazolo-3-il éster del ácido trifluorometanosulfónico (36.6 g, 114 mmol), carbonato de potasio (39.4 g, 285 mmol), y 2- (4,4,5,5-tetrametil- [1,3,2] dioxaborolan-2-il) tieno [3,2-c] piridina (31.2 g, 120 mmol) se suspendieron en tolueno (300 mL), alcohol isopropílico (IPA) (75 mL) y agua (75 mL). La mezcla de reacción se sometió secuencialmente a vacío seguido de purga con nitrógeno. Esto se repitió por un total de cinco veces. Se adicionó bis (trifenilfosfina) paladio (II) cloruro (4.4 g, 6.27 mmol), y la reacción se calentó a 78 °C. Después de 2 horas la mezcla de reacción se dejó enfriar. La capa acuosa se separó, y la capa orgánica se filtró para eliminar el residuo de catalizador de color negro. La capa orgánica se lavó con agua (80 mL). La capa orgánica se extrajo con HCl 3 M (100 mL) y agua (100 mL). Se adicionaron carbono (0.5 g) y celite (9 g) a la fase acuosa y la solución se concentró para eliminar el tolueno residual. La capa acuosa se filtró. La fase acuosa se hizo básica (pH = 10) con la adición de NaOH al 50%. Un sólido de color amarillo se precipitó. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó tirando aire a través de este para dar 24.1g (69.1%) de un sólido de color amarillo. El sólido se suspendió en tolueno (250 mL). La suspensión se calentó a 65 °C y se filtró. El filtrado se concentró. El residuo se suspendió en tolueno (100 mL) y se filtró. La torta se lavó con tolueno (40 mL). La torta se secó tirando aire a través de esta para dar 19.2 g (55%) del producto en bruto

Los 19.2 g se combinaron con otras muestras preparadas de manera similar para dar 141.7 g. Los sólidos combinados se suspendieron en IPA (500 mL) y la suspensión se calentó a 83 °C, pero no todos los sólidos entraron en la solución. Se adicionó IPA (300 mL) y la suspensión se calentó a 83 °C, para dar una solución oscura. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente a 8 °C/hora. La suspensión se filtró, y la torta se lavó con IPA (200 mL). La torta se secó a 50 °C, durante 60 horas para dar 131.8 g del producto deseado.

Ejemplo biológico 1

Los métodos del ensayo de quinasa ALK-5 se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Laping et al. (2002) Mol. Pharmacol. 2002; 62: 58-82). Los compuestos mencionados en los ejemplos específicos se pusieron a prueba de la siguiente manera para la inhibición de actividad de autofosforilación de ALK-5 y de la fosforilación de ALK-5 de α-caseína. Materiales:

- Solución reguladora: HEPES 50 mM, pH 7.6, con NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM.

ES 2 559 521 T3

5 • Proteína GST-ALK-5 – 0.44 mg/mL (stock de aproximadamente 7 μ M). Una dilución 1: 350 da un stock de 20 nM, que se traduce en 2 nM final en el ensayo. ALK-5 humana se expresó en células de insecto Sf9 infectadas con Baculovirus que expresan una secuencia de truncamiento de ALK-5 (aminoácidos H¹⁴⁹-M⁵⁰³), fusionada en el N-terminal con la glutatión S-transferasa GST, en un vector pFastBac (Invitrogen). Las células se rompieron por sonicación a 4 °C. El lisado se centrifugó a 40,000 xg durante 45 minutos, y el sobrenadante se aplicó a una columna de 10 mL de glutatión Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) equilibrada con Tris-HCl 100 mM, pH 7.6 que contiene NaCl 300 mM, 10% de glicerol, 1 % de NP40, ditioneitol 2 mM (DTT) y un inhibidor de proteasa comprimido completo libre de EDTA por cada 50 mL (Roche). La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris HCl 50 mM pH 8.0 que contiene NaCl 150 mM, 10% de glicerol, DTT 2 mM y un inhibidor de proteasa comprimido completo libre de EDTA por cada 100 mL. La columna se eluyó con solución reguladora de lavado que contiene glutatión reducido 8 mM. Las fracciones se recolectaron y se dializaron durante la noche en Tris HCl 20 mM pH 8.0 que contiene 10% de glicerol, NaCl 150 mM, DTT 2 mM y 4- (2-aminoetil) -bencenosulfoniifluoruro. HCl 1 mM (AEBSF) (Sigma) a 4 °C.

- α -caseína (Sigma, # C8032) se prepara a 2 mM en solución reguladora (50 mg/mL).
- ATP frío contiene ATP frío 10 μ M (de un stock 10 mM de solución reguladora).
- 15 • ATP caliente consiste de 0.5 μ Ci/pozo γ -³³P-ATP (Amersham, AH9968) en solución reguladora.
- Solución reguladora de Ensayo - por 10 mL de solución reguladora

1 mL de HEPES 500 mM (pH 7,6)

20 μ L de NaCl 5 M

100 μ L de MgCl₂ 1 M

20 10 μ L de DTT 1 M (ditiotreitolo)

Método de ensayo:

En una placa de fondo de filtro de 96 pozos (Millipore, #MSDV N6B 50), 58 μ L de solución reguladora de ensayo se adicionan para alcanzar el pozo. Adicionar 10 μ L de mezcla de ATP frío en solución reguladora de ensayo, luego 10 μ L de una dilución 1:10 de α -caseína stock. A continuación, se adicionan 2 μ L del compuesto que se prueba (DMSO) a una concentración final de 50X. Se adiciona la mezcla de ATP caliente (10 μ L), y la reacción se inicia con la adición de 10 μ L de una dilución 1: 350 de la proteína ALK-5 (2 nM final) en solución reguladora de ensayo con 0.05% de BSA (albúmina de suero bovino). La reacción se mezcló durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se continuó durante 145 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene luego con la adición de 100 μ L de TCA (ácido tricloroacético) al 20% frío como el hielo. El ensayo se incuba a continuación durante al menos 1 hora a 4 °C. y luego los contenidos de cada pozo se filtran por succión a través del filtro. Los pozos se lavaron tres veces con 200 μ L de TCA al 10% frío como el hielo. El fondo de la placa se mancha antes y después se retira la sub-base de plástico, y se secó durante la noche a temperatura ambiente. Adicionar 30 μ L de líquido de centelleo, y contar 1 minuto por pozo en un contador de centelleo Wallac Tri-Lux.

35 Los valores de IC₅₀ (nM) se reportan a continuación, en la Tabla 2 como la media de dos o más valores de IC₅₀ que fueron determinados en uno o más experimentos. El número de determinaciones ("n") se reporta dentro de los paréntesis. Los valores individuales que producían los valores medios de IC₅₀ se enumeran dentro de los paréntesis si había 4 o menos determinaciones. El error estándar (SE) también se reporta. El error estándar es la desviación estándar dividida por el número de determinaciones ("n").

Tabla 2

Ejemplo	IC ₅₀ (nM)
1	23.4 (n=18); SE=3.5
2	94.1 (n=2;111, 76.8); SE=17.3
3	108 (n=2; 121, 94.8); SE=13.3
4	4.33 (n=4; 1.0, 2.84, 5.66, 7.82); SE=1.51
5	12.9 (n=4; 31, 12.5, 1.0, 7.24); SE=6.46

Ejemplo	IC ₅₀ (nM)
6	35.2 (n=2; 38.6, 31.8); SE=3.41
7	6.65 (n=16); SE=0.61
12	7.94 (n=2; 10.4, 5.47); SE=2.48
13	18.9 (n=2; 26.7, 11.2); SE=7.73

Ejemplo Biológico 2

5 Métodos de ensayo del gen indicador de ALK-5 se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Maliekal et al. (2004) J Biol Chem 279(35):36287-36292). Los compuestos nombrados en los ejemplos especificados se ensayaron de la siguiente manera para la inhibición de la actividad indicadora de luciferasa del elemento de unión Smad (SBE) en células NIH-3T3 estimuladas por TGFβ1. El siguiente ensayo de luciferasa emplea células NIH/3T3 (fibroblastos de murino), que se transfectaron transitoriamente con una construcción indicadora de luciferasa del elemento de unión Smad (SBE). Esta construcción expresada es sensible a agentes que estimulan la vía de señalización de Smad.

Materiales:

- 10 • Células NIH-3T3 (ATCC CRL-1658)
- Medio Eagle Modificado de Dulbecco con rojo fenol (Life Technologies 11965-092)
- Medio Eagle Modificado de Dulbecco sin rojo fenol (Life Technologies 21063-029)
- Suero fetal bovino (Life Technologies SH30071.03)
- Fugene (Roche 1814443)
- 15 • Opti-MEM I (Life Technologies 31985-070)
- Sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega E2940, E2980)
- Solución de gentamicina (10 miligramos/milímetro) (Life Technologies 15710-064)
- Placas de ensayo de 96 pozos, blancas, TCT (Corning Costar 3917)
- Frascos de cultivo de tejidos de 75 centímetros (Corning Costar 430 641)
- 20 • Vector pRL-CMV (Promega Corporation, Madison, WI, Producto E2261) (pRL es un vector que codifica una Renilla reniformis luciferasa bajo el control de un promotor de citomegalovirus constitutivamente activo (CMV))
- Factor de crecimiento transformante β₁ - (R & D Systems, Minneapolis, MN, producto 240-B)
- Vector pSBE4-Luc/BV4 (también conocido como vector pSBE4-luc) (que contiene 4 copias de una región codificante del elemento de unión Smad y luciferasa de luciérnaga) (Zawel et al (1998). Mol Cell 1 (4): 611-617).

25 Métodos:

Las células NIH-3T3 se mantienen en Medio Eagle Modificado de Dulbecco con 10% de suero fetal bovino y 10 microgramos/mL de gentamicina. Las células se dividen todos los lunes, 1: 5 a 1:10, y se dividen de nuevo el miércoles. Las células se dividieron el viernes 1:20, para las células necesarias para el ensayo y mantenimiento del lunes. No permitir que las células crezcan hasta confluencia total.

30 Día 1, 0 horas (inicio del experimento)

Placa de 1.6 millones de células NIH/3T3 en un matraz de 75 centímetros para transfecciones utilizando 15 milímetros de medio de crecimiento (medio Eagle modificado de Dulbecco, suero fetal bovino 10%, Gentamicina 10 microgramos/milímetro).

Día 1, 7 horas después del inicio del experimento

ES 2 559 521 T3

Preparar la transfección:

- a. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 milímetros, adicionar 48 microlitros de Fugene directamente a 400 microlitros de Opti-MEM. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 - 5 b. Durante el período de incubación anterior, alícuota de 8 microgramos de SBE-luc y 0.16 microgramos de CMV-pRL a 400 microlitros Opti-MEM.
 - c. Adicionar Fugene/Opti-MEM desde la etapa "a" a los ADN en la etapa "b". Incubar a temperatura ambiente durante 15 a 45 minutos.
 - d. Adicionar los ADN acomplejados con células sembradas en placas anteriormente (Día 1, 0 horas). No es necesario cambiar los medios de comunicación, incubar durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂.
 - 10 Día 2, 24 horas después del inicio del experimento
- Preparar la(s) suspensión(es) de células a partir de células transfectadas (Día 1, etapa 2) a una densidad de 200,000 células/mL en Medio Eagle Modificado de Dulbecco, suero fetal bovino al 10%, 10 microgramos/milímetro de gentamicina. Las células de la placa en placas de ensayo (TCT blancas). 100 microlitros/pozo para placas de 96 pozos. Esto pondrá el número de células a 20,000 células/pozo. Incubar durante 5-6 horas a 37 °C, 5% de CO₂.
- 15 Día 2, 31 horas después del inicio del experimento
 - a. Preparar placas de respuesta dosis, si es necesario.
 - b. Lavar la placa con 100 microlitros de Medio Eagle Modificado de Dulbecco, 10 microgramos/milímetro de Gentamicina sin suero.
 - 20 c. Adicionar 170 microlitros/pozo de Medio Eagle Modificado de Dulbecco, 10 microgramos/milímetro de gentamicina, 0.5% de suero fetal bovino,
 - d. Compuestos y controles de prueba de transferencia a placas de ensayo (TCT, blancas), 20 microlitros de 10X de stock para placas de 96 pozos.
 - e. Después de 30-60 minutos de tratamiento con el compuesto, adicionar 250 picogramos/milímetro de Factor β de crecimiento de transformación, a cada pozo. (Adicionar 10 microlitros de un stock 20X).
 - 25 Día 3, 51 horas después del inicio del experimento
- Placas de ensayo para la actividad de luciferasa.
- a. Reconstituir sustrato de luciferasa Dual-Glo liofilizado con solución reguladora de luciferasa Dual-Glo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
 - b. Retirar las placas de ensayo de la incubadora y permitir que alcancen la temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - 30 c. Aspirar los medios desde la placa de ensayo. Adicionar 80 microlitros del sustrato de lucoferasa Dual-Glo estable diluido que contiene 1 parte de medios de medio de Eagle Modificado de Dulbecco sin rojo fenol. Sellar las placas e incubar durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente.
 - d. Leer en el lector de placas Packard TopCount HTS utilizando el modo de recuento de fotones individuales (SPC) durante 6 segundos/pozo para leer la actividad luciferasa de luciérnaga de pSBE4-Luc/BV4 pSBE4-luc.
 - 35 e. Después de leer las placas para la actividad luciferasa de luciérnaga, retirar los sellos y adicionar 40 microlitros de reactivo de parada y Glo en cada pozo. Volver a sellar las placas e incubar durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Las placas de lectura en Packard TopCount como con la luciferasa de luciérnaga, para leer la actividad de luciferasa de Renilla a partir de pRL.
- 40 La actividad de luciferasa Renilla presenta un control de transfección. La actividad de luciferasa de luciérnaga sirve como el ensayo de lectura. La actividad de ensayo de luciferasa se normaliza a la actividad de ensayo de Renilla para cada muestra particular.
- Los valores de IC₅₀ (nM) son reportados, a continuación, en la Tabla 3 como la media de dos o más valores de IC₅₀ que fueron determinados en uno o más experimentos. El número de determinaciones ("n") se reporta dentro de los paréntesis. Los valores individuales que producían los valores medios de IC₅₀ se enumeran dentro de los paréntesis

ES 2 559 521 T3

donde n es 4 o menos. El error estándar (SE) también se reporta. El error estándar es la desviación estándar dividida por el número de determinaciones (* n *).

Tabla 3

Ejemplo	IC ₅₀ (nM)
1	149 (n=4; 117, 133, 164, 183); SE=14.9
2	440 (n=3; 211, 504, 605); SE=118
3	403 (n=3; 286, 453, 471); SE=58.9
4	21.5 (n=3; 11.5, 26, 27); SE=5.0
5	30.8 (n=4; 22, 27, 30, 44) :SE=4.71
6	244(n=3; 186, 199, 348); SE=520
7	35.9(n=21); SE=2.47
12	42.5 (n=2; 51.0, 34.0); SE=8.5
13	57.5 (n=2; 52.0, 63.0); SE=5.5

5 Ejemplo de Formulación 1

Preparación de un gel que contiene 2% (peso/peso) 2- [4-metil-2- (6-metil-piridin-2-il) -2H-pirazol-3-il] tieno [3,2 -c] piridina.

Materiales:

Etanol (200 Proof), USP (Aaper Alcohol and Chemical Co, KY)

10 Propilenglicol de (pureza> 99.5%), reactivo ACS (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)

Polietilenglicol (PEG 400), Peso molecular: 380-420 (Mallinkrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ)

Hidroxipropil celulosa (KLUCEL® HF) (Hercules Incorporated, Wilmington, DE)

Agua, Chromosolve® para HPLC (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)

Alcohol bencílico (pureza> 99%) (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)

15 Procedimiento:

2- [4-metil-2- (6-metil-piridin-2-il) -2H-pirazol-3-il] tieno [3,2-c] piridina (2 g) se transfirió en una botella de vidrio de 150 mL. A continuación, se adicionaron a la botella propilenglicol (30 g), polietilenglicol (30 g), agua (10 g), y alcohol bencílico (2 g) y etanol (20 g). La mezcla se agitó durante 2 horas. A continuación, se adicionó KLUCEL® HF (500 mg) a la solución, seguido de etanol q.s. a 100 g. La solución se agitó durante la noche para producir un gel que contiene 2 % (peso/peso) 2-[4- metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina.

20

Ejemplo de Formulación 2

Preparación de un gel que contiene 1% (peso/peso) de 2-[4-metil-2- (6-metil-piridin-2-il) -2H-pirazol-3-il] tieno [3,2 -c] piridina.

Materiales:

25 Etanol (200 Proof), USP (Aaper Alcohol and Chemical Co, KY)

Propilenglicol (pureza> 99.5%). Reactivo ACS (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)

Polietilenglicol (PEG 400), Peso molecular: 380-420 (Mallinkrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ)

ES 2 559 521 T3

Hidroxipropil celulosa (KLUCEL® HF) (Hercules Incorporated, Wilmington, DE)

Agua, Chromosolve® para HPLC (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)

Alcohol bencílico (pureza > 99%) (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)

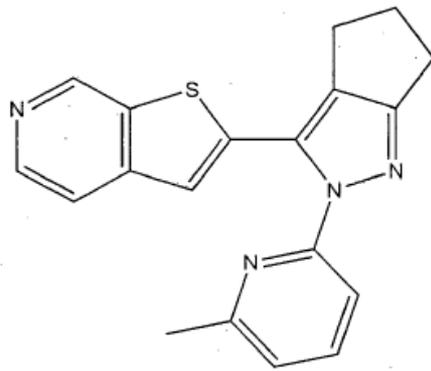
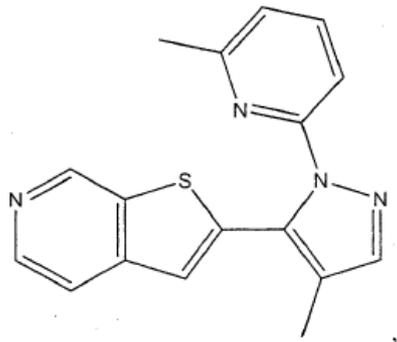
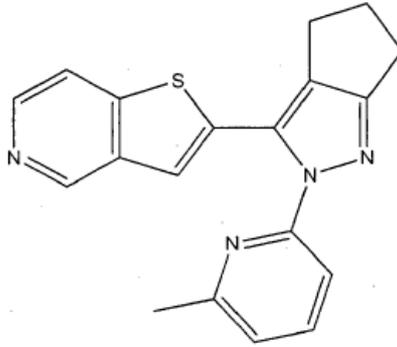
Procedimiento:

- 5 2- [4-Metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno [3,2-c] piridina (1 g) se transfirió a una botella de vidrio de 150 mL. A continuación, se adicionaron a la botella propilenglicol (30 g), polietilenglicol (30 g), agua (10 g) y alcohol bencílico (2 g) y etanol (20 g). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 1 hora. A continuación, se adicionó KLUCEL® HF (500 mg) a la solución, seguido de etanol q.s. a 100 g. La solución se agitó durante la noche para producir un gel que contiene 1% (peso/peso) de 2-[4-metil-2-(6-metil-piridin-2-il)-2H-pirazol-3-il]-tieno[3,2-c]piridina.

10

REIVINDICACIONES

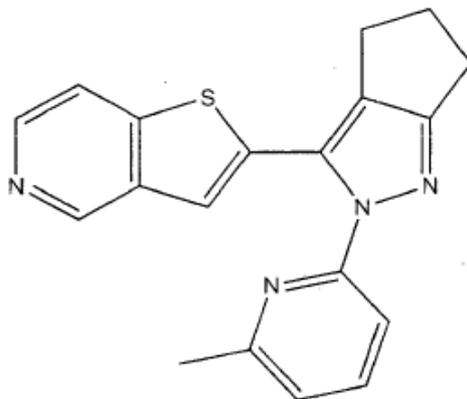
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



5 y

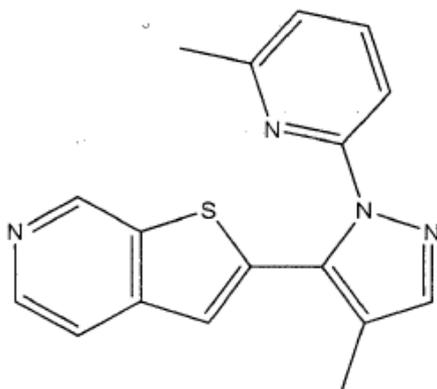
una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



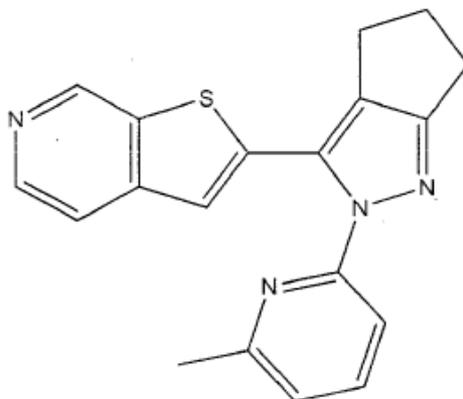
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 5. Una composición farmacéutica que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Una composición farmacéutica tópica que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado para aplicación tópica.
- 5 7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la reducción de cicatrices o en la inhibición de la formación de cicatrices.
8. El compuesto para uso de la reivindicación 7, en donde dicha cicatriz es una cicatriz queloide o una cicatriz hipertrófica.
9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una condición mediada por TGF- β .
- 10 10. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en donde dicha condición mediada por TGF β se selecciona entre el grupo constituido por cáncer, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, melanoma, una enfermedad fibrótica, glomerulonefritis, nefropatía diabética, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, hiperplasia arterial, restenosis, escleroderma, una neoplasia hematológica y cicatrización dérmica.
- 15 11. Una composición farmacéutica que comprende: el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un segundo agente medicinal.
- 20 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde dicho segundo agente medicinal se selecciona del grupo que consiste en: TGF β_3 , un anticuerpo TGF β_1 , un anticuerpo TGF β_2 , acetónido de triamcinolona (9-fluoro-11, 16,17-trihidroxi- 17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12, 13,14,15,16,17- dodecahidrociclopenta[a]fenantren-3-ona), un esteroide, un corticosteroide, un antibiótico, un antibiótico tópico, una lámina de silicona, 5-fluorouracilo, estrógeno, un agonista del receptor de nACh (nicotínico de la acetilcolina), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), y PDGF (factor de crecimiento derivado