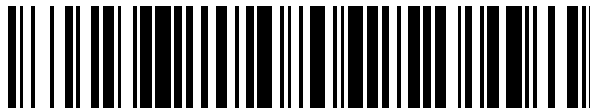


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 854**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5025 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/US2013/066939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13848995 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2911671**

54 Título: **Pirazolopiridazinas y métodos para tratar las enfermedades degenerativas de la retina y la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher**

30 Prioridad:

25.10.2012 US 201261718611 P
08.03.2013 US 201361775402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2018

73 Titular/es:

USHER III INITIATIVE (100.0%)
191 North Wacker Drive, Suite 2090
Chicago, Illinois 60606, US

72 Inventor/es:

BURLI, ROLAND WERNER;
ESMIEU, WILLIAM RAMESHCHANDRA KRISHNA;
LOCK, CHRISTOPHER JAMES;
MALAGU, KARINE FABIENNE;
OWENS, ANDREW PATE y
HARTE, WILLIAM EDWARD

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 687 854 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

Pirazolopiridazinas y métodos para tratar las enfermedades degenerativas de la retina y la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/718,611, presentada el 25 de octubre de 2012 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 61/775,402, presentada el 8 de marzo de 2013.

Antecedentes de la invención

El síndrome de Usher, un trastorno genético raro y una causa principal de sordera y ceguera, está asociado con una mutación en una cualquiera de los diez genes. Otros nombres para el síndrome incluyen el síndrome de Hallgren, el síndrome de Usher-Hallgren, el síndrome de Disacusia RP y el síndrome de Disacusia de la retina distrófica.

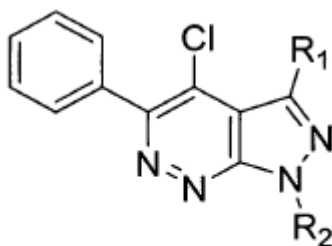
10 El síndrome de Usher se caracteriza por sordera y pérdida gradual de la visión. La pérdida de audición se asocia con defectos del oído interno, mientras que la pérdida de visión se asocia con retinitis pigmentosa (RP), una degeneración de las células de la retina. Por lo general, los bastones de la retina se afectan primero, lo que lleva a la ceguera nocturna temprana y la pérdida gradual de la visión periférica. Algunos casos implican la degeneración temprana de las células cónicas de la mácula, lo que conduce a una pérdida de la agudeza central. En algunos casos, se evita la visión foveal del paciente, lo que lleva a la "visión de rosquilla", en la que la visión central y periférica permanecen intactas, pero interrumpidas por un anillo de ceguera.

15 El síndrome de Usher tiene tres subtipos clínicos, denominados: I, II y III. Los sujetos de Usher I nacen profundamente sordos, comienzan a perder visión dentro de diez años y muestran dificultades de equilibrio. Son lentos para aprender a caminar de niños, debido a anomalías vestibulares. Los sujetos de Usher II sufren menos pérdida de audición, no sufren desequilibrio físico y comienzan a perder visión en la adolescencia. Gran parte de su audición se puede preservar en la madurez. Los sujetos de Usher III sufren pérdida gradual de audición y visión y pueden sufrir un desequilibrio físico.

20 El síndrome de Usher es una afección variable; el grado de severidad no está estrechamente relacionado con el subtipo. Por ejemplo, un sujeto de Usher III puede ser asintomático en la infancia, pero puede desarrollar una pérdida profunda de la audición y la visión a principios o mediados de la edad adulta. La discapacidad visual sustancial antes de los 50 años es común en los sujetos de Usher III. Un sujeto de Usher I, por otro lado, podría ser sordo desde el nacimiento, pero mantener una buena visión central en la vejez. Se puede hacer referencia al documento WO2012/148994.

Resumen de la invención

La invención proporciona los compuestos de fórmula I:

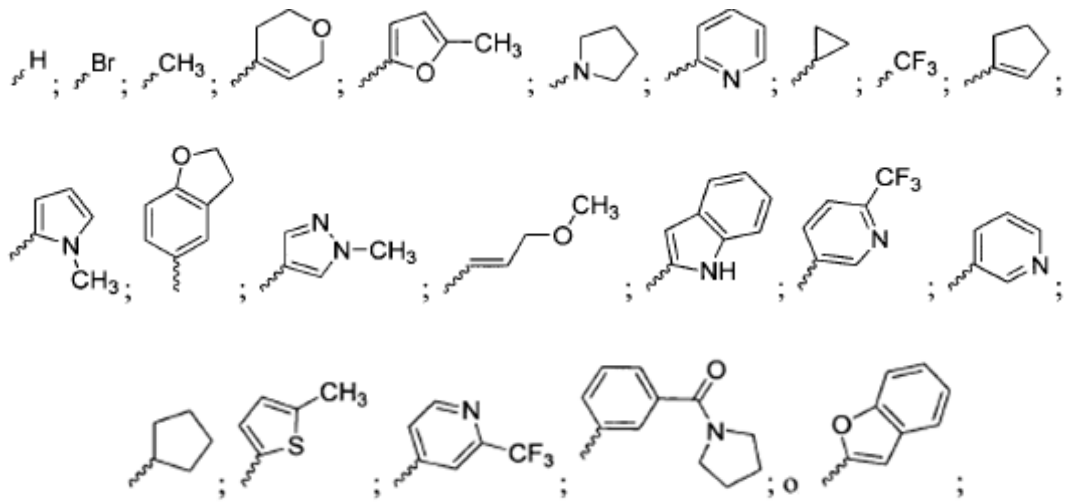


Fórmula I

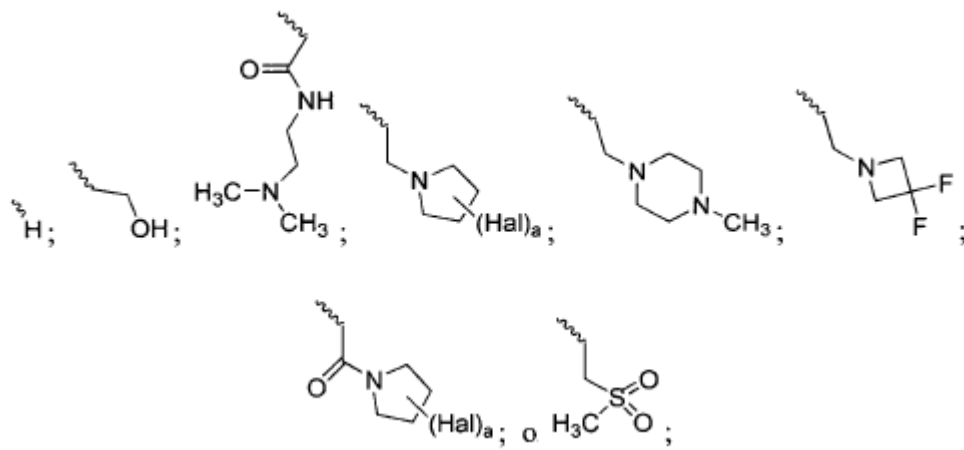
30

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que R₁ es:

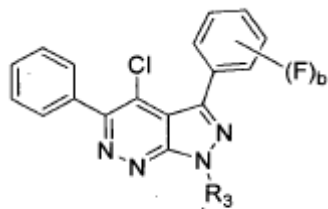


R₂ es:



5 y a es 0, 1, o 2.

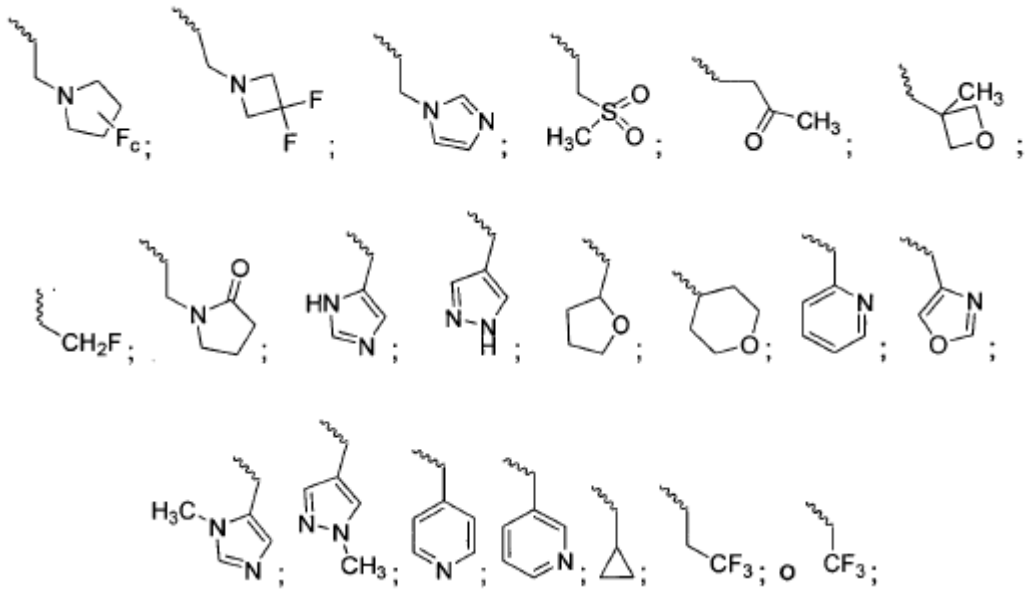
La invención también proporciona los compuestos de fórmula II:



Fórmula II

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

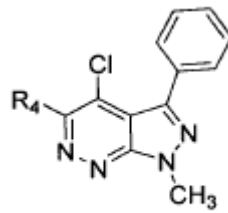
en la que R₃ es:



b es 0 o 1; y

c es 1 o 2.

Se describen los compuestos de fórmula III:



Fórmula III

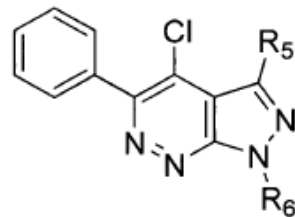
5

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R₄ es



La invención proporciona adicionalmente los compuestos de fórmula XIII:

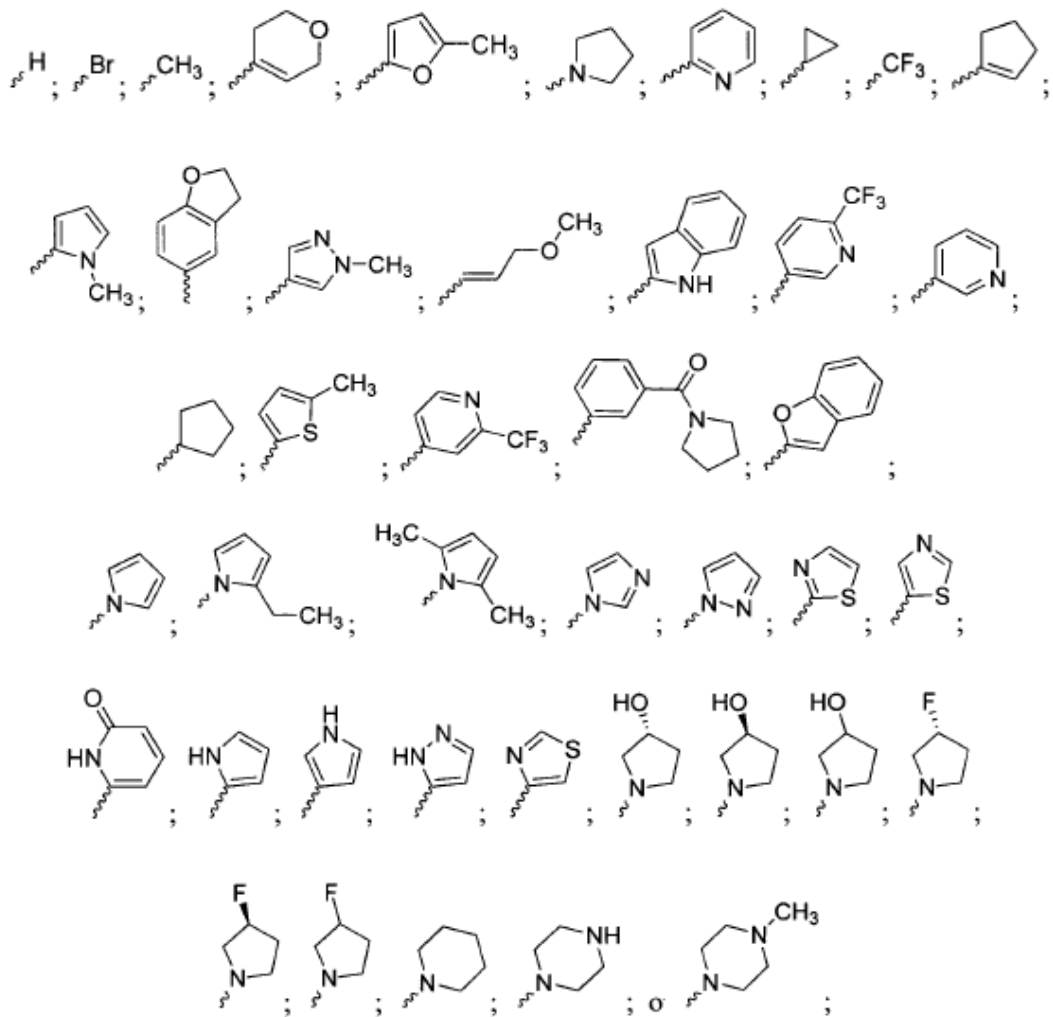


Fórmula XIII

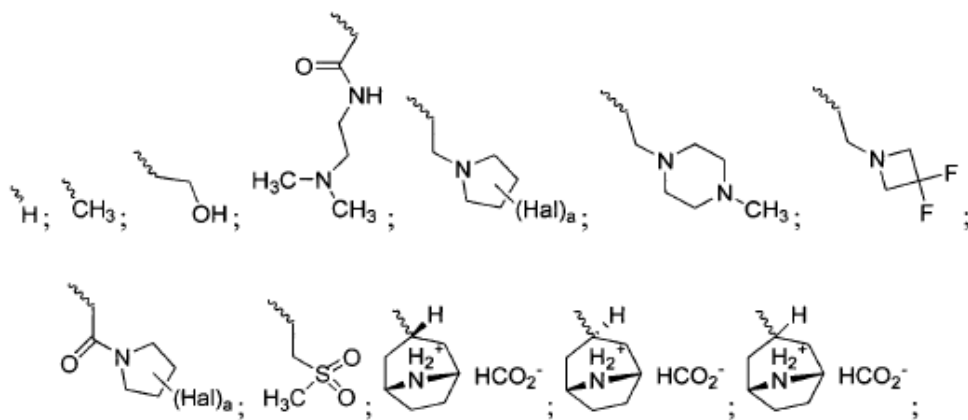
10

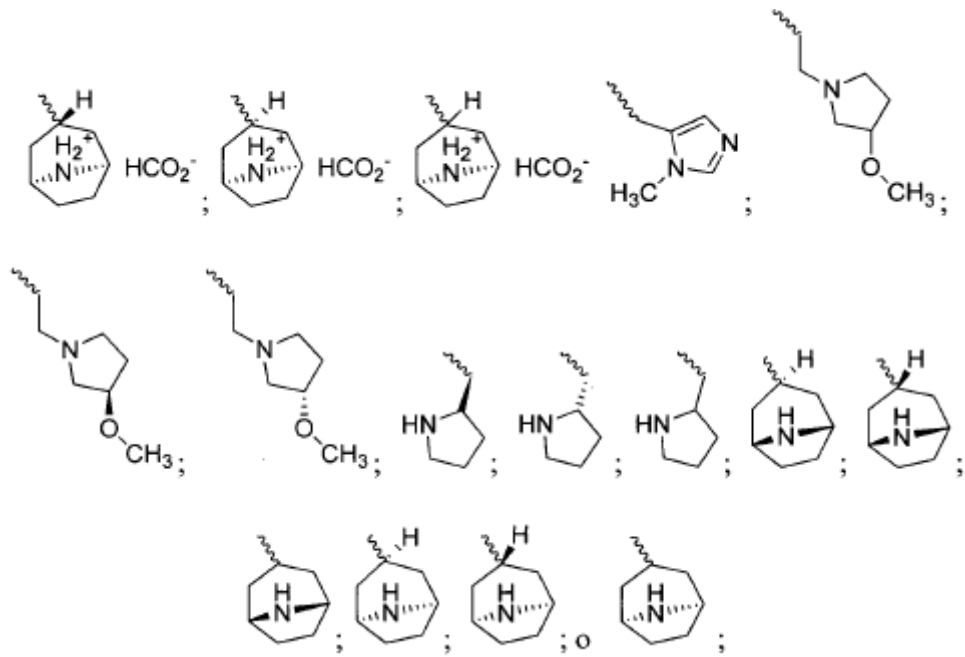
y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R₅ es:



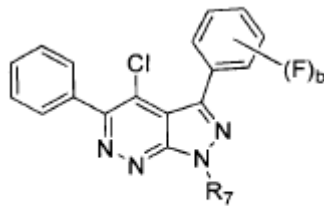
R₆ es:





y a es 0, 1, o 2.

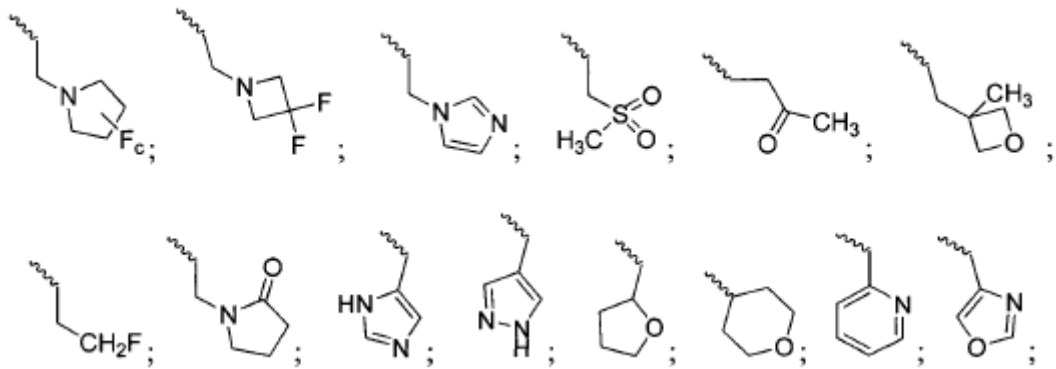
La invención también proporciona los compuestos de fórmula XIV:

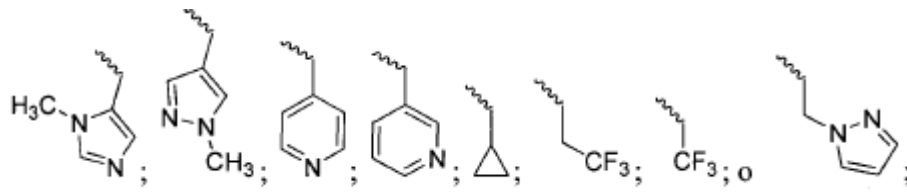


Fórmula XIV

5 y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R_7 es:

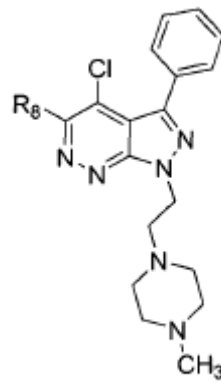




b es 0 o 1; y

c es 1 o 2.

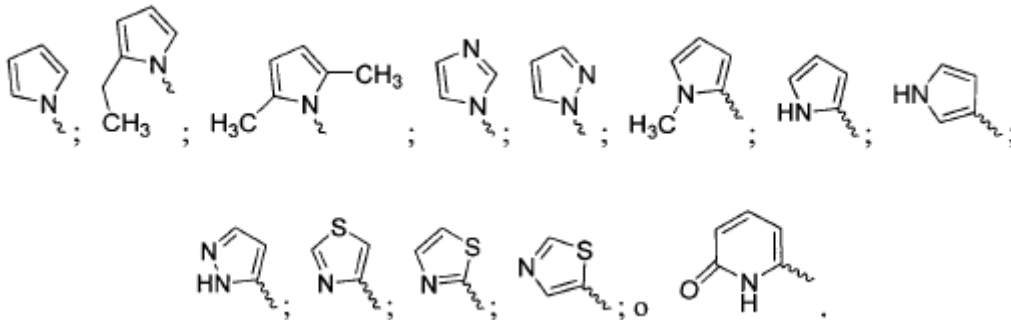
Se describen los compuestos de fórmula XV:



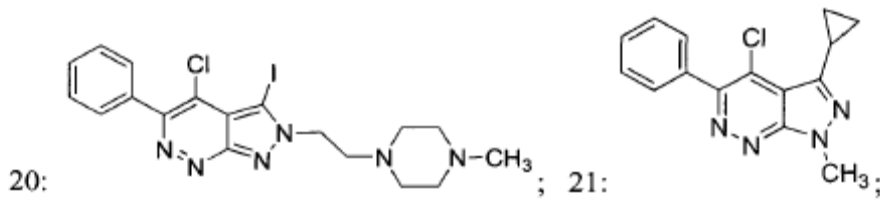
Fórmula XV

5

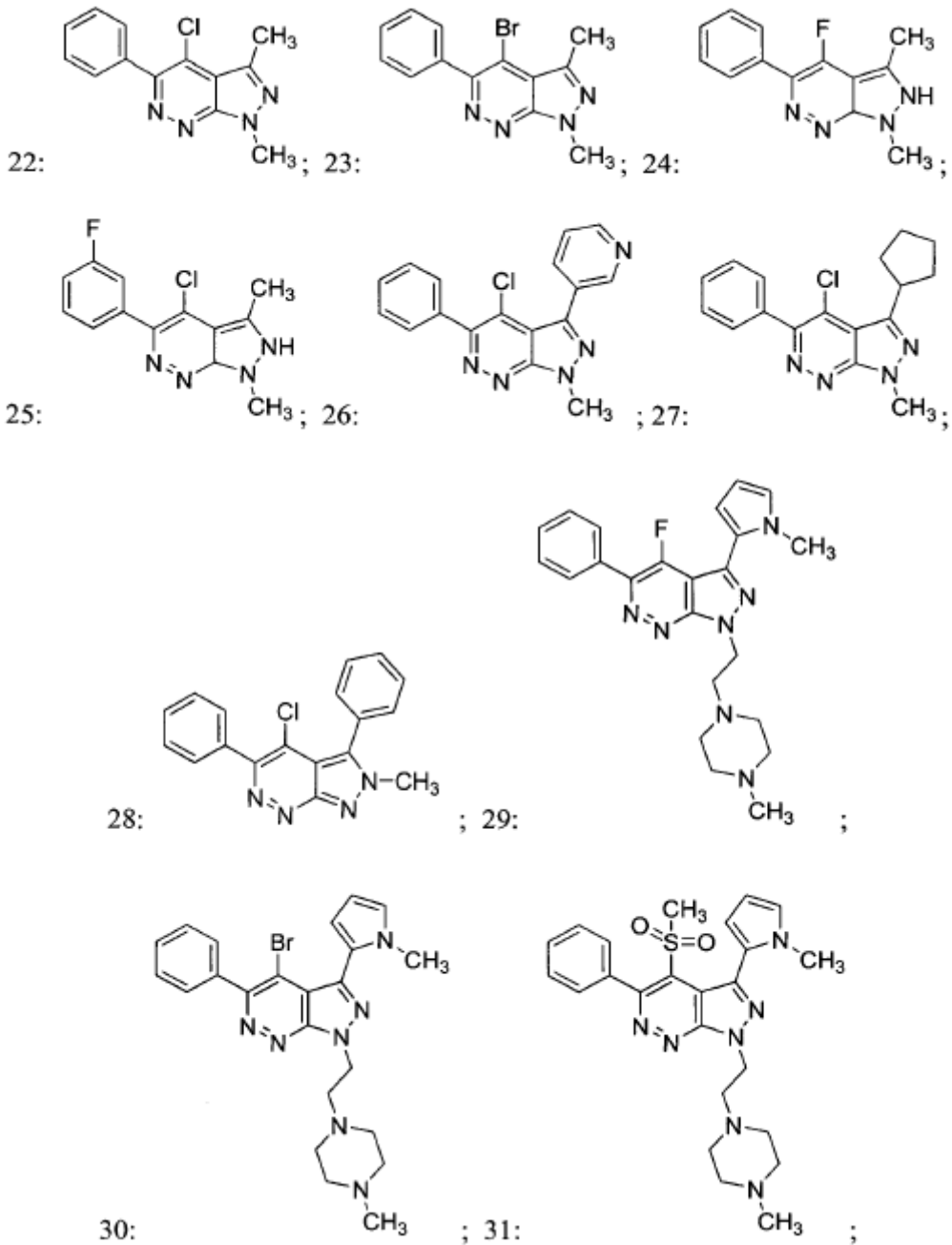
y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que R₈ es:



Se describen los siguientes compuestos de pirazolopiridazina. Por consiguiente, los compuestos 22 y 23 son compuestos de la presente invención.



10



y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 Un compuesto de fórmula I, II, III, XIII o XIV, compuesto 20-30 o 31, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, (un "Compuesto de pirazolopiridazina" o un "compuesto de la invención") es útil para tratar una enfermedad degenerativa de la retina o la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher.

10 La invención proporciona además composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de pirazolopiridazina y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, como se comprende por la presente invención. Las composiciones son útiles para tratar una enfermedad degenerativa de la retina o una pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher.

La invención proporciona además un compuesto de pirazolopiridazina como se comprende por la presente invención para uso en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa retinal, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de pirazolopiridazina.

- 5 La invención proporciona además un compuesto de pirazolopiridazina como se comprende por la presente invención para uso en un método de tratamiento de la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de pirazolopiridazina.

Breve descripción de la figura

La figura 1 ilustra la densidad de la expresión de N48K Clarin-1 en células.

Descripción detallada de la invención

- 10 La invención proporciona los compuestos de la invención, composiciones que comprenden un compuesto de la invención, y un compuesto de pirazolopiridazina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se comprende por la presente invención para uso en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina o pérdida de audición asociada con síndrome de Usher, que comprende administrar el compuesto de pirazolopiridazina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 Compuestos de la invención

La palabra "aproximadamente" cuando inmediatamente precede un valor numérico significa un intervalo de más o menos 10% de ese valor, por ejemplo, "aproximadamente 100 mg" significa 90 mg a 110 mg, "aproximadamente 300 mg" significa 270 mg a 330 mg, etc.

Abreviaturas:

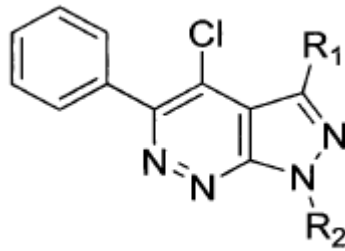
- | | | |
|----|------------|--|
| 20 | APCI | Ionización química a presión atmosférica |
| | DAPI | 4', 6-diamidino-2-fenilindol |
| | DIPEA | Diisopropiletilamina |
| | DMEM | Medio Eagle modificado de Dulbecco |
| | DMF | Dimetilformamida |
| 25 | DMSO | Dimetilsulfóxido |
| | EDAC | 1- (3-dimetilaminopropil) -3-etilcarbodiimida clorhidrato |
| | ESI | Ionización por electroaspersión |
| | ESI-TOF | Ionización por electroaspersión en "Tiempo de Vuelo". |
| | HATU | 2- (7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato |
| 30 | HOPO | 2-hidroxipiridina-N-óxido |
| | HPLC | Cromatografía líquida de alto rendimiento |
| | LCMS | Cromatografía líquida-espectrometría de masas |
| | LDA | Diisopropil amida de litio |
| | m/z | Relación masa a carga |
| 35 | MALDI-TOF: | Ionización por desorción láser asistida por matriz tiempo de vuelo |
| | MS | Espectrometría de masas |
| | PBS | Solución salina regulada con fosfato |
| | Rt | Tiempo de retención |

SDS Dodecilsulfato de sodio

THF Tetrahidrofurano

Compuestos de fórmula I

En una realización, el compuesto de pirazolopiridazina es un compuesto de fórmula I:

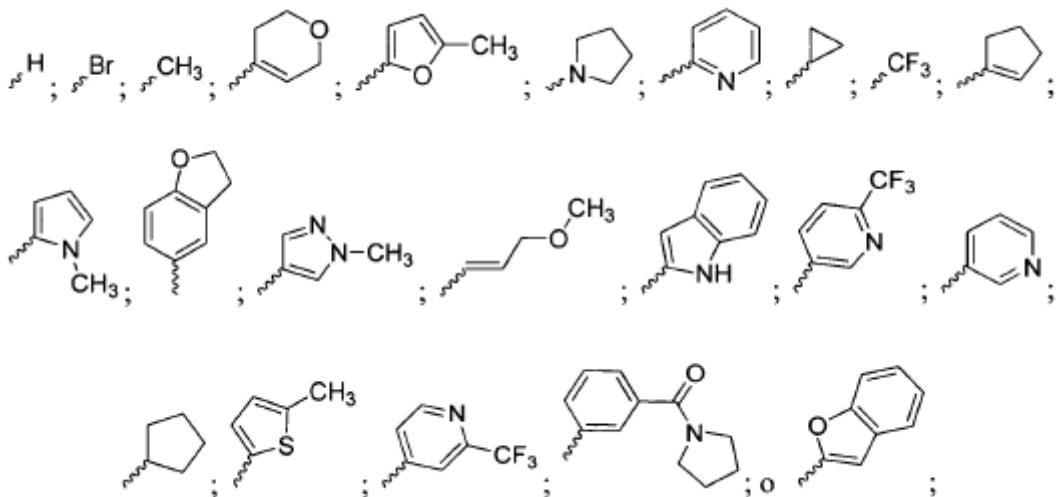


Fórmula I

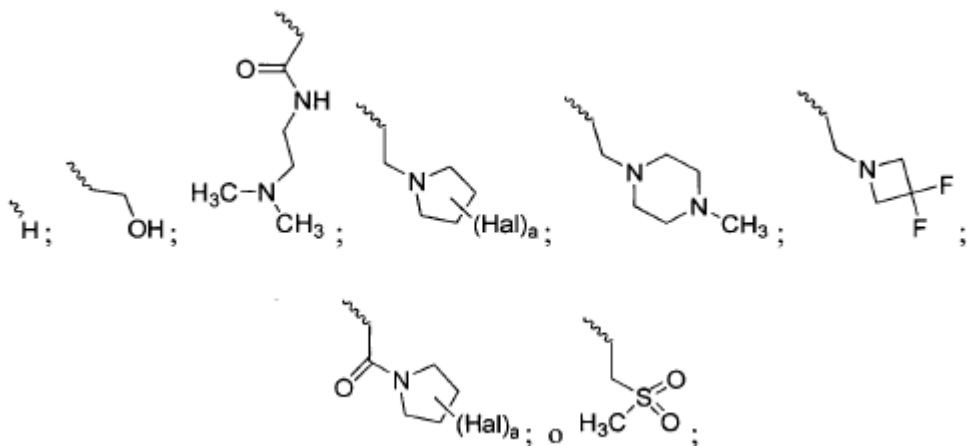
5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que R₁ es:



R₂ es:

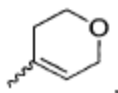


y a es 0, 1, o 2.

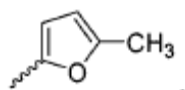
Se describen los compuestos en los que R_1 es -I. En realizaciones particulares, R_1 es -H. En otras realizaciones, R_1 es - CH_3 . En determinadas realizaciones, R_1 es - CF_3 .

En otras realizaciones más, R_1 es

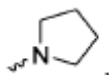
5



En determinadas realizaciones, R_1 es

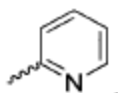


En aún otras realizaciones, R_1 es



10

En realizaciones particulares, R_1 es

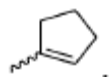


En otras realizaciones, R_1 es

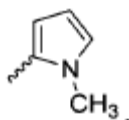


En otras realizaciones más, R_1 es

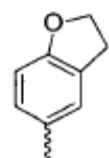
15



En determinadas realizaciones, R_1 es

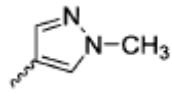


En realizaciones particulares, R_1 es

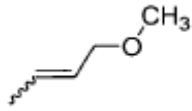


20

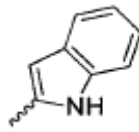
En determinadas realizaciones, R_1 es



En aún otras realizaciones, R₁ es

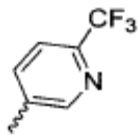


En otras realizaciones, R₁ es

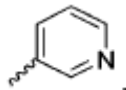


5

En otras realizaciones más, R₁ es



En determinadas realizaciones, R₁ es

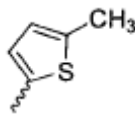


10

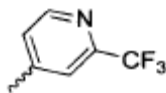
En aún otras realizaciones, R₁ es



En otras realizaciones, R₁ es

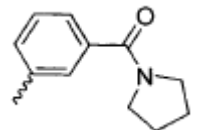


En realizaciones particulares, R₁ es

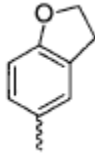


15

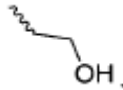
En realizaciones adicionales, R₁ es



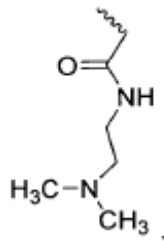
En aún otras realizaciones, R₁ es



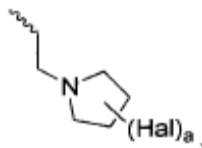
En determinadas realizaciones, R₂ es -H. En otras realizaciones más, R₂ es



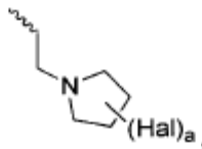
5 En realizaciones particulares, R₂ es



En otras realizaciones más, R₂ es



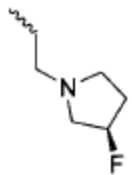
En realizaciones adicionales, R₂ es



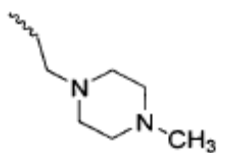
10

a = 1, y Hal es -F.

En determinadas realizaciones, R₂ es



En aún otras realizaciones, R₂ es

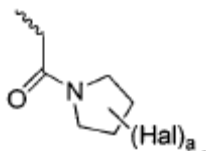


15

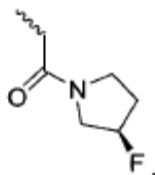
En realizaciones particulares, R₂ es



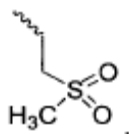
En otras realizaciones, R₂ es



5 En otras realizaciones más, R₂ es

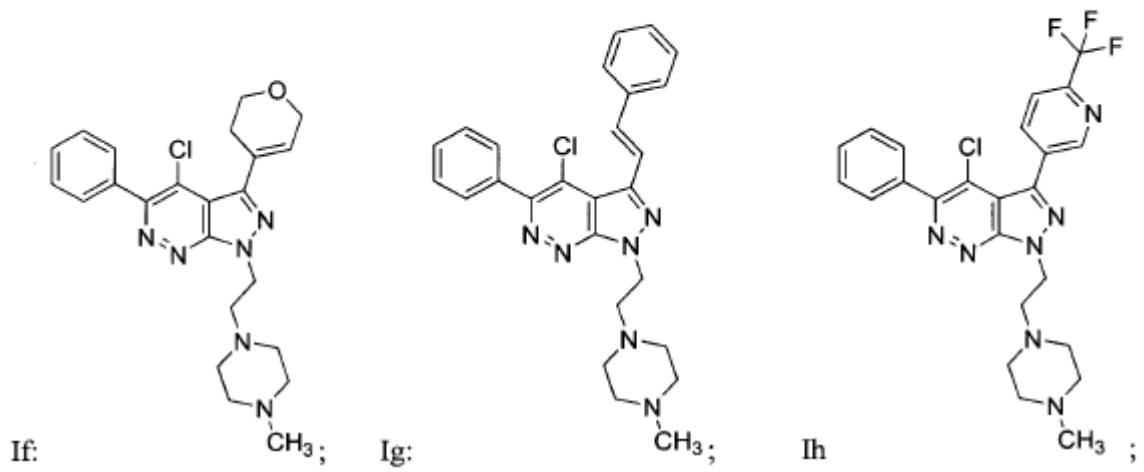
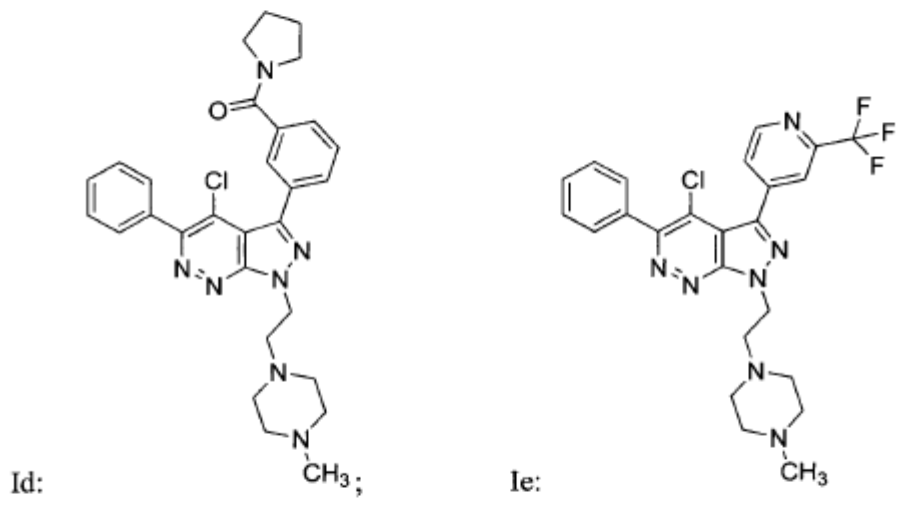
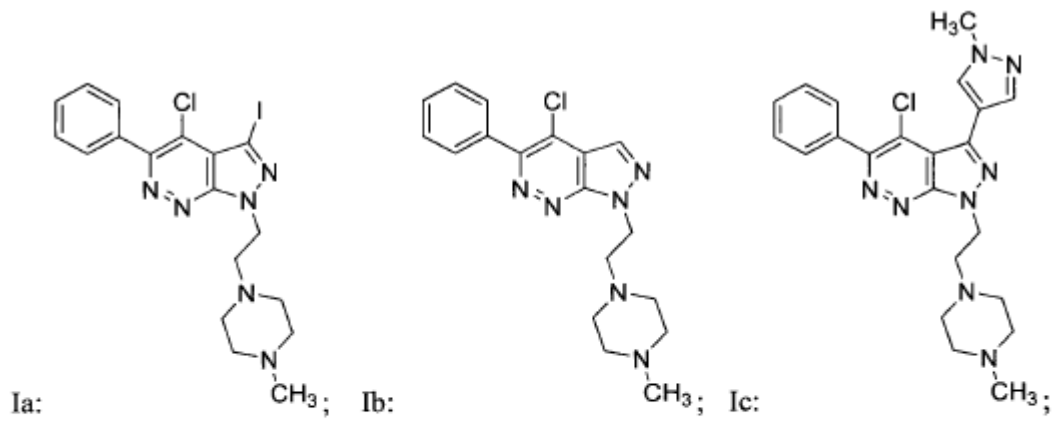


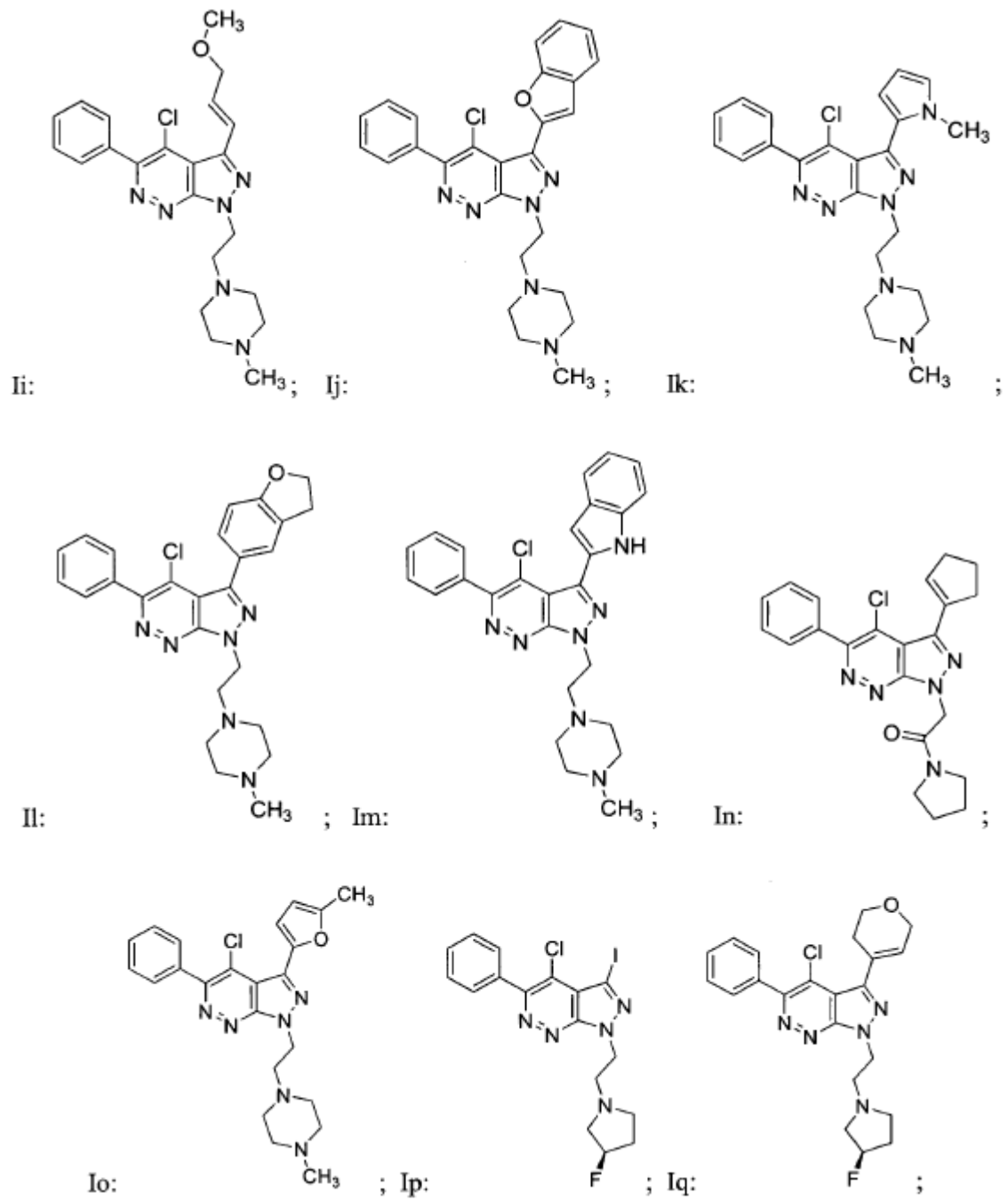
En determinadas realizaciones, R₂ es

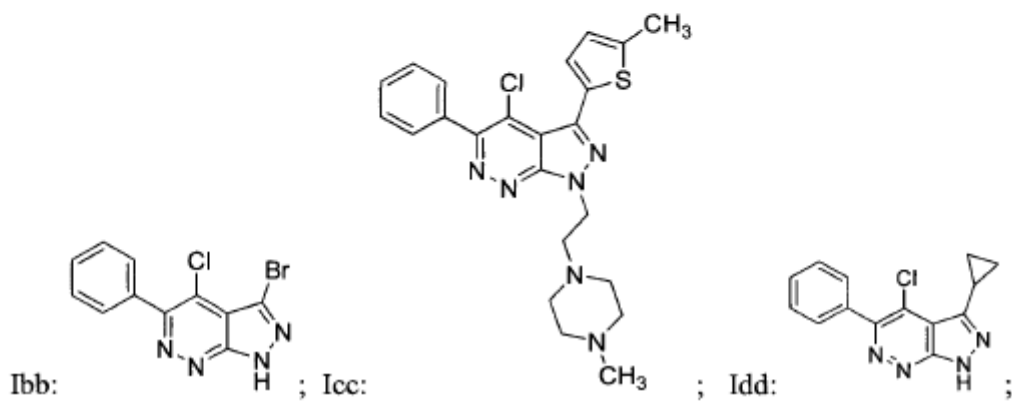
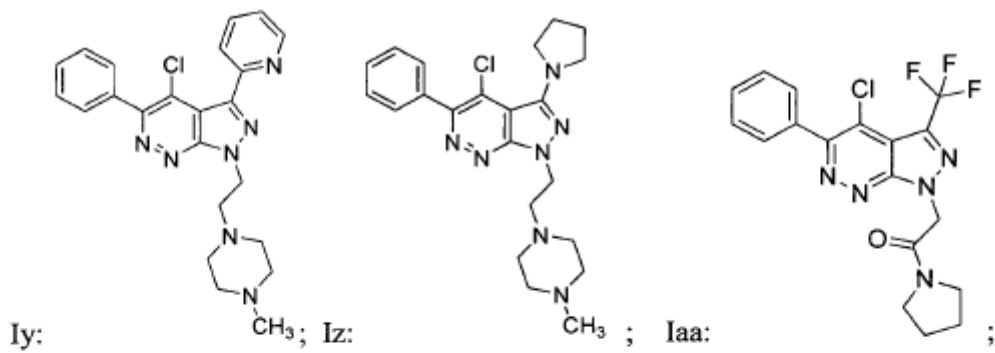
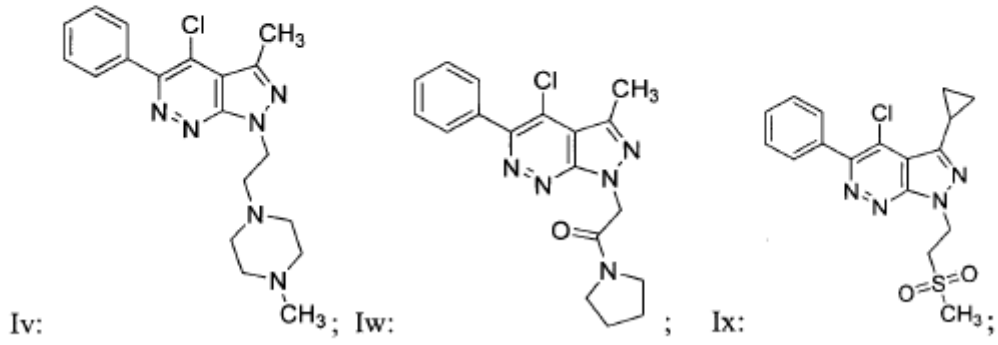
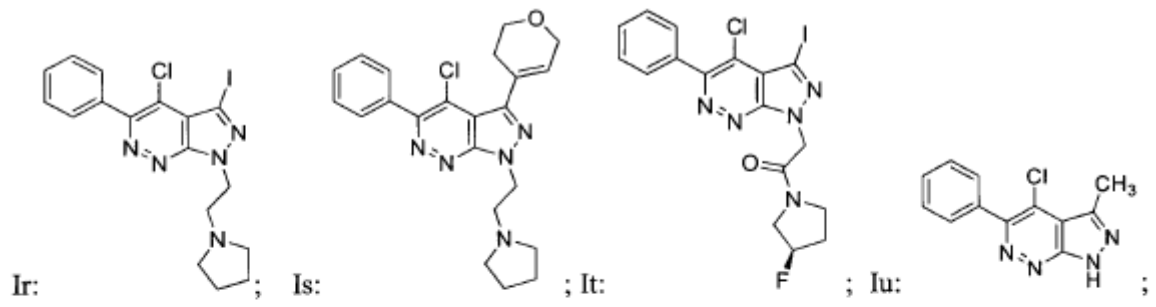


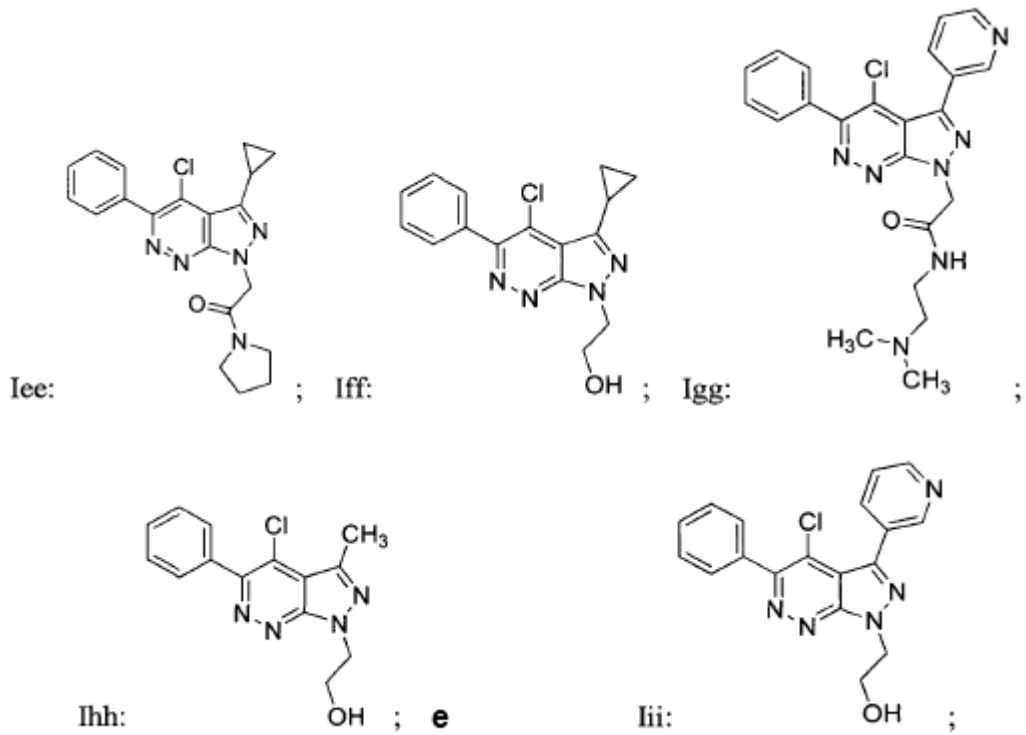
En realizaciones adicionales, cuando a es 2, cada Hal es igual o diferente.

10 Los compuestos ilustrativos de fórmula I son, por lo que los compuestos de fórmula Ia, Ip, Ir, y It no están según la invención y son compuestos de referencia:





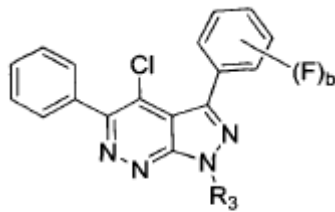




y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Compuestos de fórmula II

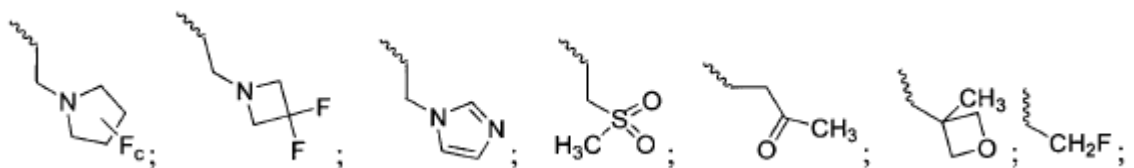
- 5 La invención también proporciona los compuestos de fórmula II:

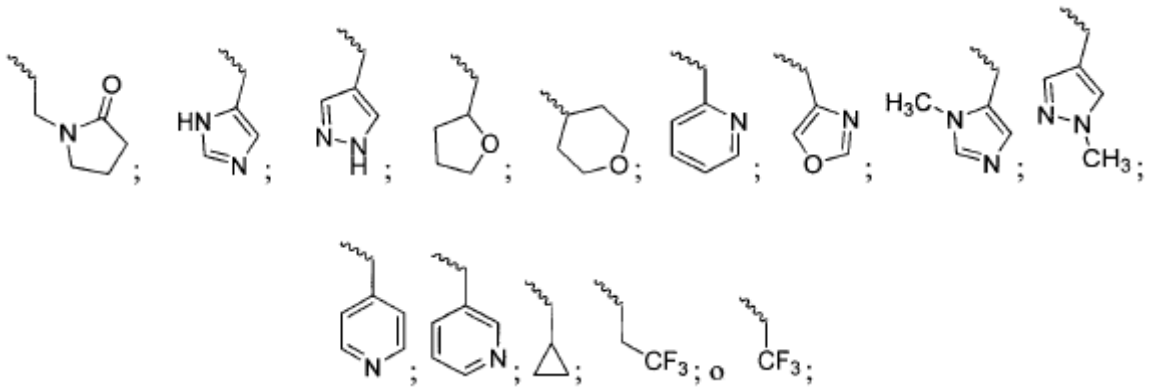


Fórmula II

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R₃ es:





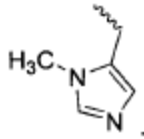
y

b es 0 o 1; y

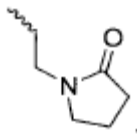
c es 1 o 2.

- 5 En realizaciones particulares, b es 0. En otras realizaciones, b es 1 y el -F está en la posición meta con respecto al sistema de anillo de pirazolopiridazino. En otras realizaciones más b es 1 y el -F está en la posición para con respecto al sistema de anillo de pirazolopiridazino.

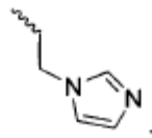
En realizaciones particulares R_3 es $-CF_3$. En determinadas realizaciones R_3 es



- 10 En otras realizaciones R_3 es

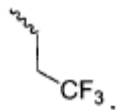


En otras realizaciones más R_3 es

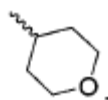


En realizaciones adicionales R_3 es

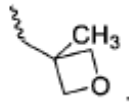
- 15



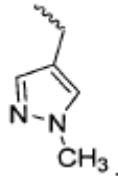
En aún otras realizaciones R_3 es



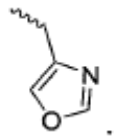
En realizaciones particulares R_3 es



En otras realizaciones R₃ es



En otras realizaciones más R₃ es

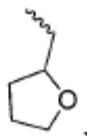


5

En determinadas realizaciones R₃ es

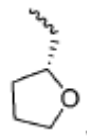


En realizaciones adicionales R₃ es

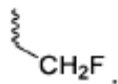


10

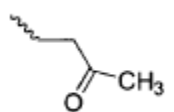
En realizaciones adicionales R₃ es



En determinadas realizaciones R₃ es

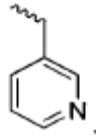


En otras realizaciones R₃ es

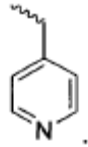


15

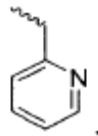
En otras realizaciones más R₃ es



En realizaciones adicionales R₃ es

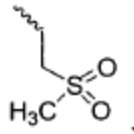


En aún otras realizaciones R₃ es

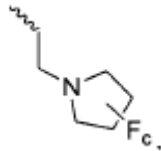


5

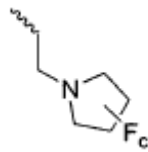
En realizaciones particulares R₃ es



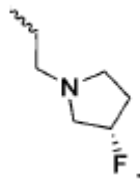
En determinadas realizaciones R₃ es



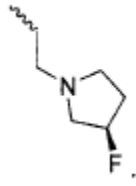
10 En realizaciones adicionales R₃ es



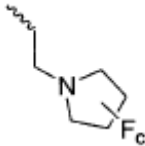
y c = 1. En aún otras realizaciones R₃ es



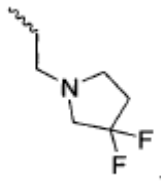
En realizaciones particulares R₃ es



En otras realizaciones R_3 es



y $c = 2$. En otras realizaciones más R_3 es

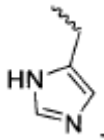


5

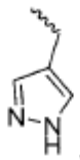
En determinadas realizaciones R_3 es



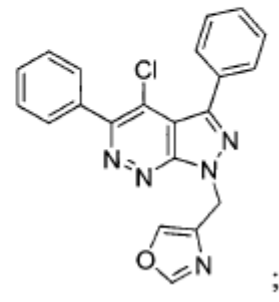
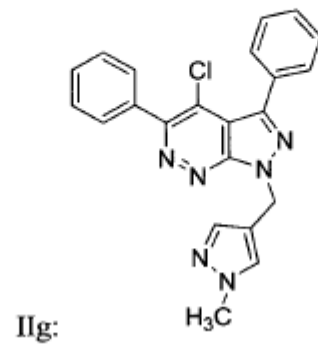
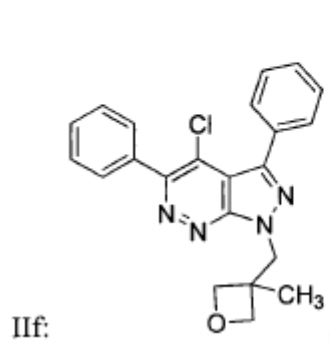
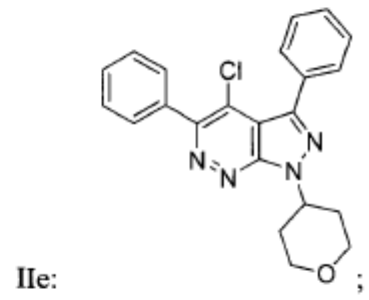
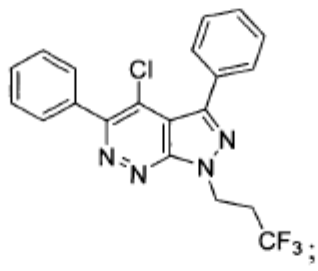
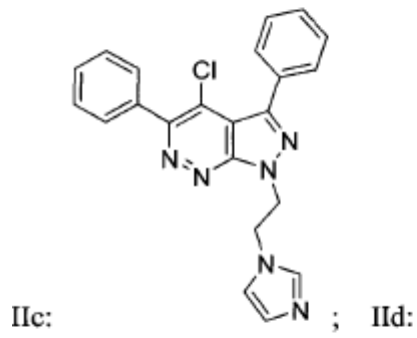
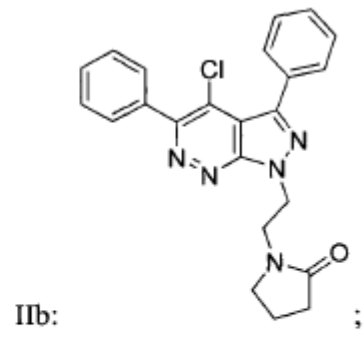
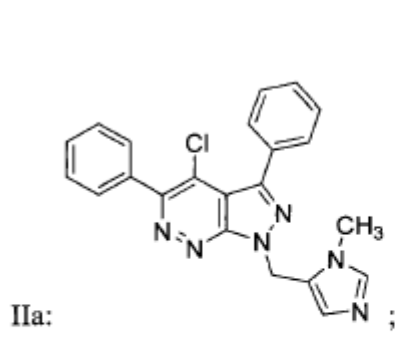
En otras realizaciones R_3 es

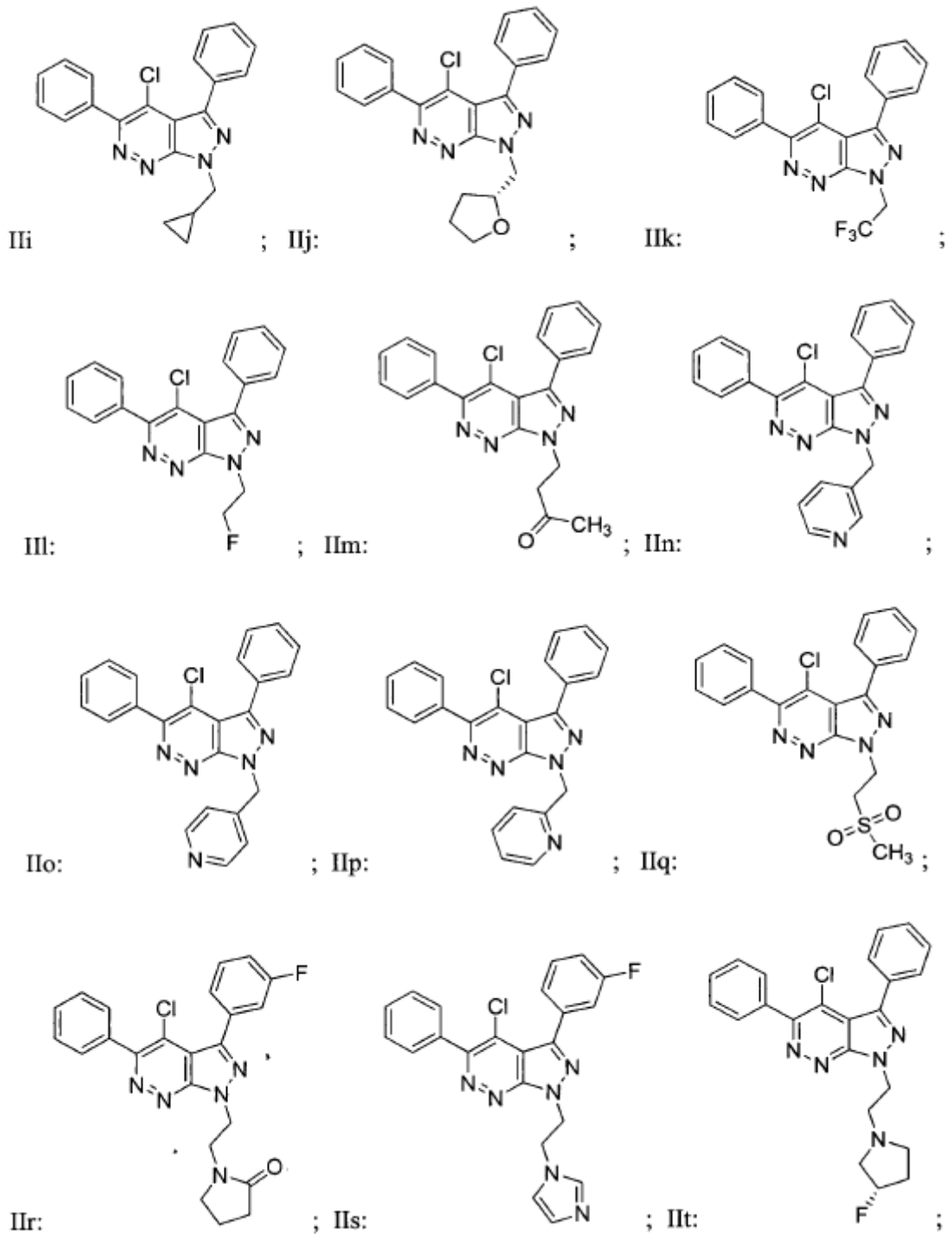


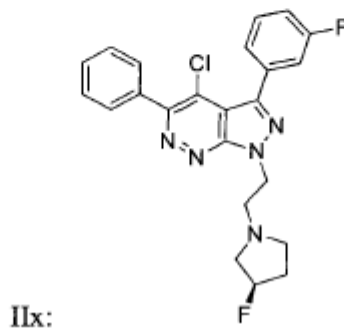
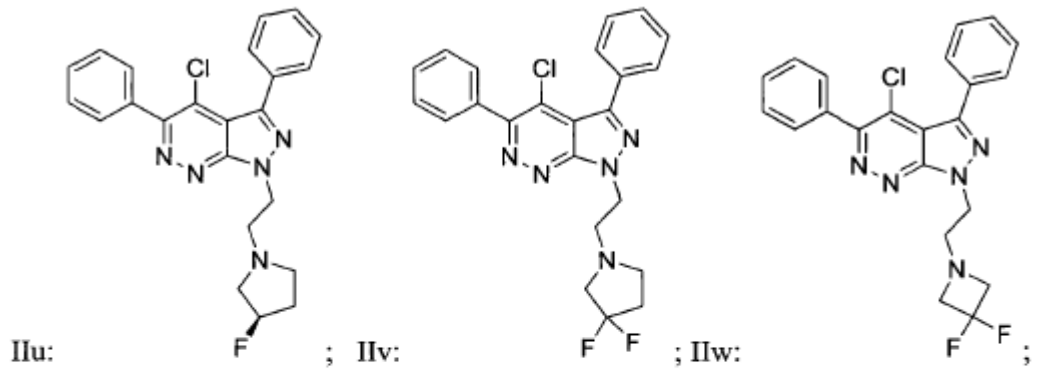
10 En otras realizaciones más R_3 es



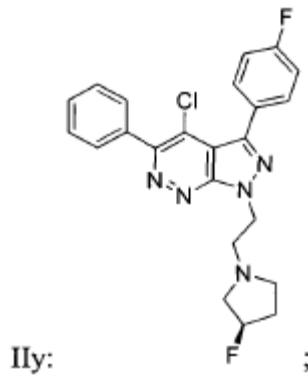
Los compuestos ilustrativos de fórmula II son:







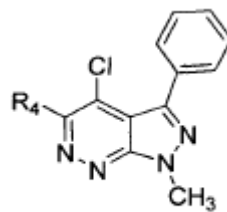
y;



5 y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

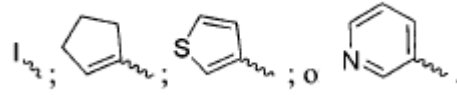
Compuestos de fórmula III

Se describen los compuestos de fórmula III:



Fórmula III

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,
 en la que R₄ es

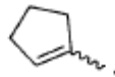


R₄ puede ser

5



R₄ puede ser

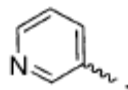


R₄ puede ser

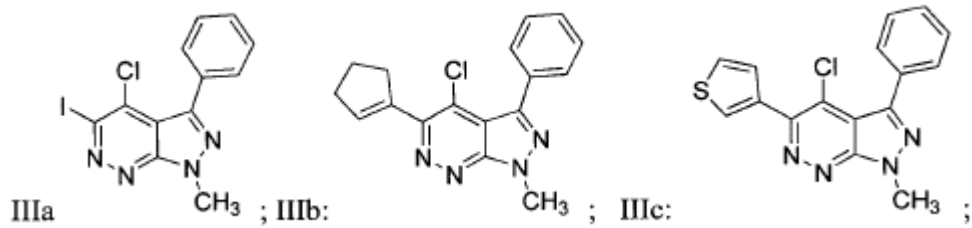


10

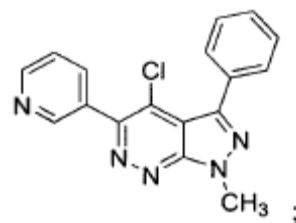
R₄ puede ser



Los compuestos de fórmula III pueden ser:



y III d:

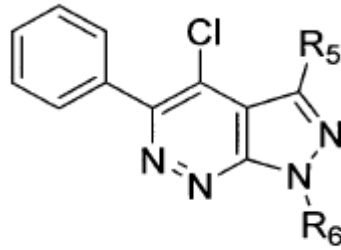


15

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Compuestos de fórmula XIII

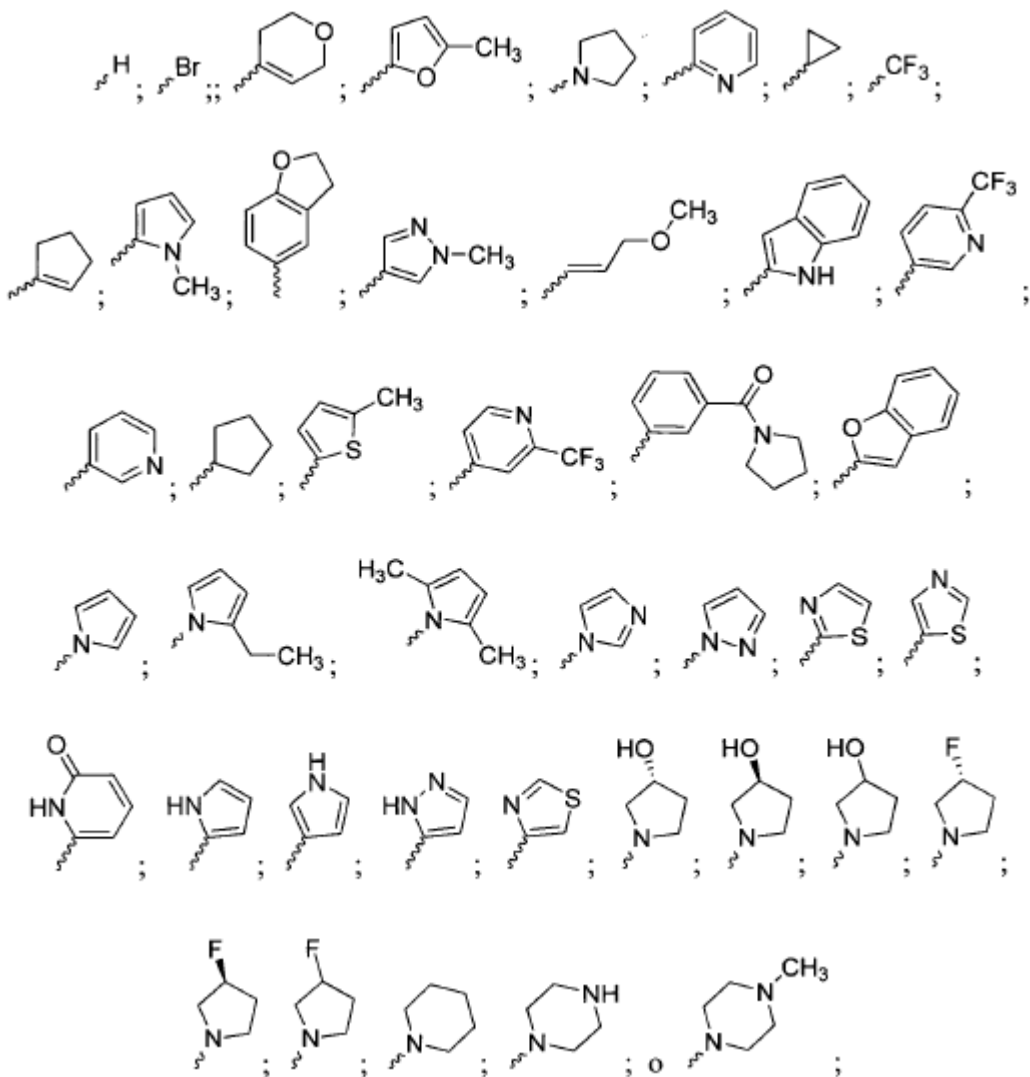
La invención proporciona los compuestos de fórmula XIII:



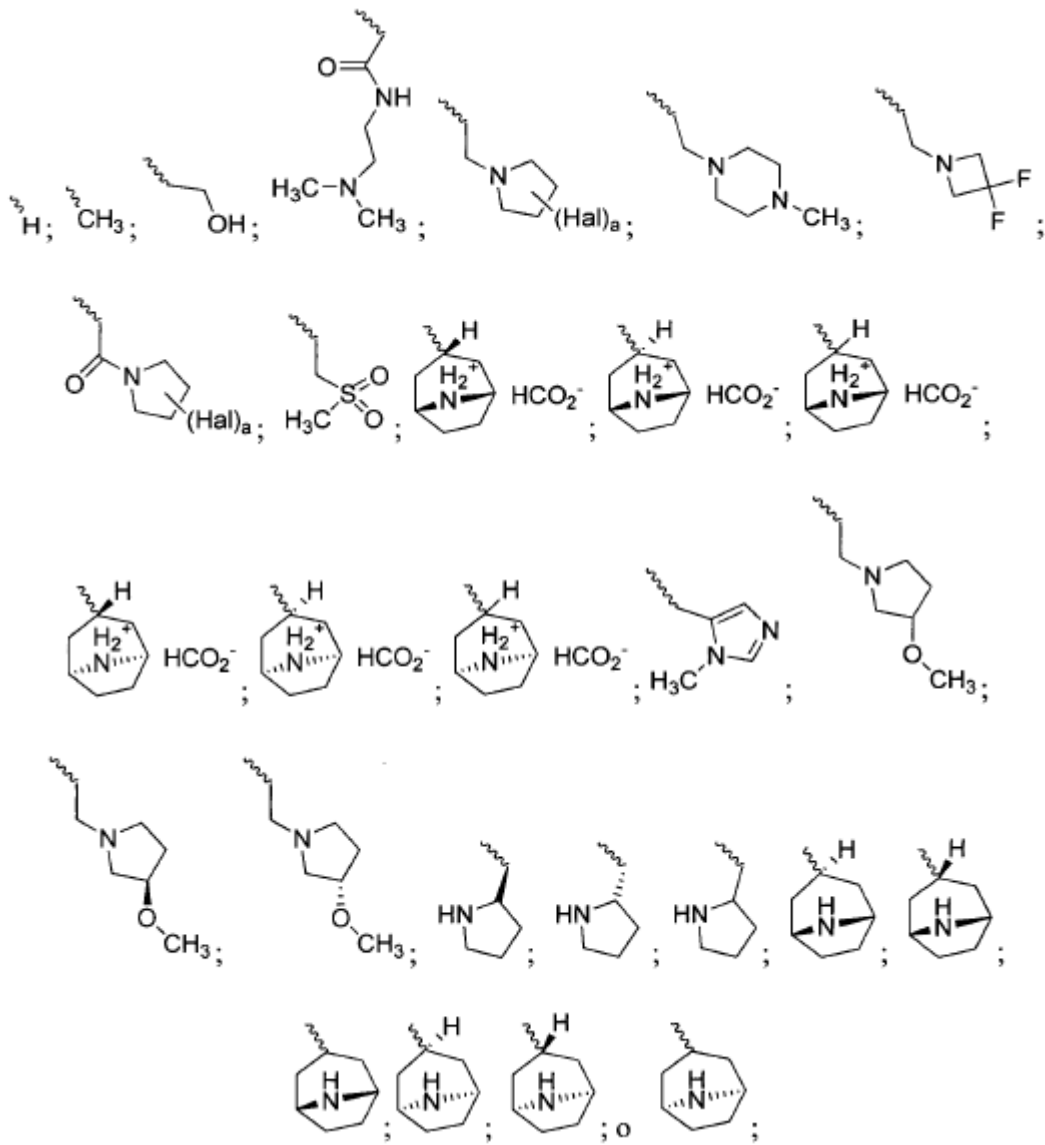
Fórmula XIII

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R₅ es:



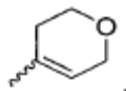
5 R₆ es:



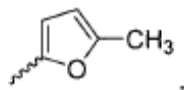
y a es 0, 1, o 2.

Se describen los compuestos, en los que R_5 es -H o CH_3 . En realizaciones particulares, R_5 es -H. En otras realizaciones, R_5 es $-CH_3$. En determinadas realizaciones, R_5 es $-CF_3$.

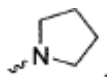
5 En otras realizaciones más, R_5 es



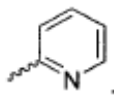
En determinadas realizaciones, R_5 es



En aún otras realizaciones, R_5 es



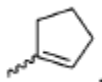
En realizaciones particulares, R₅ es



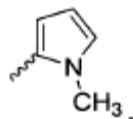
En otras realizaciones, R₅ es



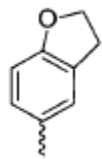
5 En otras realizaciones más, R₅ es



En determinadas realizaciones, R₅ es

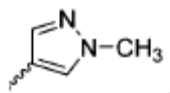


En realizaciones particulares, R₅ es

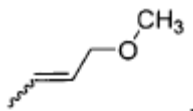


10

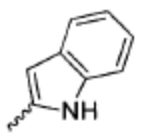
En determinadas realizaciones, R₅ es



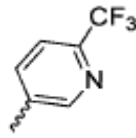
En aún otras realizaciones, R₅ es



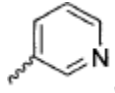
15 En otras realizaciones, R₅ es



En otras realizaciones más, R₅ es



En determinadas realizaciones, R₅ es

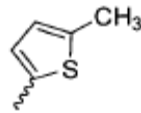


En aún otras realizaciones, R₅ es

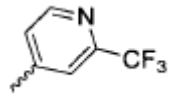
5



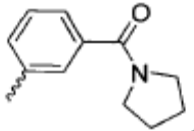
En otras realizaciones, R₅ es



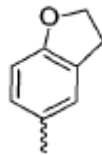
En realizaciones particulares, R₅ es



10 En realizaciones adicionales, R₅ es

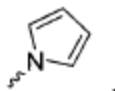


En aún otras realizaciones, R₅ es

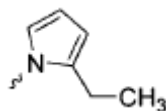


En determinadas realizaciones, R₅ es

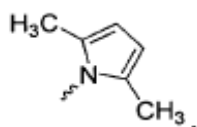
15



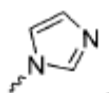
En realizaciones adicionales, R₅ es



En realizaciones adicionales, R₅ es



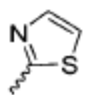
En otras realizaciones, R₅ es



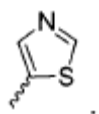
5 En otras realizaciones más, R₅ es



En realizaciones particulares, R₅ es

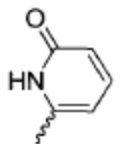


En realizaciones adicionales, R₅ es

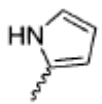


10

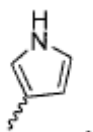
En aún otras realizaciones, R₅ es



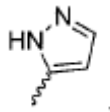
En determinadas realizaciones, R₅ es



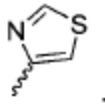
15 En otras realizaciones, R₅ es



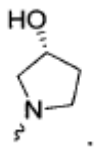
En otras realizaciones más, R₅ es



En realizaciones particulares, R₅ es

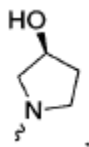


En realizaciones adicionales, R₅ es

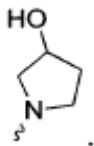


5

En aún otras realizaciones, R₅ es

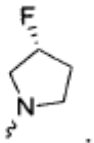


En determinadas realizaciones, R₅ es

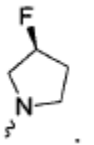


10

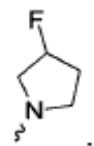
En otras realizaciones, R₅ es



En otras realizaciones más, R₅ es

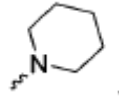


En realizaciones particulares, R₅ es

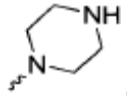


15

En realizaciones adicionales, R₅ es

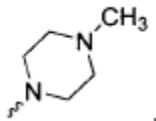


En aún otras realizaciones, R₅ es



En determinadas realizaciones, R₅ es

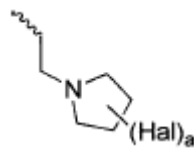
5



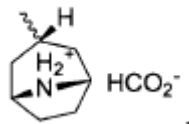
En determinadas realizaciones, R₆ es



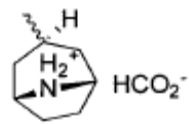
En realizaciones adicionales, R₆ es



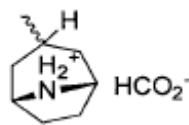
10 y a = 0. En otras realizaciones, R₆ es



En otras realizaciones más, R₆ es

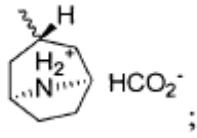


En realizaciones particulares, R₆ es

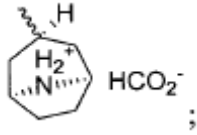


15

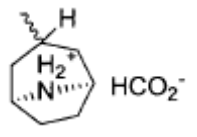
En determinadas realizaciones, R₆ es



En realizaciones adicionales, R₆ es

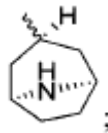


En otras realizaciones, R₆ es

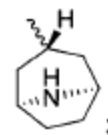


5

En determinadas realizaciones, R₆ es



En realizaciones adicionales, R₆ es

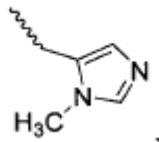


10

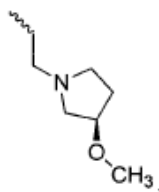
En realizaciones particulares, R₆ es



En realizaciones adicionales, R₆ es

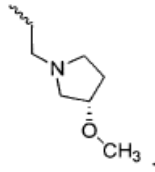


En aún otras realizaciones, R₆ es

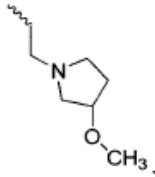


15

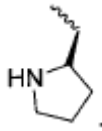
En otras realizaciones, R₆ es



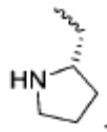
En determinadas realizaciones, R₆ es



5 En otras realizaciones más, R₆ es



En realizaciones particulares, R₆ es

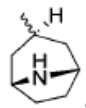


En realizaciones adicionales, R₆ es

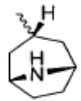


10

En aún otras realizaciones, R₆ es



En determinadas realizaciones, R₆ es

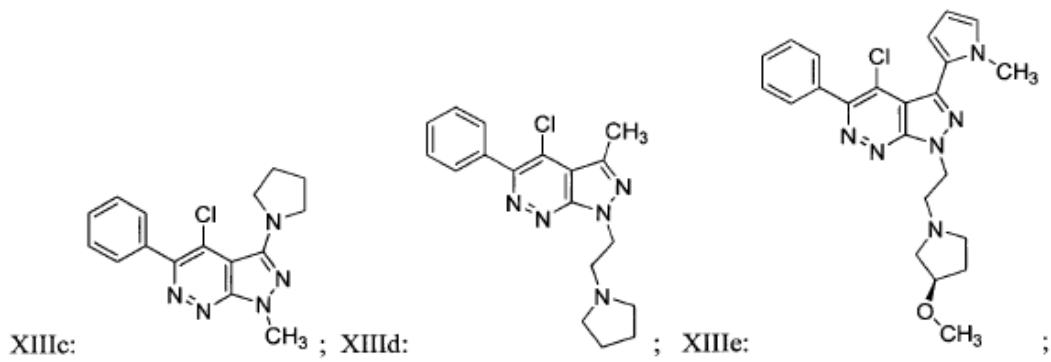
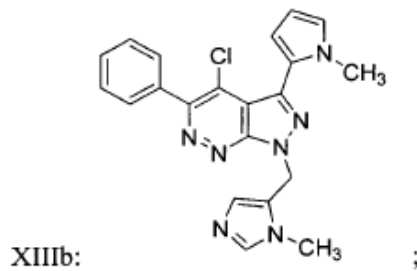
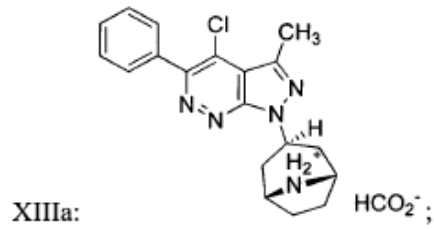


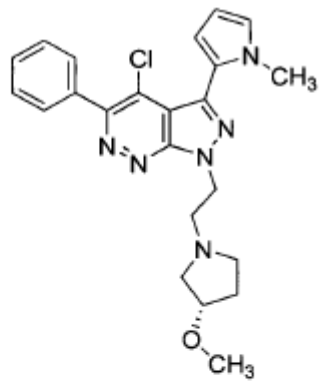
15 En otras realizaciones, R₆ es



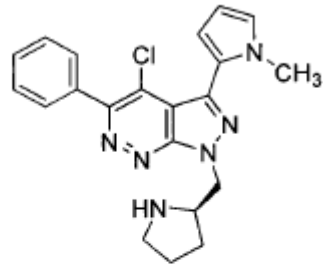
En realizaciones adicionales, cuando a es 2, cada Hal es igual o diferente.

Los compuestos de fórmula XIII son ilustrativos, por lo que los compuestos de fórmula XIIIa y XIIId no están según la invención y son compuestos de referencia:

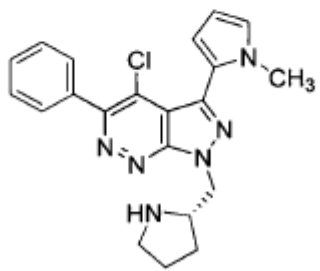




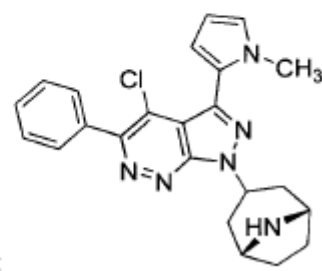
XIII f:



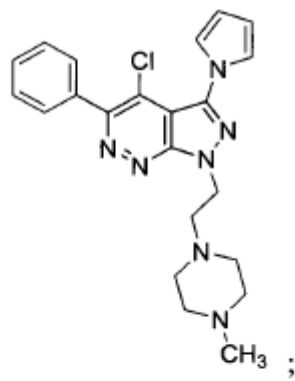
XIII g:



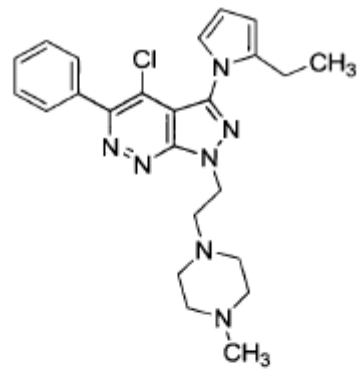
XIII h:



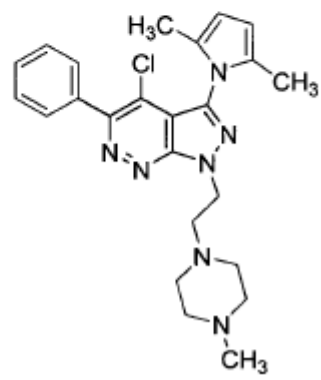
XIII i:



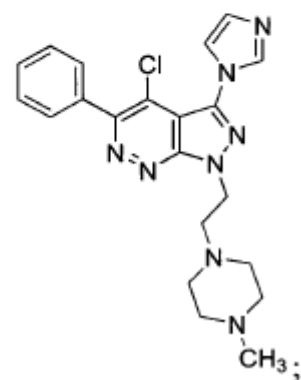
XIII j:



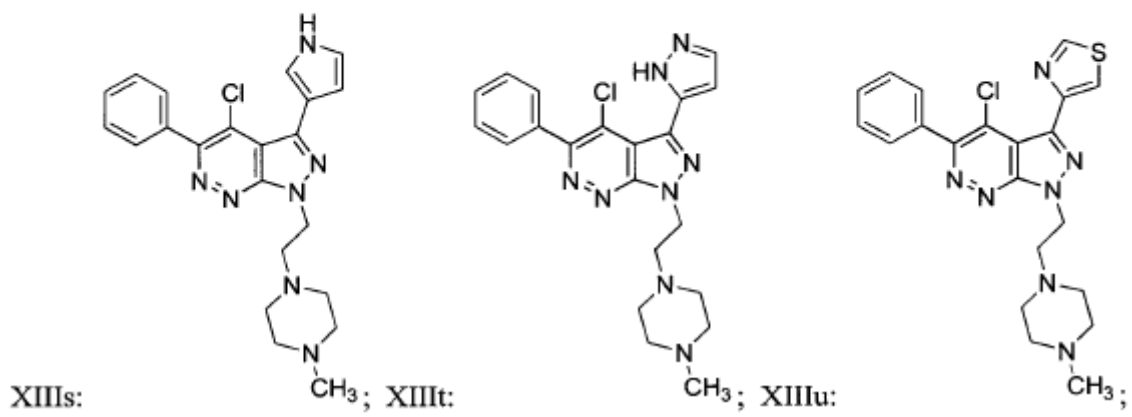
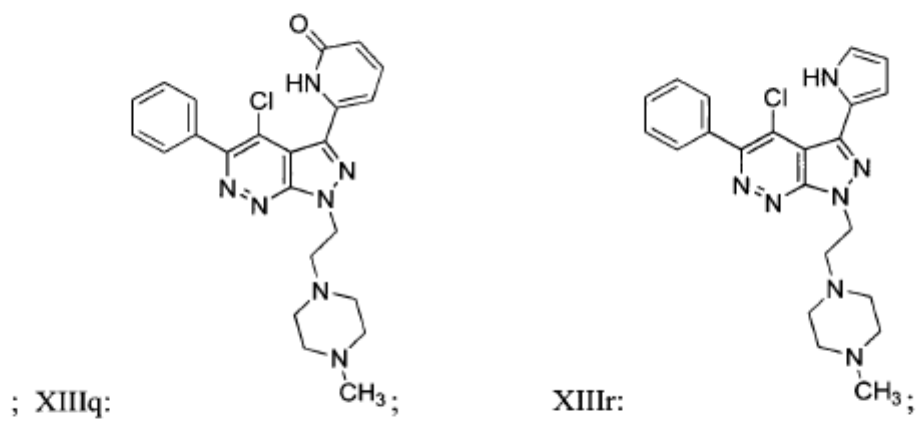
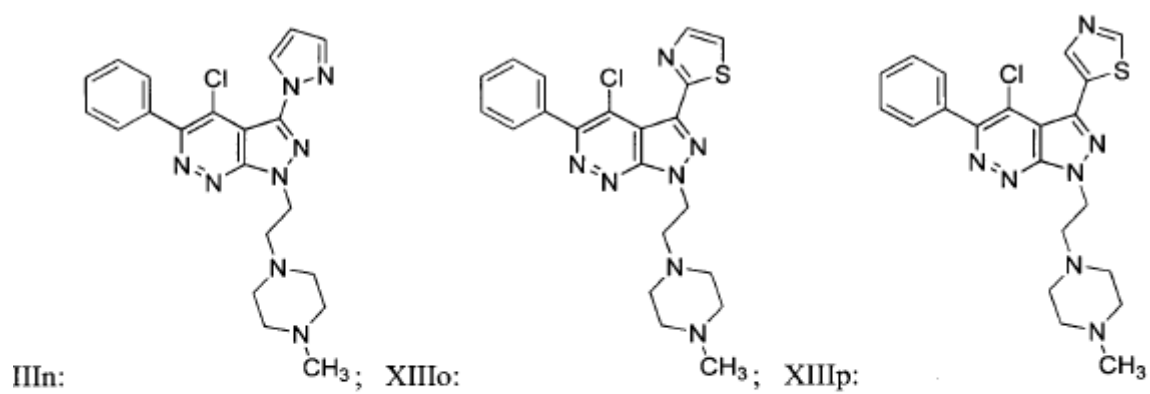
XIII k:

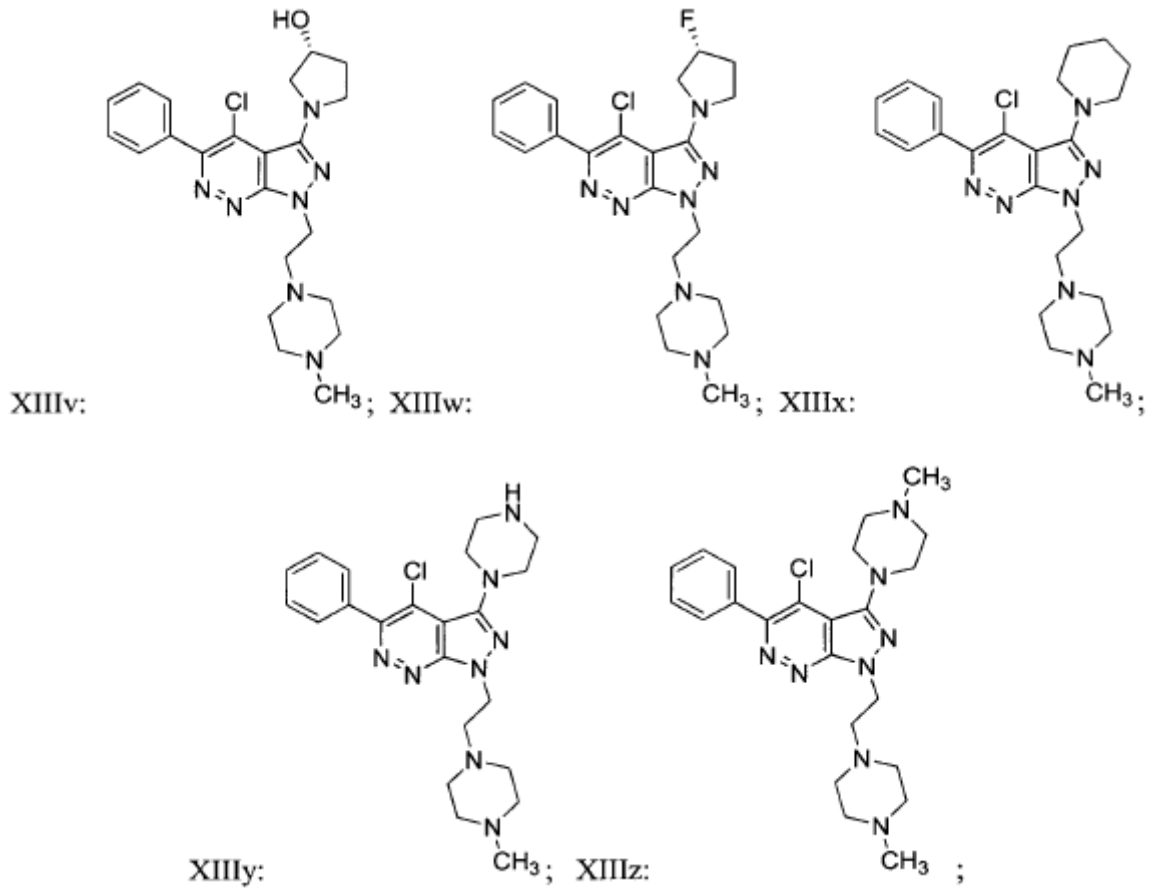


XIII l:



XIII m:

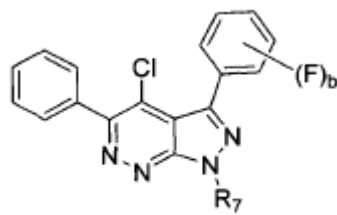




y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Compuestos de fórmula XIV

La invención también proporciona los compuestos de fórmula XIV:

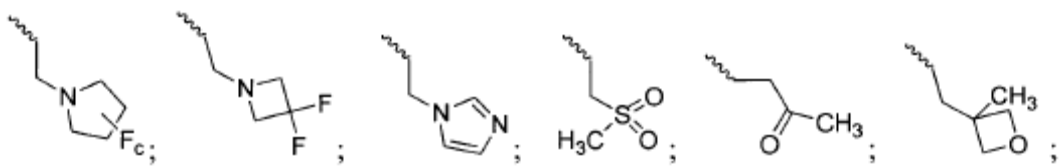


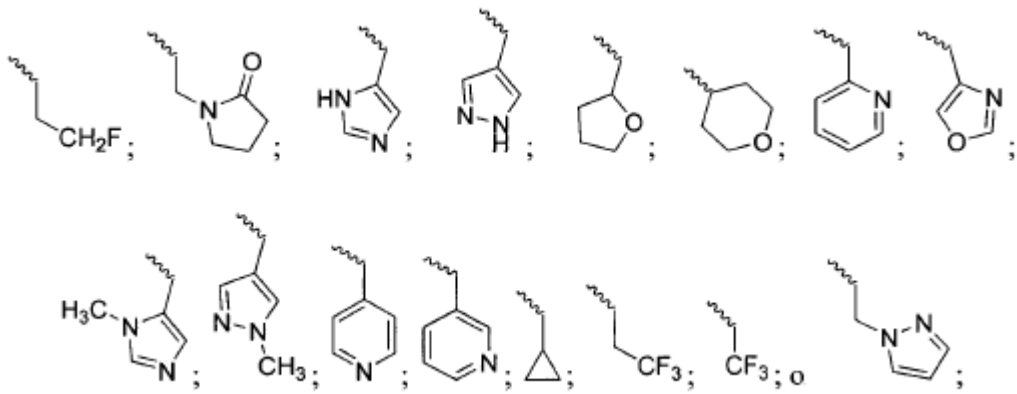
Fórmula XIV

5

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R₇ es:



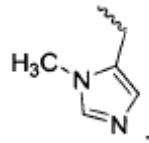


b es 0 o 1; y

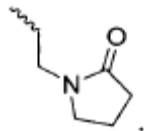
c es 1 o 2.

- 5 En realizaciones particulares, b es 0. En otras realizaciones b es 1 y el -F está en la posición meta con respecto al sistema de anillo de pirazolopiridazino. En otras realizaciones más b es 1 y el -F está en la posición para con respecto al sistema de anillo de pirazolopiridazino.

En realizaciones particulares R₇ es -CF₃. En determinadas realizaciones R₇ es

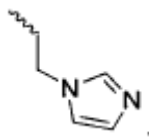


En otras realizaciones R₇ es

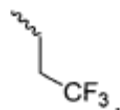


10

En otras realizaciones más R₇ es

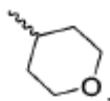


En realizaciones adicionales R₇ es

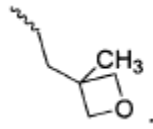


15

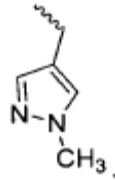
En aún otras realizaciones R₇ es



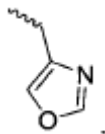
En realizaciones particulares R₇ es



En otras realizaciones R₇ es



En otras realizaciones más R₇ es

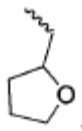


5

En determinadas realizaciones R₇ es

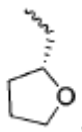


En realizaciones adicionales R₇ es

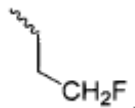


10

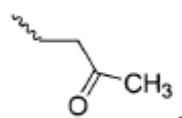
En realizaciones adicionales R₇ es



En determinadas realizaciones R₇ es

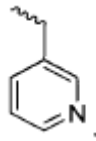


En otras realizaciones R₇ es

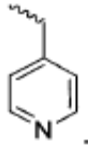


15

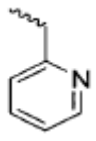
En otras realizaciones más R₇ es



En realizaciones adicionales R₇ es

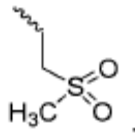


En aún otras realizaciones R₇ es

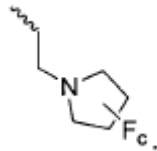


5

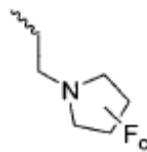
En realizaciones particulares R₇ es



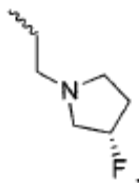
En determinadas realizaciones R₇ es



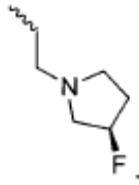
10 En realizaciones adicionales R₇ es



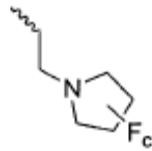
y c = 1. En aún otras realizaciones R₇ es



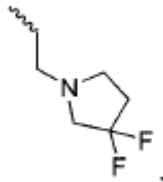
En realizaciones particulares R₇ es



En otras realizaciones R_7 es

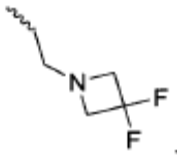


y $c = 2$. En otras realizaciones más R_7 es

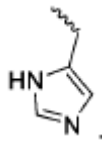


5

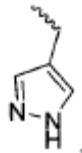
En determinadas realizaciones R_7 es



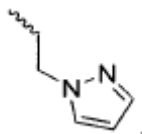
En otras realizaciones R_7 es



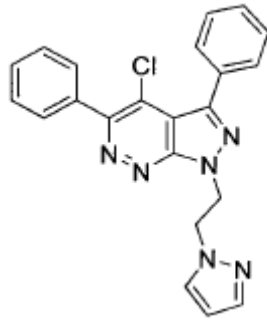
10 En otras realizaciones más R_7 es



En otras realizaciones más R_7 es



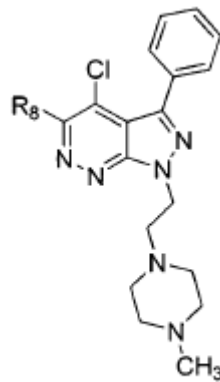
Un compuesto ilustrativo de fórmula XIV es: XIVa:



y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Compuestos de fórmula XV

Se describen los compuestos de fórmula XV:

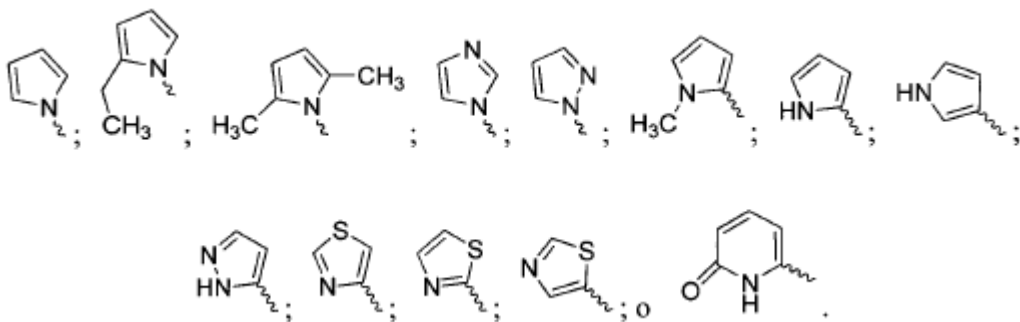


Fórmula XV

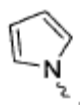
5

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en la que R₈ es:

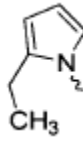


R₈ puede ser

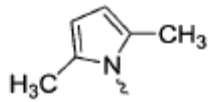


10

R₈ puede ser

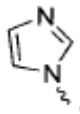


R₈ puede ser

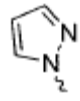


R₈ puede ser

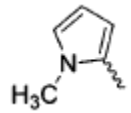
5



R₈ puede ser



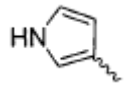
R₈ puede ser



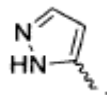
10 R₈ puede ser



R₈

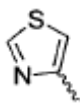


R₈ puede ser

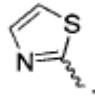


15

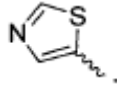
R₈ puede ser



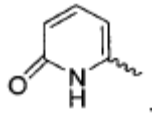
R₈ puede ser



R₈ puede ser

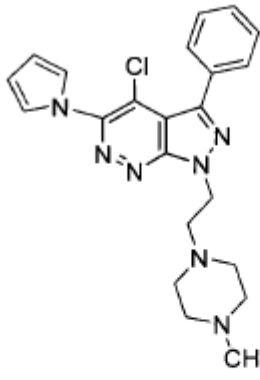


R₈ puede ser

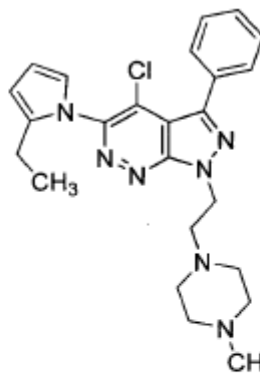


5

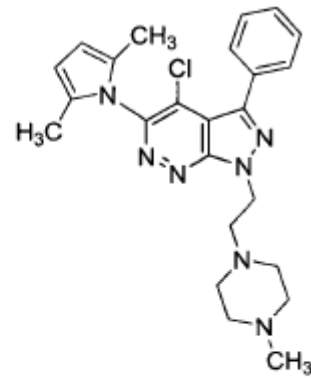
Los compuestos de fórmula XV pueden ser:



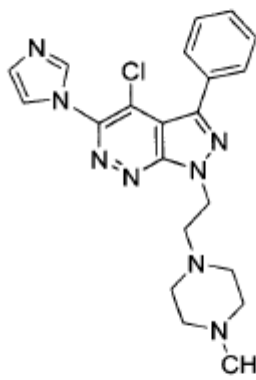
XVa:



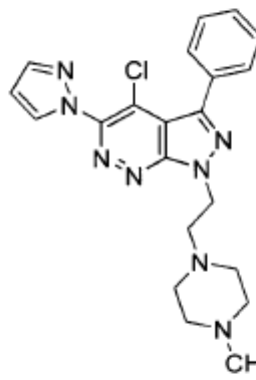
XVb:



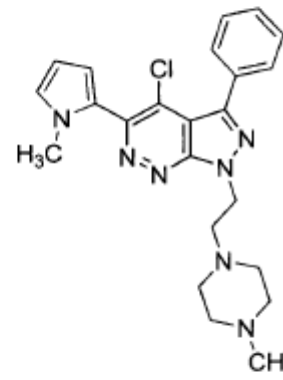
XVc:



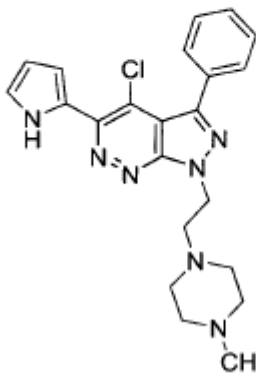
XVd:



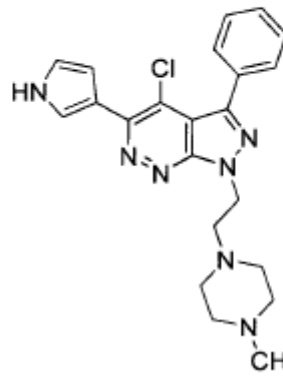
XVe:



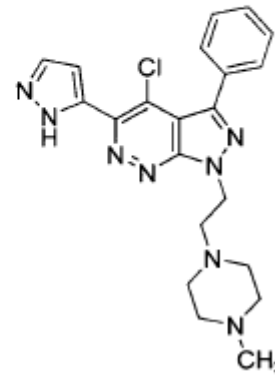
XVf:



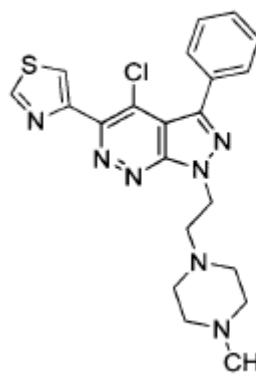
XVg:



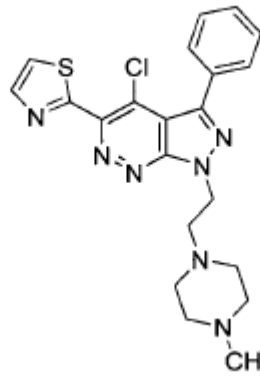
XVh:



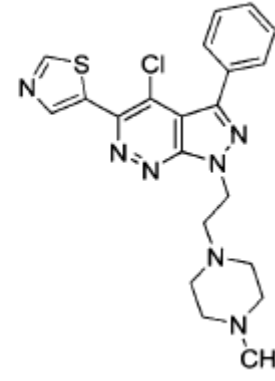
XVi:



XVj:

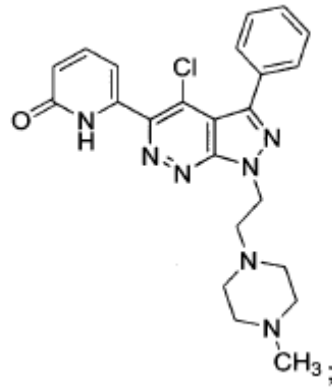


XVk:



XVI:

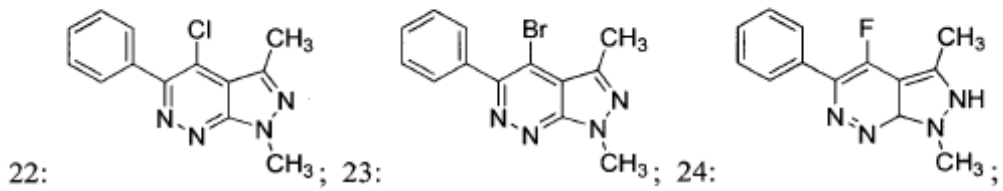
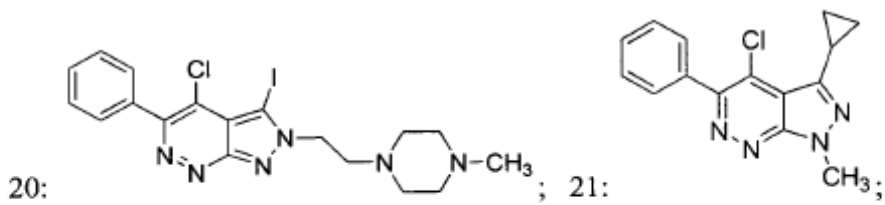
XVm:

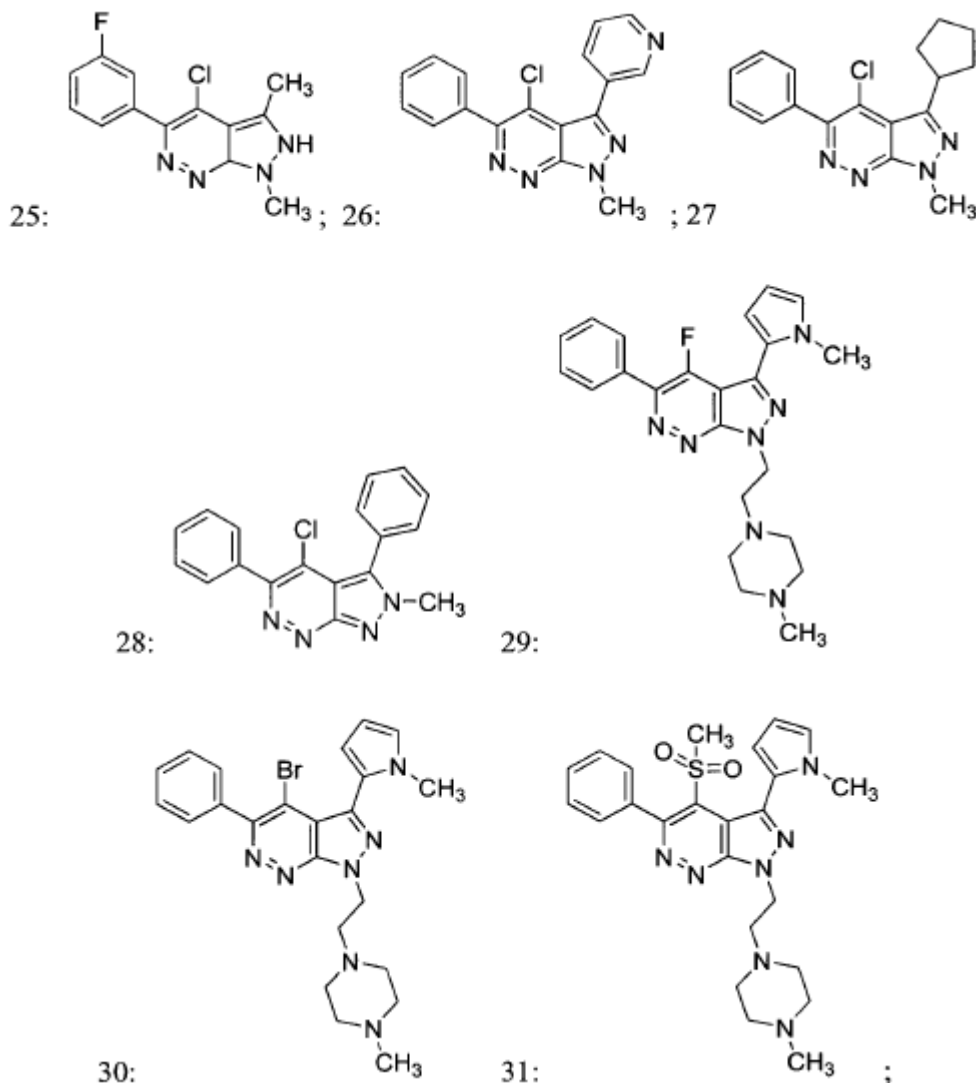


y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Compuestos adicionales de pirazolopiridazina

5 Se describen los siguientes compuestos de pirazolopiridazina. Por consiguiente, los compuestos 22 y 23 son compuestos de la presente invención, mientras que los otros compuestos son compuestos de referencia.





y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 Algunos de los compuestos de la invención o descritos en este documento, por ejemplo, los compuestos Ip, Iq, It, Ilj, Ilt, Ilu, Ilx, Ily, XIIIe, XIIIf, XIIIg, XIIIh, XIIIi, XIIIj, y XIIIw; se representan con una cuña en negrita o sombreado, que indica una estereoquímica absoluta.

10 Sin estar ligado a ningún mecanismo particular, se cree que la unidad estructural de bisfenil pirazolopiridazina de compuestos pirazolopiridazina está implicado en la restauración de la actividad y el tráfico de Clarin I, que es la proteína codificada por el gen mutado en el síndrome de Usher III (Adato et al., Eur J Hum Genet. 2002 Jun;10(6):339-50). Aunque lo siguiente se refiere a los compuestos de la invención, también se aplica a los compuestos descritos.

15 Los compuestos de la invención pueden estar en forma de una sal. En algunas realizaciones, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. El ácido que forma una sal de adición de ácido puede ser un ácido orgánico o un ácido inorgánico. Una base que forma una sal de adición de base puede ser una base orgánica o una base inorgánica. En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal metálica. En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal de amonio.

20 Las sales de adición de ácido pueden surgir a partir de la adición de un ácido a la forma de base libre de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el ácido es orgánico. En algunas realizaciones, el ácido es inorgánico. Los ejemplos no limitantes de ácidos apropiados incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, un ácido fosfórico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido

5 láctico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido gentisínico, ácido glucónico, ácido glucarónico, ácido sacárico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido glutámico, ácido pantoténico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido glicólico, ácido málico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido fenilacético, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, bencenosulfónico ácido, ácido p-toluenosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, ácido 2-fosfoglicérico, ácido 3-fosfoglicérico, ácido glucosa-6-fosfórico y un aminoácido.

10 Los ejemplos no limitantes de sales de adición de ácido apropiadas incluyen una sal de clorhidrato, una sal de bromhidrato, una sal de yodhidrato, una sal de nitrato, una sal de nitrito, una sal de sulfato, una sal de sulfito, una sal de fosfato, una sal de fosfato de hidrógeno, una sal de dihidrogenofosfato, una sal de carbonato, una sal de bicarbonato, una sal de nicotinato, una sal de isonicotinato, una sal de lactato, una sal de salicilato, una sal de 4 aminosalicilato, una sal de tartrato, una sal de ascorbato, una sal de gentisinato, una sal gluconato, una sal de glucaronato, una sal de sacarato, una sal de formiato, una sal de benzoato, una sal de glutamato, una sal de pantotenato, una sal de acetato, una sal de propionato, una sal de butirato, una sal de fumarato, una sal de succinato, una sal de citrato, una sal de oxalato, una sal de maleato, una sal de hidroximaleato, una sal de metilmaleato, una sal de glicolato, una sal de malato, una sal de cinamato, una sal de mandelato, una sal de 2-fenoxibenzoato, una sal de 2-acetoxibenzoato, una sal de embonato, una sal de fenilacetato, una sal de N-ciclohexilsulfamato, una sal de metanosulfonato, un sal de etanosulfonato, una sal de bencenosulfonato, una sal de p-toluenosulfonato, una sal de 2-hidroxietanosulfonato, una sal de etano-1,2-disulfonato, una sal de 4-metilbencenosulfonato, una sal de naftaleno-2-sulfonato, una sal de naftaleno-1,5-disulfonato, una sal de 2-fosfoglicerato, una sal de 3-fosfoglicerato, una sal de glucosa-6-fosfato y una sal de aminoácido.

25 Las sales metálicas pueden surgir a partir de la adición de una base inorgánica a un compuesto de la invención que tiene un grupo carboxilo. La base inorgánica consiste en un catión metálico emparejado con un contraión básico, tal como, por ejemplo, hidróxido, carbonato, bicarbonato o fosfato. El metal puede ser un metal alcalino, un metal alcalinotérreo, un metal de transición o un metal del grupo principal. Los ejemplos no limitantes de metales apropiados incluyen litio, sodio, potasio, cesio, cerio, magnesio, manganeso, hierro, calcio, estroncio, cobalto, titanio, aluminio, cobre, cadmio y zinc.

30 Ejemplos no limitantes de sales metálicas apropiadas incluyen una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de cesio, una sal de cerio, una sal de magnesio, una sal de manganeso, una sal de hierro, una sal de calcio, una sal de estroncio, una sal de cobalto, una sal de titanio, una sal de aluminio, una sal de cobre, una sal de cadmio y una sal de zinc.

35 Las sales de amonio pueden surgir a partir de la adición de amoníaco o una amina orgánica a un compuesto de la invención que tiene un grupo carboxilo. Ejemplos no limitativos de aminas orgánicas apropiadas incluyen trietil amina, diisopropilamina, etanol amina, dietanol amina, trietanol amina, morfolina, N-metilmorfolina, piperidina, N-metilpiperidina, N-etilpiperidina, dibencil amina, piperazina, piridina, pirazol, imidazol, pirazina, piperazina, etilendiamina, N, N'-dibenciltilen diamina, procaína, cloroprocaína, colina, dicitclohexil amina y N-metilglucamina.

40 Ejemplos no limitantes de sales de amonio apropiadas incluyen una sal de trietilamonio, una sal de diisopropilamonio, una sal de etanolamonio, una sal de dietanolamonio, una sal de trietanolamonio, una sal de morfolinio, una sal de N-metilmorfolinio, una sal de piperidinio, una sal de N-metilpiperidinio, una sal de N-etilpiperidinio, una sal de dibencilamonio, una sal de piperazinio, una sal de piridinio, una sal de pirrazolio, una sal de imidazolio, una sal de pirazinio, una sal de etilendiamonio, una sal de N,N'-dibencilletilendiamonio, una sal de procaína, una sal de cloroprocaína, una sal de colina, una sal de dicitclohexilamonio y una sal de N-metilglucamina.

Usos terapéuticos

45 Un compuesto de la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesita para el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina. Los ejemplos no limitantes de enfermedades degenerativas de la retina incluyen: retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, degeneraciones retinales sindrómicas, degeneración macular relacionada con la edad, incluyendo la degeneración macular asociada a la edad húmeda y seca, y el síndrome de Usher. En algunas realizaciones, el síndrome de Usher es un subtipo de síndrome de Usher. En algunas realizaciones, el subtipo es Usher I. En algunas realizaciones, el subtipo es Usher II. En algunas realizaciones, el subtipo es Usher III.

En una realización adicional de la invención, un compuesto de la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesite para el tratamiento de la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher. En algunas realizaciones, el síndrome de Usher es un subtipo del síndrome de Usher. En algunas realizaciones, el subtipo es Usher I. En algunas realizaciones, el subtipo es Usher II. En algunas realizaciones, el subtipo es Usher III.

55 Un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un humano, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo o primate no humano, tal como un mono, chimpancé, babuino o rhesus. En una realización, el sujeto es un ser humano.

Los compuestos de la invención se pueden administrar a un sujeto como un componente de una composición que comprende un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitativos de portadores o vehículos farmacéuticos apropiados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, agua regulada y solución salina regulada con fosfato. Estas composiciones se pueden administrar como, por ejemplo, gotas, soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, metilcelulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las composiciones pueden comprender adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes.

Las composiciones pueden comprender una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. Una "cantidad eficaz" de un compuesto de la invención es una cantidad que es eficaz para tratar una enfermedad degenerativa de la retina o una pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher en un sujeto. Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden, por ejemplo, desde aproximadamente 1 ng a aproximadamente 1,000 mg de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1,000 mg de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg de un compuesto de la invención.

La dosificación de un compuesto de la invención puede variar dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del sujeto, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad degenerativa de la retina o la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher, la vía de administración y la forma de la composición. Las composiciones descritas en este documento se pueden administrar en una sola dosis o en dosis divididas. En algunas realizaciones, la dosificación de un compuesto de la invención varía desde aproximadamente 0.01 ng a aproximadamente 10 g por kg de masa corporal del sujeto, desde aproximadamente 1 ng a aproximadamente 0.1 g por kg, o desde aproximadamente 100 ng a aproximadamente 10 mg por kg.

La administración puede ser, por ejemplo, tópica, intraaural, intraocular, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, supositorio u oral. Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen un compuesto de la invención en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco). Las formulaciones para el uso ocular pueden ser en forma de gotas para los ojos.

Un compuesto de la invención o una composición del mismo se puede proporcionar en forma liofilizada para reconstituir, por ejemplo, en soluciones reguladoras isotónicas, acuosas o salinas para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa. Una composición de la invención también puede estar en forma de una preparación líquida útil para administración oral, intraaural, nasal o sublingual, tal como una suspensión, jarabe o elixir. Una composición de la invención también puede estar en una forma apropiada para administración oral, tal como una cápsula, comprimido, píldora y formulación sólida masticable. Una composición de la invención también se puede preparar como una crema para administración dérmica como un líquido, un líquido viscoso, una pasta o un polvo. Una composición de la invención también se puede preparar como un polvo para administración pulmonar con o sin un componente aerosolizante.

Las composiciones pueden ser en formas de dosificación orales, intraaurales, intranasales, sublinguales, intraduodenales, subcutáneas, bucales, intracolónicas, rectales, vaginales, mucosas, pulmonares, transdérmicas, intradérmicas, parenterales, intravenosas, intramusculares y oculares, así como ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

Las composiciones de la invención se pueden administrar por diversos medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral y se pueden formular como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes. Alternativamente, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía parenteral como inyecciones (por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones de infusión de gota o supositorios. Para la aplicación oftálmica, las composiciones de la invención se pueden formular como gotas oculares o ungüentos oculares. Las composiciones auditivas se pueden formular como gotas para los oídos, ungüentos, cremas, líquidos, geles o pomadas para su aplicación en el oído, ya sea interna o superficialmente. Estas formulaciones se pueden preparar por medios convencionales, y las composiciones se pueden mezclar con cualquier aditivo convencional, tal como un excipiente, un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un agente solubilizante, un adyuvante de suspensión, un agente emulsionante o un recubrimiento agente.

Las composiciones de la invención pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

5 Las composiciones pueden ser apropiadas, por ejemplo, para administración oral, intraaural, intraocular, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, en aerosol y/o parenteral. Las composiciones se pueden proporcionar en una forma de dosificación unitaria, y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica.

10 Las formulaciones apropiadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas, polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga. Las composiciones de la invención también se pueden administrar como un bolo, electuario, o pasta

15 Ejemplos adicionales de portadores o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes reguladores. Se pueden emplear composiciones similares como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas o duras.

20

25 Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, geles, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. La forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de dietilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites tales como aceites de semillas de algodón, maní, maíz, gérmenes, oliva, ricino y sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.

30 Las formas de dosificación en suspensión pueden contener suspensiones, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

35 Las formas de dosificación para la administración transdérmica de una composición objeto incluyen gotas, polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones y parches. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener excipientes, como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafina, almidón, tragacanto, derivados de la celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonita, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

40 Los polvos y aerosoles pueden contener excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio, polvo de poliamida o mezclas de los mismos. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Las composiciones se pueden administrar mediante aerosol de partículas sólidas. Se podría usar una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente de fluorocarbono). Los nebulizadores sónicos se pueden usar porque minimizan la exposición al corte, lo que puede causar degradación.

45 Se puede preparar un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa de un compuesto de la invención con cualquier portador o vehículo farmacéuticamente aceptable convencional tales como surfactantes no iónicos (Tweens, Pluronic, o polietilenglicol); proteínas tales como albúmina de suero; ésteres de sorbitán; ácidos grasos; lecitina; aminoácidos; soluciones reguladoras; sales; azúcares; o alcoholes de azúcar.

50 Las composiciones apropiadas para administración parenteral comprenden un compuesto de la invención y una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles solo antes del uso, que puede contener antioxidantes, soluciones reguladoras, bacteriostáticos o solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del sujeto, y agentes de suspensión o espesantes.

Habiendo descrito la invención con referencia a determinadas realizaciones, otras realizaciones serán evidentes para un experto en el arte a partir de la consideración de la especificación. La invención se define adicionalmente por referencia

a los siguientes ejemplos. Resultará evidente para los expertos en el arte que se pueden llevar a cabo muchas modificaciones, tanto en materiales como en métodos, sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Métodos sintéticos generales

5 Condiciones de LC-MS ácidas estándar: (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN)

Una columna Phenomenex Luna 5 μm C18 (2), 100 x 4.6 mm (más cartucho de protección) usando un acetonitrilo (calidad UV lejano) con ácido fórmico al 0.1%: agua (V/V) (alta pureza mediante la unidad PureLab Option) con gradiente de ácido fórmico al 0.1%. La velocidad de flujo fue de 2 mL/min. La detección UV se realizó usando un detector de arreglo de diodos Waters (rango de inicio 210 nm, rango final 400 nm, intervalo de rango 4 nm). La detección de masas se realizó a través de un único instrumento LC-MS cuadrupolo. La ionización es ESI o APCI depende de los tipos de compuestos. El gradiente usado pasó del 95% de solvente acuoso a un tiempo de 0.00 min a 5% de solvente acuoso a 3.50 min. Este porcentaje se mantuvo luego durante otros 2 min.

Condiciones básicas estándar de LC-MS: (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN):

Se usó una Waters Xterra MS 5 μm C18, 100 x 4.6 mm (más cartucho de protección) usando un acetonitrilo (calidad UV lejano): agua (alta pureza mediante la unidad PureLab Option) con un gradiente 10 mM de bicarbonato de amonio (hidrogenocarbonato de amonio). La velocidad de flujo fue de 2 mL/min. La detección UV se realizó usando un detector de arreglo de diodos Waters (rango de inicio 210 nm, rango final 400 nm, intervalo de rango 4 nm). La detección de masas se realizó a través de un único instrumento LC-MS cuadrupolo. La ionización es ya sea ESI o APCI depende de los tipos de compuestos. El gradiente usado pasó del 95% de solvente acuoso a un tiempo de 0.00 min a 5% de solvente acuoso a 4.0 min. Este porcentaje se mantuvo durante 1.5 minutos más.

Condiciones de HPLC ácidas estándar: (10cm_Fórmico_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN)

Se usó una columna Hichrom ACE 3 C18-AR de modo mixto de 100 x 4.6 mm usando un acetonitrilo (calidad UV lejano) con ácido fórmico al 0.1%: agua (V/V) (alta pureza mediante la unidad PureLab Option) con gradiente de ácido fórmico al 0.1%. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min. La detección UV se realizó usando un detector de arreglo de diodos Agilent (300 nm, ancho de banda 200 nm, ref. 450 nm, ancho de banda 100 nm). El gradiente usado pasó del 98% de solvente acuoso desde el tiempo de 0.00 min a 3.00 min, hasta el 100% de solvente acuoso a 12.00 min. Este porcentaje se mantuvo luego durante 2.4 minutos adicionales.

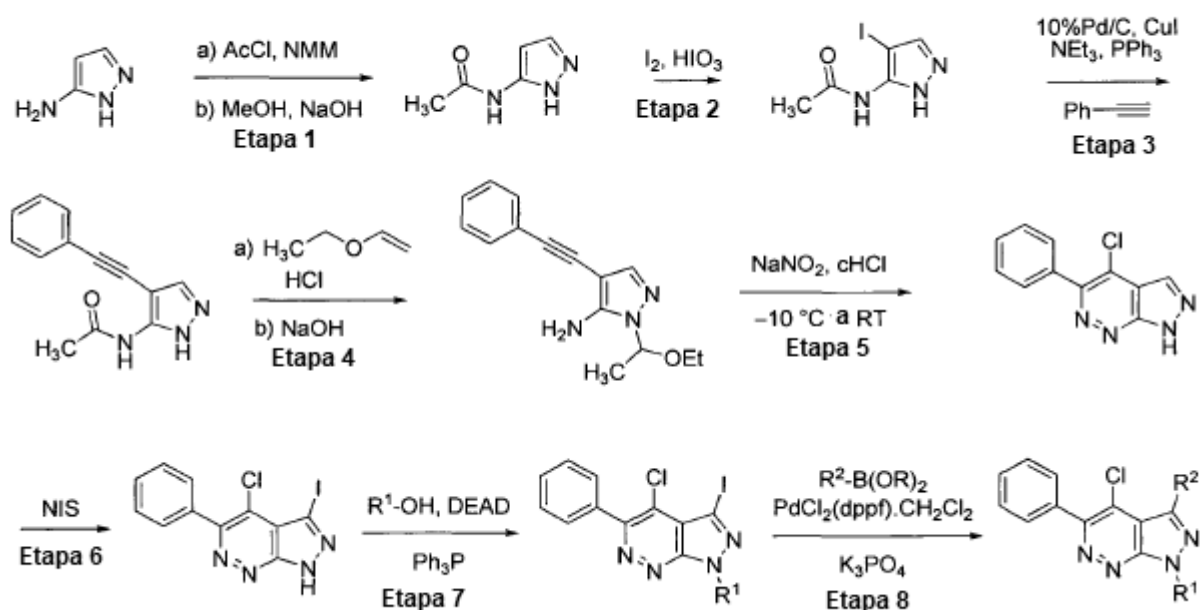
Condiciones de HPLC básicas estándar: (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC)

Se usó una columna Phenomenex, Gemini NX, 3 μm C18, 150 x 4.6 mm usando un acetonitrilo (calidad UV lejano): agua (alta pureza mediante la unidad PureLab Option) con gradiente de bicarbonato de amonio 10 mM. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min. La detección UV se realizó usando un detector de arreglo de diodos Agilent (300 nm, ancho de banda 200 nm, ref. 450 nm, ancho de banda 100 nm). El gradiente usado pasó del 95.5% de solvente acuoso a un tiempo de 0.00 min hasta 0% de solvente acuoso a los 9.00 min. Este porcentaje se mantuvo durante otros 4.5 min.

Esquemas de síntesis

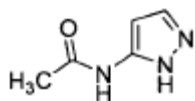
35 Los ejemplos no limitantes de esquemas de síntesis que son útiles para sintetizar los compuestos de pirazolopiridazina incluyen los siguientes.

Esquema I: Esquema general de síntesis de los compuestos de Fórmula I



Ejemplo 1: 4-cloro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Ic)

Etapa 1: N-(1H-pirazol-5-il)acetamida

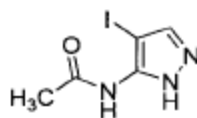


5

10

A una solución de 1H-pirazol-5-amina (50 g, 0.602 mol) y N-metilmorfolina (160 mL, 1.44 mol) en CH₂Cl₂ (2 L) se le añadió cloruro de acetilo (99 mL, 1.38 mol) gota a gota a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 1 d. Se observó algo de producto di-acilado en una LCMS. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el sólido resultante se suspendió en MeOH (2 L) y se enfrió a 0 °C. Se añadió lentamente una solución de NaOH 4M (acuoso, 440 mL, 1.75 mol) y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente, durante 1.5 h. El MeOH se eliminó a vacío y el sólido se recogió por filtración, se lavó con agua fría mínima y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (60 g).

Etapa 2: N-(4-yodo-1H-pirazol-5-il)acetamida

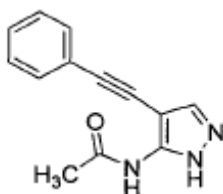


15

Una suspensión de N-(1H-pirazol-5-il)acetamida (60 g, 0.48 mol), ácido yódico (21.1 g, 0.12 mol) y yodo (61 g, 0.24 mol) en etanol (1.6 L) se calentó a 60 °C, durante 1.5 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se repartió entre acetato de etilo y solución acuosa de Na₂S₂O₃ 2 M. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (105 g).

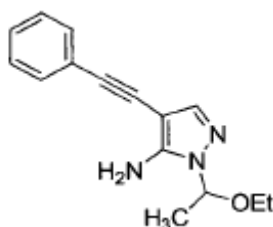
20

Etapa 3: N-(4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-il)acetamida



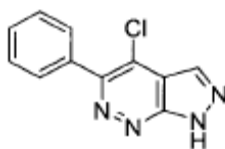
5 Se burbujeó nitrógeno a través de una suspensión de N-(4-yodo-1H-pirazol-5-il)acetamida (30 g, 120 mmol), 10% de paladio sobre carbono (50% de agua, 7.4 g, 3 mmol), yoduro de cobre (I) (1.14 g, 6 mmol), trifenilfosfina (6.3 g, 24 mmol) y trietilamina (50 mL, 360 mmol) en etanol (600 mL), durante 20 minutos. Se añadió fenilacetileno y se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla durante otros 25 minutos. La mezcla de reacción se calentó a continuación y se agitó en condiciones de reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 3 d y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexanos/acetato de etilo 9:1 a 0:1) produciendo el compuesto base como un sólido (17.6 g).

Etapa 4: 1-(1-etoxietil)-4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-amina



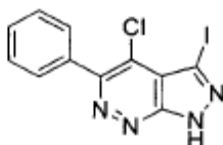
10 Una solución de N-(4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-il)acetamida (17.6 g, 78 mmol), etoxieteno (11.2 mL, 117 mmol) y HCl en 1,4-dioxano (1 mL, 4 mmol) en CH₂Cl₂ (520 mL) se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en etanol (260 mL) y solución acuosa de NaOH al 25% (260 mL) y la mezcla de reacción se calentó a 75°C, durante 4 horas y se enfrió a temperatura ambiente. El etanol se concentró en parte a vacío y el sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y con un mínimo de etanol frío y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (16 g).

Etapa 5: 4-cloro-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



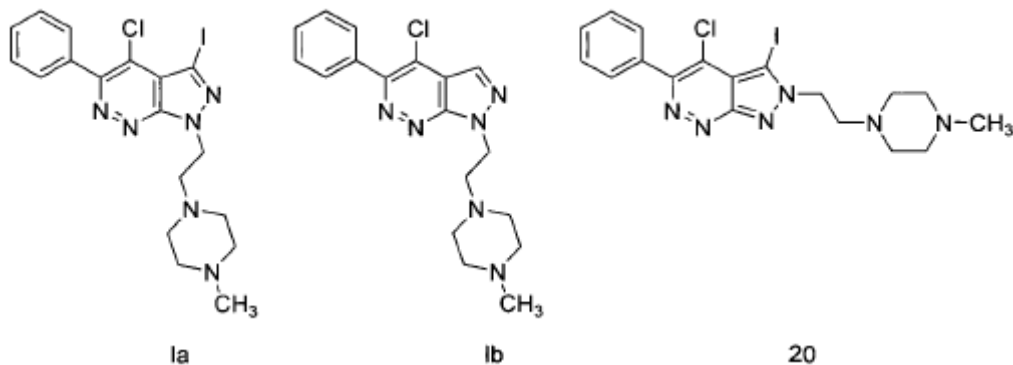
20 Se añadió nitrito de sodio (4.3 g, 63 mmol) a HCl conc. (314 mL) a -15 °C y se agitó durante 10 minutos. Se añadió 1-(1-etoxietil)-4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-amina (3 g, 31.4 mmol) y la mezcla se agitó a -10 °C, durante 10 minutos y a temperatura ambiente, durante 1 d. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió CH₂Cl₂ (250 mL). Bajo agitación vigorosa, se añadió Na₂CO₃ (160 g) cuidadosamente seguido de solución saturada acuosa de NaHCO₃ durante un período de 2 h hasta que el pH fue 7 y no hubo más espuma en la adición posterior de la base. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexanos/éter dietílico 1:0 a 0:1) produciendo el compuesto base como un sólido (3.43 g).

Etapa 6: 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



30 Una suspensión de 4-cloro-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (2.44 g, 10.6 mmol) y N-yodosuccinimida (3.58 g, 15.9 mmol) en acetonitrilo (106 mL) se calentó a reflujo durante 1 d. El sólido de color amarillo se recogió por filtración mientras se calentaba para proporcionar una mezcla del compuesto base y el material de partida (9:1, 4 g).

Etapa 7: 4-Cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto la, compuesto de referencia), 4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lb) y 4-cloro-3-yodo-2-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-2H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 20, compuesto de referencia)



- 5 Una solución de 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 4-cloro-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (9:1, 1.4 g), 2-(4-metilpiperazin-1-il)etanol (1.13 g, 7.8 mmol), azodicarboxilato de dietilo (1.37 g, 7.8 mmol) y trifenilfosfina (2.07 g, 7.9 mmol) en 1,4-dioxano (26 mL) se calentó a 85 °C, durante 1 h y luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (gel de sílice, comenzando con isohexanos/acetato de etilo 1:0 a 0: 1 y terminando con acetato de etilo/NH₃ 4 M en MeOH 1:0 a 9: 1). El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar los compuestos la, lb y 20.

4-Cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto la, compuesto de referencia)

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.79-7.75 (2 H, m), 7.57-7.49 (3 H, m), 4.87 (2 H, t), 3.01 (2 H, t), 2.61 (4 H, br s), 2.34 (4 H, br s), 2.23 (3 H, s).

- 15 LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.67 min; m/z 483 [M+H] 97.65% de pureza.

4-Cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lb)

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 8.21 (1 H, s), 7.84-7.81 (2 H, m), 7.56-7.47 (3 H, m), 4.89 (2 H, t), 3.03 (2 H, t), 2.62 (4 H, br s), 2.35 (4 H, br s), 2.23 (3 H, s).

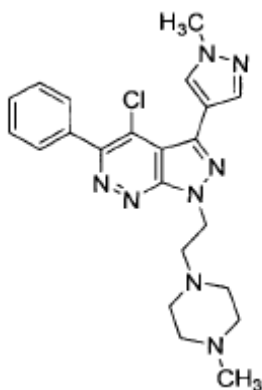
LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.48 min; m/z 357 [M+H] 99.73% de pureza.

- 20 4-Cloro-3-yodo-2-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-2H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 20, compuesto de referencia)

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.83 (2 H, m), 7.56-7.47 (3 H, m), 4.78 (2 H, t), 3.10 (2 H, t), 2.66 (4 H, br s), 2.47 (4 H, br s), 2.30 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.07 min; m/z 483 [M+H] 94.53% de pureza.

- 25 Etapa 8: 4-cloro-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lc)

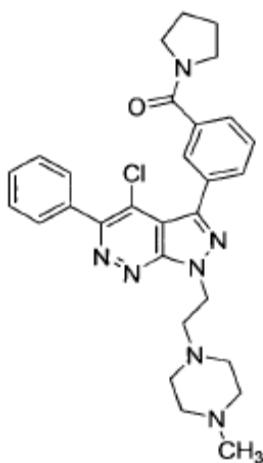


5 Se burbujeó nitrógeno a través de una suspensión de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (75 mg, 0.16 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (37 mg, 0.18 mmol) y K_3PO_4 (99 mg, 0.47 mmol) en DMF (1.2 mL) y agua (0.4 mL), durante 20 min. Se añadió complejo de 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno-paladio(II)dicloruro diclorometano (13 mg, 0.016 mmol) y el tubo se selló y se calentó usando irradiación de microondas a 60 °C, durante 30 minutos. La mezcla de reacción en bruto se filtró y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto 1c (42 mg).

1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 8.00 (1 H, s), 7.89 (1 H, s), 7.78-7.75 (2 H, m), 7.56-7.47 (3 H, m), 4.89 (2 H, t), 4.00 (3 H, s), 3.04 (2 H, t), 2.70-2.58 (4 H, m), 2.44-2.30 (4 H, m), 2.24 (3 H, s).

10 LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.47 min; m/z 437 [M+H] 98.88 % de pureza.

Ejemplo 2: (3-(4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-3-il)fenil)(pirrolidina-1-il)metanona (compuesto 1d)

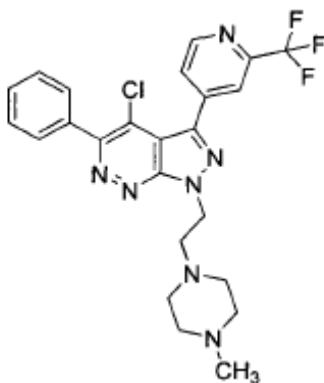


15 El compuesto 1d se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el ácido (3-(pirrolidina-1-carbonil)fenil)borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 7.44 (1 H, t), 7.84-7.75 (3 H, m), 7.62 (1 H, dt), 7.56-7.46 (4 H, m), 4.94 (2 H, t), 3.68 (2 H, t), 3.49 (2 H, t), 3.07 (2 H, t), 2.65 (4 H, br s), 2.37 (4 H, br s), 2.24 (3 H, s), 2.01-1.85 (4 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 9.9min; m/z 530 [M+H] 92.56% de pureza.

20 Ejemplo 3: 4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-3-(2-(trifluorometil)piridin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 1e)

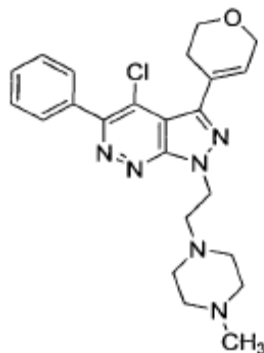


El compuesto se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el ácido (2-(trifluorometil)piridin-4-il)borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 8.88 (1 H, d), 8.19 (1 H, s), 7.98 (1 H, dd), 7.81-7.77 (2 H, m), 7.57-7.51 (3 H, m), 4.99 (2 H, t), 3.12 (2 H, t), 2.80 (4 H, br s), 2.62 (4 H, br s), 2.40 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.85min; m/z 502 [M+H] 90.64% de pureza.

Ejemplo 4: 4-cloro-3-(3,6-dihidro-2H-piran-4-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lf)

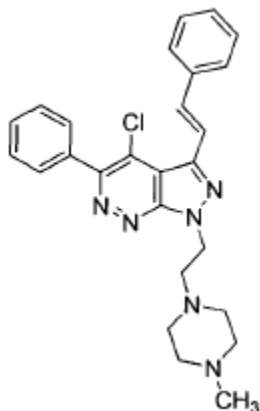


10 El compuesto lf se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando 2-(3,6-dihidro-2H-piran-4-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.68-7.64 (2 H, m), 7.45-7.36 (3 H, m), 6.23-6.20 (1 H, m), 4.76 (2 H, t), 4.29 (2 H, m), 3.89 (2 H, t), 2.92 (2 H, t), 2.68-2.52 (6 H, m), 2.30 (4 H, br s), 2.17 (3 H, s).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 9.06min; m/z 439 [M+H] 93.3% de pureza.

15 Ejemplo 5: (E)-4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-3-estiril-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lg, compuesto de referencia)

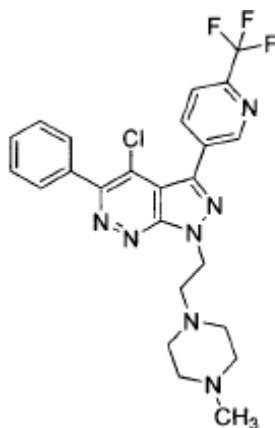


El compuesto Ig se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el ácido (E)-estirilborónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

¹H RMN δ (ppm)(DMSO-d₆): 7.85-7.75 (5 H, m), 7.70-7.56 (4 H, m), 7.52-7.45 (2 H, m), 7.44-7.38 (1 H, m), 4.92 (2 H, t), 3.01 (2 H, t), 2.57-2.54 (4 H, m), 2.32-2.20 (4 H, m), 2.15 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 3.01min; m/z 459 [M+H] 96.98% de pureza.

Ejemplo 6: 4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-3-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lh)

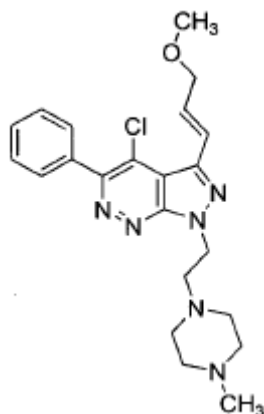


10 El compuesto lh se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el ácido (6-(trifluorometil)piridin-3-il)borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

¹H RMN δ (ppm)(DMSO-d₆): 9.26 (1 H, d), 8.60 (1 H, dd), 8.17 (1 H, d), 7.82 (2 H, m), 7.67-7.58 (3 H, m), 5.01 (2 H, t), 3.04 (2 H, t), 2.57-2.54 (4 H, br s), 2.76 (4 H, br s), 2.15 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.86 min; m/z 502 [M+H] 97.31 % de pureza.

15 Ejemplo 7: (E)-4-cloro-3-(3-metoxiprop-1-en-1-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto li)

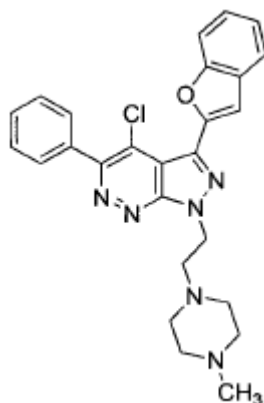


El compuesto li se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el (E)-2-(3-metoxiprop-1-en-1-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolo en la etapa 8.

5 ^1H RMN δ (ppm)(DMSO- d_6): 7.80-7.77 (2 H, m), 7.67-7.57 (3 H, m), 7.23 (1 H, dt), 6.80 (1 H, dt), 4.88 (2 H, t), 4.21 (2 H, dd), 3.40 (3 H, s), 2.97 (2 H, t), 2.57-2.54 ((4 H, s), 2.24 (4 H, br s), 2.14 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.68 min; m/z 427 [M+H] 96.83% de pureza.

Ejemplo 8: 3-(benzofuran-2-il)-4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto li)

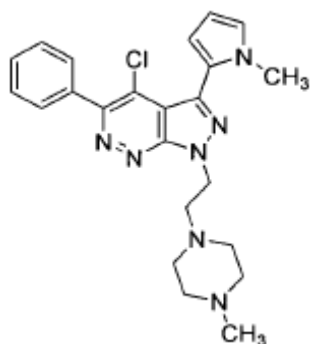


10 El compuesto lj se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando ácido benzofuran-2-ilborónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolo en la etapa 8.

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 - d): 7.83 (2 H, m), 7.72 (1 H, d), 7.64 (1 H, d), 7.57 (3 H, m), 7.50 (1 H, s), 7.42 (1 H, t), 7.33 ((1 H, t), 5.02 (2 H, t), 3.12 (2 H, t), 2.68 (4 H, br s), 2.40 (4 H, br s), 2.26 ((3 H, s).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 10.39 min; m/z 473 [M+H] 93.83% de pureza.

15 Ejemplo 9: 4-cloro-3-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lk)

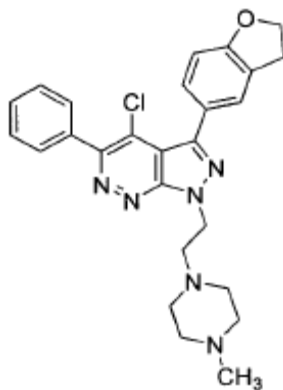


El compuesto Ik se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando 1-metil-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirroló en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

5 ^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78 (2 H, m), 7.55-7.49 (3 H, m), 6.82 (1 H, t), 6.58 (1 H, dd), 6.26 (1 H, dd), 4.91 (2 H, t), 3.71 (3 H, s), 3.08 (2 H, t), 2.74 (4 H, br s), 2.52 (4 H, br s), 2.34 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.79 min; m/z 436 [M+H] 96.5 % de pureza.

Ejemplo 10: 4-cloro-3-(2,3-dihidrobencofuran-5-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto II)

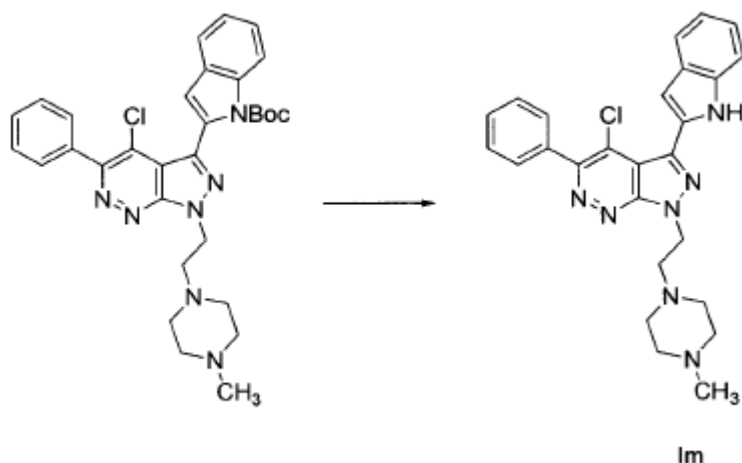


10 El compuesto II se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el ácido (2,3-dihidrobencofuran-5-il)borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.75 (2 H, m), 7.58 (1 H, s), 7.54-7.47 (4 H, m), 6.90 (1 H, d), 4.91 (2 H, t), 4.66 (2 H, t), 3.30 (2 H, t), 3.08 (2 H, t), 2.72 (4 H, br s), 2.50 (4 H, br s), 2.32 (3 H, s).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 9.86 min; m/z 475 [M+H] 96.92% de pureza.

15 Ejemplo 11: 4-cloro-3-(1H-indol-2-il)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Im)



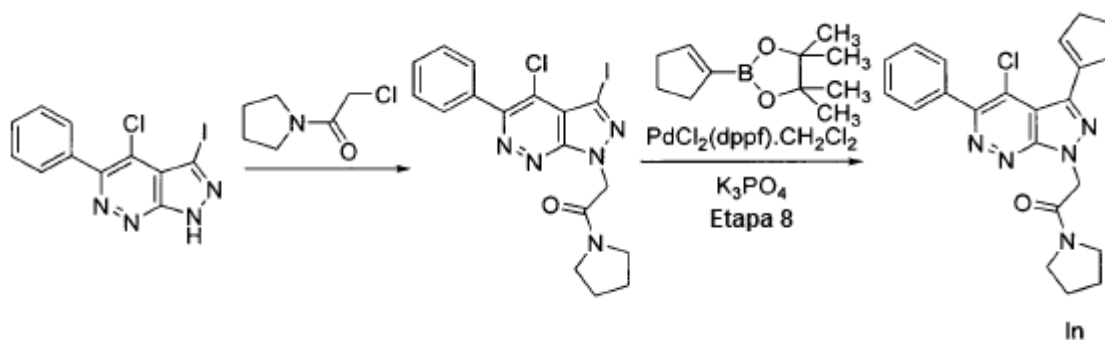
5 El 2-(4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-3-il)-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el (1-(tert-butoxicarbonil)-1H-indol-2-il)borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8 que se desprotegió para producir el compuesto 1m de la siguiente manera.

10 Una solución de 2-(4-cloro-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-3-il)-1H-indol-1-carboxilato de tert-butilo (29 mg, 0.051 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) y ácido trifluoroacético (0.8 mL) se agitó a temperatura ambiente, durante 1 d. Se añadió NaHCO_3 sólido hasta que no se desprendió gas y se añadió solución acuosa saturada de NaHCO_3 y CH_2Cl_2 . Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 , las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se liofilizó en acetonitrilo y agua para proporcionar el compuesto 1m como un sólido.

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 9.14 (1 H, s), 7.79 (2 H, m), 7.70 (1 H, d), 7.60-7.50 (3 H, m), 7.49-7.42 (2 H, m), 7.29 (1 H, t), 7.15 (1 H, t), 4.92 (2 H, t), 3.14 (2 H, t), 2.87 (8 H, br s), 2.56 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.68 min; m/z 472 [M+H] 95.85 % de pureza.

15 Ejemplo 12: 2-(4-cloro-3-(ciclopent-1-en-1-il)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-(pirrolidin-1-il)etenona (compuesto 1n)



20 Se sintetizó la 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina según el ejemplo 1 hasta la etapa 6. Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 32 mg, 1.75 mmol) a una solución de 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (400 mg, 1.12 mmol) y 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona (54 mg, 1.8 mmol) en DMF seco (7.5 mL) a temperatura ambiente. Después de 1.5 h a temperatura ambiente, se añadió más hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 27 mg) y la suspensión se agitó durante 2 h. Se añadió solución acuosa de LiCl al 4% y acetato de etilo. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexanos/acetato de etilo 1:0 a 0:1). El sólido resultante se disolvió en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 y se añadió éter dietílico hasta que precipitó un sólido. El sólido se recogió por filtración para proporcionar 2-(4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-(pirrolidin-1-il)etenona (246 mg).

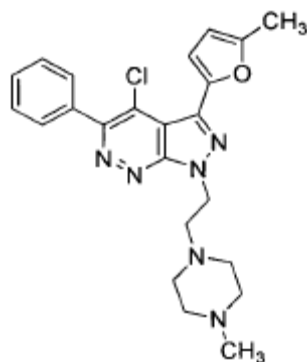
El compuesto 1n se sintetizó según el ejemplo 1, etapa 8, excepto que se usó 2-(4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-(pirrolidin-1-il)etanona en lugar de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1 H-

pirazolo[3,4-c]piridazina y se usó 2-(ciclopent-1-en-1-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.73 (2 H, m), 7.54-7.47 (3 H, m), 6.58 (1 H, m), 5.48 (2 H, s), 3.63 (2 H, t), 3.52 (2 H, t), 2.96 (2 H, m), 2.65-2.59 (2 H, m), 2.11-2.01 (4 H, m), 1.94-1.87 (2 H, m).

5 LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.52 min; m/z 408 [M+H] 97.97% de pureza.

Ejemplo 13: 4-cloro-3-(5-metil-2-furil)-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lo)



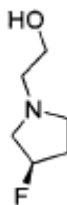
El compuesto lo se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando el ácido (5-metil-2-furil)borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

10 ^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.79-7.76 (2 H, m), 7.55-7.49 (3 H, m), 6.97 (1 H, d), 6.17 (1 H, d), 4.92 (2 H, t), 3.05 (2 H, t), 2.64 (4 H, bs), 2.44 (3 H, s), 2.36 (4 H, bs), 2.24 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.87 min; m/z 437 [M+H] 96.26 % de pureza.

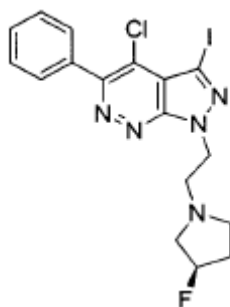
Ejemplo 14: 4-cloro-1-[2-(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3-yodo-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lp, compuesto de referencia)

15 Etapa 1: 2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanol



20 Se sintetizó 2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanol de la siguiente manera: una suspensión de clorhidrato (3R)-3-fluoropirrolidina (1 g, 8 mmol) en CH_2Cl_2 se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadieron trietilamina (2.79 mL, 20 mmol) y bromoacetato de metilo (0.83 mL, 8.8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas combinadas se secaron (cartucho separador de fases) y se concentraron al vacío, produciendo 2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]acetato de metilo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (1.29 g). Se añadió lentamente una solución de hidruro de litio y aluminio en THF (2 M, 8 mL, 6 mmol) a una solución de 2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il] acetato de metilo (1.29 g, 8 mmol) en THF (72 mL). La mezcla de reacción se agitó a $70\text{ }^\circ\text{C}$, durante 25 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se añadió lentamente una solución acuosa de KOH al 10% enfriada con hielo. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con solución acuosa de KOH al 10% y acetato de etilo caliente. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los orgánicos combinados se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron a vacío, produciendo 2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanol como un aceite (779 mg).

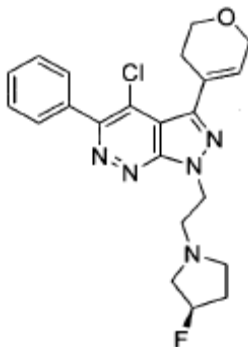
30 Etapa 2: 4-cloro-1-[2-(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3-yodo-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lp, compuesto de referencia)



El compuesto Ip se sintetizó según el ejemplo 1, etapa 7, pero usando 2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanol en lugar de 2-(4-metilpiperazin-1-il)etanol en la etapa 7. ^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.74 (2 H, m), 7.57-7.47 (3 H, m), 5.18-5.01 (1 H, m), 4.91-4.84 (2 H, m), 3.23-3.15 (2 H, m), 2.99-2.85 (3 H, m), 2.66 (1 H, q), 2.09-1.95 (2 H, m).

5 LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.65 min; m/z 472 [M+H] 94.21 % de pureza.

Ejemplo 15: 4-cloro-3-(3,6-dihidro-2H-piran-4-il)-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Iq)

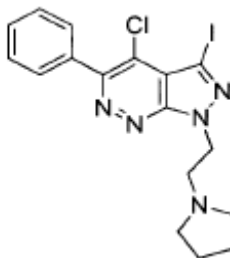


10 El compuesto Iq se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando 2-(3,6-dihidro-2H-piran-4-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol y 4-cloro-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3-yodo-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina en lugar de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina en la etapa 8.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.77-7.73 (2 H, m), 7.55-7.46 (3 H, m), 6.33-6.31 (1 H, m), 5.22-5.04 (1 H, m), 4.88 (2 H, t), 4.39 (2 H, q), 3.99 (2 H, t), 3.20 (2 H, t), 2.98-2.89 (3 H, m), 2.76-2.63 (3 H, m), 2.12-1.93 (2 H, m).

15 LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.56 min; m/z 428 [M+H] 90.43 % de pureza.

Ejemplo 16: 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1-(2-pirrolidin-1-ilet)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Ir, compuesto de referencia)

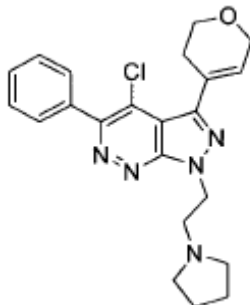


El compuesto Ir se sintetizó según el ejemplo 1 a la etapa 7, usando 2-pirrolidin-1-iletanol en lugar de 2-(4-metilpiperazin-1-il)etanol en la etapa 7.

20 ^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.79-7.75 (2 H, m), 7.57-7.49 (3 H, m), 4.89 (2 H, t), 3.14 (2 H, t), 2.66-2.60 (4 H, m), 1.76-1.71 (4 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.66 min; m/z 454 [M+H] 99.44 % de pureza.

Ejemplo 17: 4-cloro-3-(3,6-dihidro-2H-piran-4-il)-5-fenil-1-(2-pirrolidin-1-iletíl)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Is)



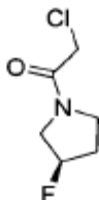
5 El compuesto Is se sintetizó según el ejemplo 1, usando 2-(3,6-dihidro-2H-piran-4-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol y 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1-(2-pirrolidin-1-iletíl)pirazolo[3,4-c]piridazina en lugar de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina en la etapa 8.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.76-7.73 (2 H, m), 7.55-7.46 (3 H, m), 6.36-6.27 (1 H, m), 4.89 (2 H, t), 4.40-4.37 (2 H, m), 3.99 (2 H, t), 3.17 (2 H, t), 2.75-2.63 (6 H, m), 1.77 (4 H, bs).

10 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.58 min; m/z 410 [M+H] 99.45 % de pureza.

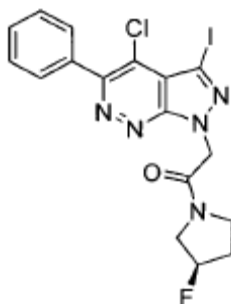
Ejemplo 18: 2-(4-cloro-3-yodo-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanona (compuesto It, compuesto de referencia)

Etapa 1: 2-cloro-1-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanona



15 Se añadió cloruro de cloroacetilo (632 μL, 7.94 mmol) gota a gota a una solución de (3R)-3-fluoropirrolidina (1 g, 7.94 mmol) y trietilamina (2.2 mL, 15.9 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) a 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h. Se añadieron agua y CH₂Cl₂. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío, para producir 2-cloro-1-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanona (4.7 g).

20 Etapa 2: 2-(4-cloro-3-yodo-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanona (compuesto It, compuesto de referencia)



25 Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 240 mg, 6 mmol) a una solución de 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1-Hpirazolo [3,4-c] piridazina (1.06 g, 3 mmol) y 2-cloro-1-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etanona (740 mg, 4.5 mmol) en DMF seco (20 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. Se añadió

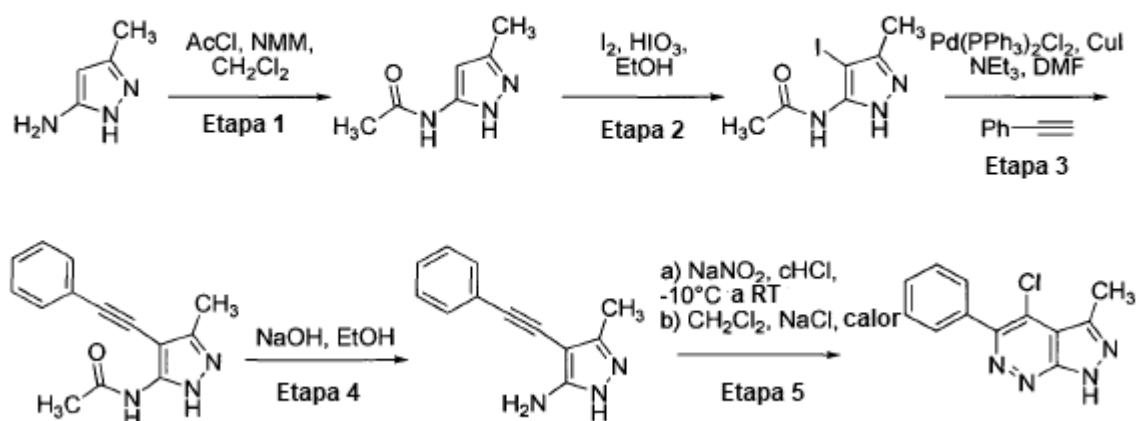
solución acuosa de LiCl al 4% y acetato de etilo. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 1:0 a 3:7). El sólido resultante se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ y se añadió éter dietílico hasta que precipitó un sólido. El sólido se recogió por filtración para proporcionar el compuesto 1t como un sólido (846 mg).

5

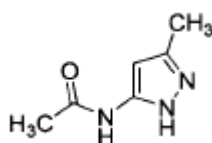
¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.76-7.72 (2 H, m), 7.56-7.49 (3 H, m), 5.61-5.45 (2 H, m), 5.36-5.20 (1 H, m), 3.97-3.75 (3 H, m), 3.67-3.53 (1 H, m), 2.55-1.90 (1 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.21 min; m/z 486 [M+H] 95.11 % de pureza.

Esquema II. Esquema general adicional para la síntesis de los compuestos de fórmula I



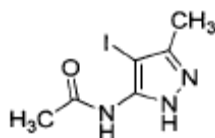
10 Ejemplo 19: 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 1u) Etapa 1: N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida



Se añadió cloruro de acetilo (41 g, 0.530 mol) gota a gota a una solución de 3-metil-1H-pirazol-5-amina (25.6 g, 0.264 mol) y N-metilmorfolina (58 mL, 0.530 mol) en CH₂Cl₂ (250 mL) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. Se añadió agua a la mezcla de reacción y la capa orgánica se concentró al vacío. El residuo se recogió en una mezcla de MeOH/THF (100 mL/100 mL), se enfrió a 10 °C y se trató con solución de NaOH 1M. La mezcla de reacción se agitó durante 0.25 h, se acidificó a pH 5 y los solventes orgánicos se eliminaron al vacío. El precipitado resultante se filtró, se lavó (agua, éter dietílico) y se secó para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (29.6 g).

15

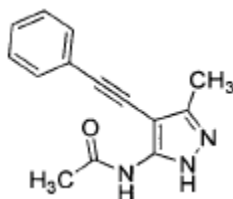
20 Etapa 2: N-(4-yodo-3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida



Una suspensión de N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida (29.6 g, 0.213 mol), ácido yódico (9.3 g, 0.053 mol) y yodo (32.5 g, 0.128 mol) en etanol (300 mL) se calentó a 50 °C, durante 3 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se recogió en acetato de etilo. La solución se lavó dos veces con Na₂S₂O₃ 2 M seguido de solución de salmuera. La capa orgánica se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se trituró en éter dietílico, se filtró y se secó para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (32.5 g).

25

Etapa 3: N-(3-metil-4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-il)acetamida

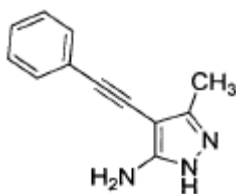


5

Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de N-(4-yodo-3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida (32.5 g, 0.122 mol), fenilacetileno (25.0 g, 0.245 mol), trietilamina (300 mL) y DMF (100 mL), durante 15 minutos. Se añadieron yoduro de cobre (2.3 g, 12 mmol) y dicloruro de bis (trifenilfosfina) paladio (II) (4.2 g, 6.0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C bajo nitrógeno durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 5:1 a 1:1) produciendo el compuesto base como un sólido (15 g).

10

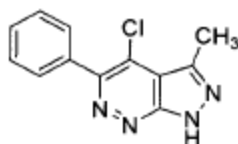
Etapa 4: 3-metil-4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-amina



15

Una mezcla de N-(3-metil-4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-il)acetamida (15 g, 63 mmol), etanol (50 mL) y solución acuosa de NaOH al 25% (50 mL) se agitó a 90 °C, durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. Se añadió éter dietílico al residuo y el sólido se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (3.3 g).

Etapa 5: 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Iu)



20

Se añadió nitrito de sodio (2.3 g, 33.8 mmol) en porciones a CHCl₃ (33 mL) a -15 °C y se agitó durante 15 minutos. Se añadió 3-metil-4-(feniletinil)-1H-pirazol-5-amina (3.3 g, 16.9 mmol) como un sólido, seguido de la adición de CH₂Cl₂ (5 mL). La mezcla de reacción se dejó calentar y se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (28 mL) y se añadió NaCl (1.0 g). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C, durante 16 h, luego se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre agua y CH₂Cl₂. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, CH₂Cl₂, luego CH₂Cl₂/acetato de etilo 9:1) produciendo el compuesto Iu como un sólido de color amarillo claro (1.9 g).

25

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 11.79 (1 H, s), 7.80-7.77 (2 H, m), 7.57-7.48 (3 H, m).

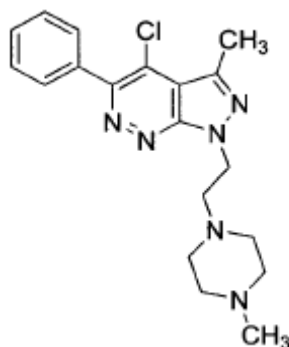
LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 9.56 min; m/z 245 [M+H] 95.61 % de pureza.

Ejemplo 20: procedimiento general para la reacción de Mitsunobu:

30

Una mezcla de 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmol), el alcohol (0.65 mmol), azodicarboxilato de dietilo (114 mg, 0.65 mmol) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL) se calentó usando irradiación de microondas a una temperatura entre 85 y 120 °C, durante un período de 30 a 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto base.

Ejemplo 21: 4-cloro-3-metil-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Iv)

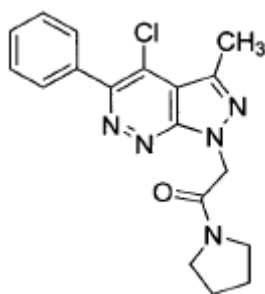


El compuesto lv se sintetizó a partir de 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(4-metilpiperazin-1-il)etanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.80-7.77 (2 H, m), 7.56-7.48 (3 H, m), 4.80 (2 H, t), 2.99 (2 H, t), 2.80 (3 H, s), 2.64 (4 H, br s), 2.40 (4 H, br s), 2.26 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.53 min; m/z 371 [M+H] 99.25 % de pureza.

Ejemplo 22: 2-(4-cloro-3-metil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-pirrolidin-1-il-etanona (compuesto lw)



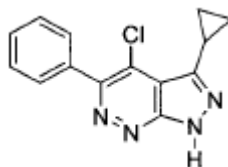
El compuesto lw se sintetizó a partir de 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-hidroxi-1-(pirrolidin-1-il)etanona siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.78-7.74 (2 H, m), 7.54-7.50 (3 H, m), 5.44 (2 H, s), 3.63 (2 H, t), 3.52 (2 H, t), 2.81 (3 H, s), 2.07 (2 H, q), 1.90 (2 H, q).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb MeCN) Rt 3.15 min; m/z 356 [M+H] 98.98 % de pureza.

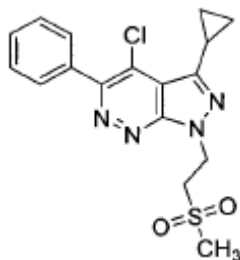
Ejemplo 23: 4-cloro-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonietil)-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lx)

Etapa 1: 4-Cloro-3-ciclopropil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



4-Cloro-3-ciclopropil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina se sintetizó según el ejemplo 19, excepto usando 3-ciclopropil-1H-pirazol-5-amina en lugar de 3-metil-1H-pirazol-5-amina.

Etapa 2: 4-cloro-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonietil)-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lx)

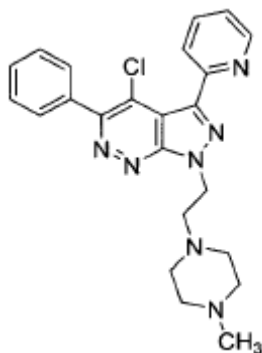


El compuesto 1x se sintetizó a partir de 4-cloro-3-ciclopropil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(metilsulfonil)etanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.78-7.75 (2 H, m), 7.57-7.50 (3 H, m), 5.13 (2 H, t), 3.76 (2 H, t), 2.98 (3 H, s), 2.60-2.55 (1 H, m), 1.16-1.10 (4 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.37 min; m/z 377 [M+H] 99.7 % de pureza.

Ejemplo 24: 4-cloro-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-3-(2-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 1y)

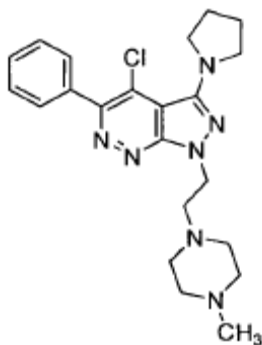


Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (100 mg, 0.21 mmol) en DMF (1.4 mL), durante 10 minutos. Se añadió tetraquis (trifenilfosfina) paladio (24 mg, 0.021 mmol) y se burbujeó nitrógeno en la mezcla resultante durante otros 10 minutos. Se añadió 2-(tributilestannil)piridina y se burbujeó nitrógeno durante otros 10 minutos. El tubo se selló y se calentó usando irradiación de microondas a 100 °C, durante 1 h, 120 °C, durante 1 h, 130 °C, durante 2 h, luego a 140 °C, durante 3 h. La mezcla de reacción en bruto se filtró y se purificó parcialmente por HPLC preparativa. El residuo se disolvió en DMSO (2 mL) y se añadió agua. El sólido se separó por filtración, se lavó con agua y se secó para proporcionar el compuesto 1y como un sólido (10 mg).

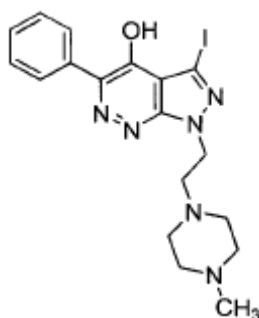
¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 8.81-8.77 (1 H, m), 7.90-7.78 (4 H, m), 7.55-7.46 (3 H, m), 7.39 (1 H, m), 4.97 (2H, t, J = 6.7 Hz), 3.08 (2 H, t, J = 6.7 Hz), 2.70-2.55 (4 H, br s), 2.36 (4 H, br s), 2.23 (3 H, s).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 8.98 min; m/z 434 [M+H] 96.6 % de pureza.

Ejemplo 25: 4-cloro-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-3-(pirrolidin-1-il)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 1z)

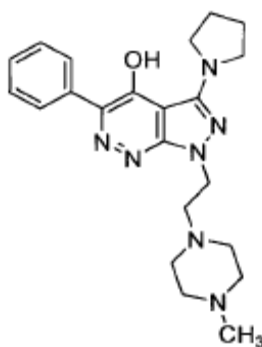


Etapa 1: 3-yodo-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol



5 Una suspensión de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il) etil) -5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (140 mg, 0.29 mmol) en DMSO (3 mL) y solución acuosa de NaOH (4 M, 3 mL) se calentó a 50 °C, durante 2.5 h. La mezcla se dejó enfriar a rt, luego se neutralizó a pH 2-3 antes de cargarla en un cartucho SCX (10 g). El cartucho se eluyó con MeOH y luego con CH₂Cl₂/MeOH (1:1) y finalmente el producto se liberó con amoníaco metanólico al 10% (7 N) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1). La evaporación del solvente dio el compuesto base (100 mg)

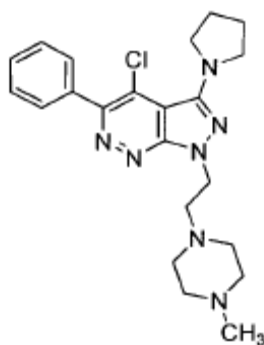
Etapa 2: 1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-3-pirrolidin-1-il-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol



10 A una solución de 3-yodo-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol (120 mg, 0.26 mmol) en dioxano (1.7 mL) y DMSO (0.9 mL) se le añadió pirrolidina (233 μL, 2.8 mmol) y t-butóxido de sodio (37 mg, 0.39 mmol) y se burbujó nitrógeno en la mezcla resultante durante 30 minutos. Después se añadieron Pd₂dba₃ (24 mg, 0.026 mmol) y Xantphos (9 mg, 0.016 mmol), el tubo se purgó con nitrógeno, se selló y se calentó a 100 °C, durante 5 h. Se añadieron pirrolidina (40 μL, 0.49 mmol), Pd₂dba₃ (24 mg, 0.026 mmol) y Xantphos (9 mg, 0.016 mmol) y la mezcla se calentó a 100 °C, durante 1 hora más. La mezcla se dejó enfriar a rt, luego se neutralizó a pH 2-3 antes de cargarla en un cartucho SCX (10 g). El cartucho se eluyó con MeOH y luego con CH₂Cl₂/MeOH (1:1) y finalmente el producto se liberó con amoníaco metanólico al 10% (7 N) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1). La evaporación del solvente dio el compuesto base como un vidrio de color amarillo (94 mg) que se hizo reaccionar como tal en la siguiente etapa.

15

Etapa 3: 4-cloro-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-3-pirrolidin-1-il-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto Iz)



20

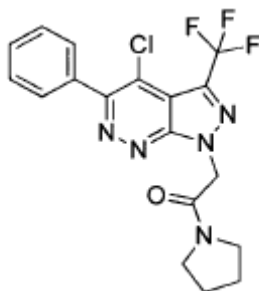
Una suspensión de 1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-5-fenil-3-pirrolidin-1-il-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol (90 mg) en POCl₃ (6 mL) y CH₂Cl₂ (3 mL) se calentó a 60 °C, durante 2.5 h. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre

CH₂Cl₂ y solución acuosa saturada de NaHCO₃. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂, las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto 1z (12 mg).

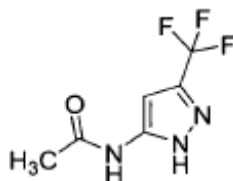
¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.75-7.71 (2 H, m), 7.53-7.43 (3 H, m), 4.69 (2 H, t, J = 6.8 Hz), 3.62-3.55 (4 H, m), 2.94 (2 H, t, J = 6.8 Hz), 2.63 (4 H, br s), 2.40 (4 H, br s), 2.26 (3 H, s), 2.02-1.97 (4 H, m).

LCMS (15cm_Fórmico_ASCENTIS_HPLC_CH3CN) Rt 7.86 min; m/z 426 [M+H] 94.3 % de pureza.

Ejemplo 26: 2-[4-cloro-5-fenil-3-(trifluorometilpirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-pirrolidin-1-il-etanona (compuesto 1aa)



Etapa 1: Síntesis de N-[3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]acetamida



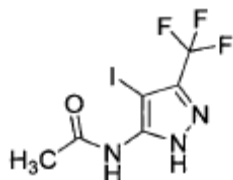
10

Se añadió cloruro de acetilo (7.7 mL, 108 mmol), durante un período de 45 minutos a una solución de 3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-amina (6.5 g, 43 mmol) y N-metilmorfolina (12.3 mL, 112 mmol) en CH₂Cl₂ (160 mL) con enfriamiento en un baño de hielo. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h, el solvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en metanol (150 ml). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió NaOH acuoso al 25% (7.3 mL, 65 mmol). Después de 3.25 h, se añadió NaOH acuoso al 25% (0.5 mL, 4.4 mmol) y la reacción se agitó durante 1.5 h adicionales. Se añadió HCl 2 N (20 ml) y los solventes orgánicos se eliminaron a vacío a menos de 35 °C. Se añadió agua y el producto en bruto luego se extrajo EtOAc (x2) y los extractos se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío. El residuo resultante se suspendió en CH₂Cl₂ (20 ml) con agitación. El sólido se filtró y se lavó con CH₂Cl₂ (2x3 ml) y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (7.3 g) que se usó en la siguiente etapa.

15

20

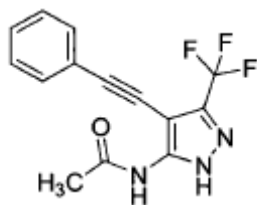
Etapa 2: Síntesis de N-[4-yodo-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]acetamida



A una solución de N-[3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]acetamida (7.3 g, 38 mmol) en etanol (120 mL) se le añadieron ácido yódico (1.65 g, 9.4 mmol) y yodo (4.8 g, 18.9 mmol). La reacción se agitó durante 3.25 horas a 65 °C. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se suspendió en CH₂Cl₂ caliente (150 ml) con agitación, el sólido se filtró y resuspendió en CH₂Cl₂ caliente (100 ml), se filtró y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (8.9 g) que se usó en la siguiente etapa.

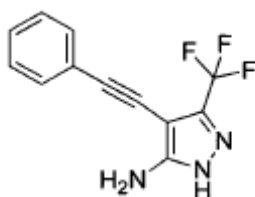
25

Etapa 3: Síntesis de N-[4-(2-feniletinil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]acetamida



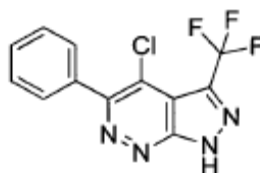
5 Se añadió una solución desgasificada de fenilacetileno (3.9 mL, 35 mmol) y Et₃N (36 mL) en DMF (13.5 mL) a N-[4-yodo-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]acetamida (4.5 g, 14 mmol), CuI (530 mg, 2.8 mmol) y PdCl₂(PPh₃)₂ (980 mg, 1.4 mmol) en una atmósfera de N₂. La reacción se calentó entonces a 85 °C, durante 3.5 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohehexano 1:9 a 1:0) produciendo el compuesto base como un aceite de color marrón (3 g) que se usó en la siguiente etapa.

Etapa 4: Síntesis de 4-(2-feniletinil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-amina



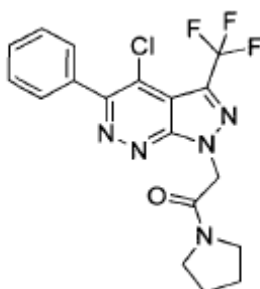
10 Una solución de N-[4-(2-feniletinil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]acetamida (900 mg, 3.07 mmol) en etanol (12 mL) y NaOH al 25% (9 mL) se calentó a 70 °C, durante 1.5 h. La capa orgánica se separó y la acuosa se extrajo con EtOAc (x2). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y el lavado se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron, produciendo el compuesto base como un aceite rojo (652 mg) que se usó en la siguiente etapa.

Etapa 5: Síntesis de 4-cloro-5-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



15 A una suspensión agitada, fría (baño de enfriamiento -15 °C) de nitrito de sodio (540 mg, 7.8 mmol) en HCl concentrado (20 mL) se le añadió una solución de 4-(2-feniletinil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-amina (652 mg, 2.6 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL). El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h. Se añadió NaCl (900 mg) y la reacción se calentó a 50 °C, durante 16 h. Se añadió CH₂Cl₂ a la mezcla de reacción
20 enfriada. La fase acuosa se extrajo dos veces con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohehexano 1:9 a 1:0) produciendo el compuesto base como un vidrio de color amarillo (115 mg) que se usó en la siguiente etapa.

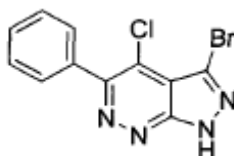
25 Etapa 6: Síntesis de 2-[4-cloro-5-fenil-3-(trifluorometil)pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]-1-pirrolidin-1-il-etanona (compuesto laa)



5 Se añadió hidruro de sodio (18 mg, 0.45 mmol) a una solución de 4-cloro-5-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (115 mg, 0.38 mmol) y 2-cloro-1-pirrolidin-1-il-etanona (81 mg, 0.55 mmol) en DMF seco (1.5 mL) y la reacción se agitó durante 21 h. Se añadieron agua y CH₂Cl₂ y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohehexano 2:8 a 1:0) seguido de HPLC preparativa produciendo el compuesto laa como un sólido de color blanco (23 mg).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.64 min; m/z 410 [M+H] 97.54 % de pureza.

Ejemplo 27: 3-bromo-4-cloro-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c]piridazina (compuesto lbb)

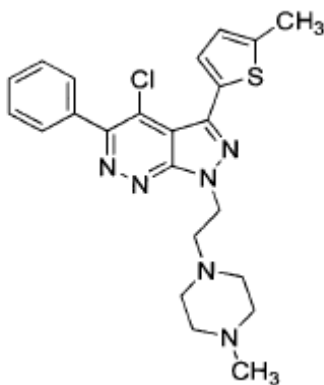


10 Una mezcla de 4-cloro-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (155 mg, 0.67 mmol), bromo (51 μL, 1 mmol) y trietilamina (98 μL, 0.7 mmol) en cloroformo (4 mL) se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h. Se añadieron bromo adicional (25 μL) y cloroformo (4 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 4 h. Se añadieron más bromo (25 μL) y trietilamina (98 μL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y una solución de bicarbonato de sodio. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas combinadas se secaron (cartucho separador de fases) y se concentraron a vacío. El residuo resultante se purificó usando cromatografía (gel de sílice, acetato de etilo/isohehexano 0: 1 a 1:1), para proporcionar el compuesto lbb como un sólido (97 mg).

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 11.75 (1 H, s), 7.79-7.70 (2 H, m), 7.59-7.51 (3 H, m).

LCMS (10cm_Fórmico_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 11.27 min; m/z 309 [M+H] 98.07 % de pureza.

20 Ejemplo 28: 4-cloro-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-3-(5-metil-2-tienil)-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto lcc)

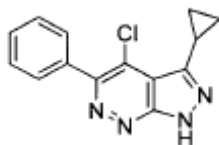


El compuesto lcc se sintetizó siguiendo procedimientos similares delineados en el ejemplo 1, pero usando ácido (5-metil-2-tienil) borónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolo en la etapa 8.

25 ¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.67 (2 H, m), 7.43 (3 H, m), 7.36 (1 H, m), 6.72 (1 H, s), 4.79 (2 H, t), 2.96 (2 H, t), 2.61 (4 H, br s), 2.50-2.38 (7 H, m), 2.23 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.92 min; m/z 453 [M+H] 90.98 % de pureza.

Ejemplo 29: 4-cloro-3-ciclopropil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto ldd)

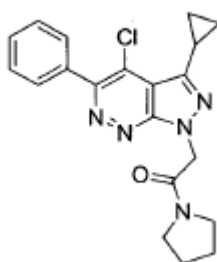


El compuesto Idd se sintetizó según el ejemplo 19, excepto usando 3-ciclopropil-1H-pirazol-5-amina en lugar de 3-metil-1H-pirazol-5-amina.

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 10.71 (1 H, s), 7.80-7.76 (2 H, m), 7.57-7.49 (3 H, m), 2.64-2.56 (1 H, m), 1.17-1.11 (4 H, m).

5 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.76 min; m/z 271 [M+H] 98.22 % de pureza.

Ejemplo 30: 2-(4-cloro-3-ciclopropil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)-1-pirrolidin-1-il-etanona (compuesto lee)

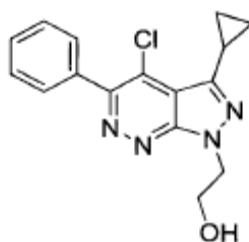


10 Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 18 mg, 0.44 mmol) a una solución de 4-cloro-3-ciclopropil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (100 mg, 0.37 mmol) y 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona (82 mg, 0.55 mmol) en DMF seco (3 mL) a temperatura ambiente, durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con agua, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, CH_2Cl_2 /éter dietílico 8: 2) para proporcionar el compuesto lee como un sólido (65 mg).

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d) 7.76 (2 H, m), 7.56-7.45 (3 H, m), 5.39 (2 H, s), 3.65-3.57 (2 H, m), 3.54-3.45 (2 H, m), 2.61-2.53 (1 H, m), 2.11-2.01 (2 H, m), 1.94-1.84 (2 H, m), 1.20-1.04 (4 H, m).

15 LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.44 min; m/z 382 [M+H] 97.47 % de pureza.

Ejemplo 31: 2-(4-cloro-3-ciclopropil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)etanol (compuesto lff)

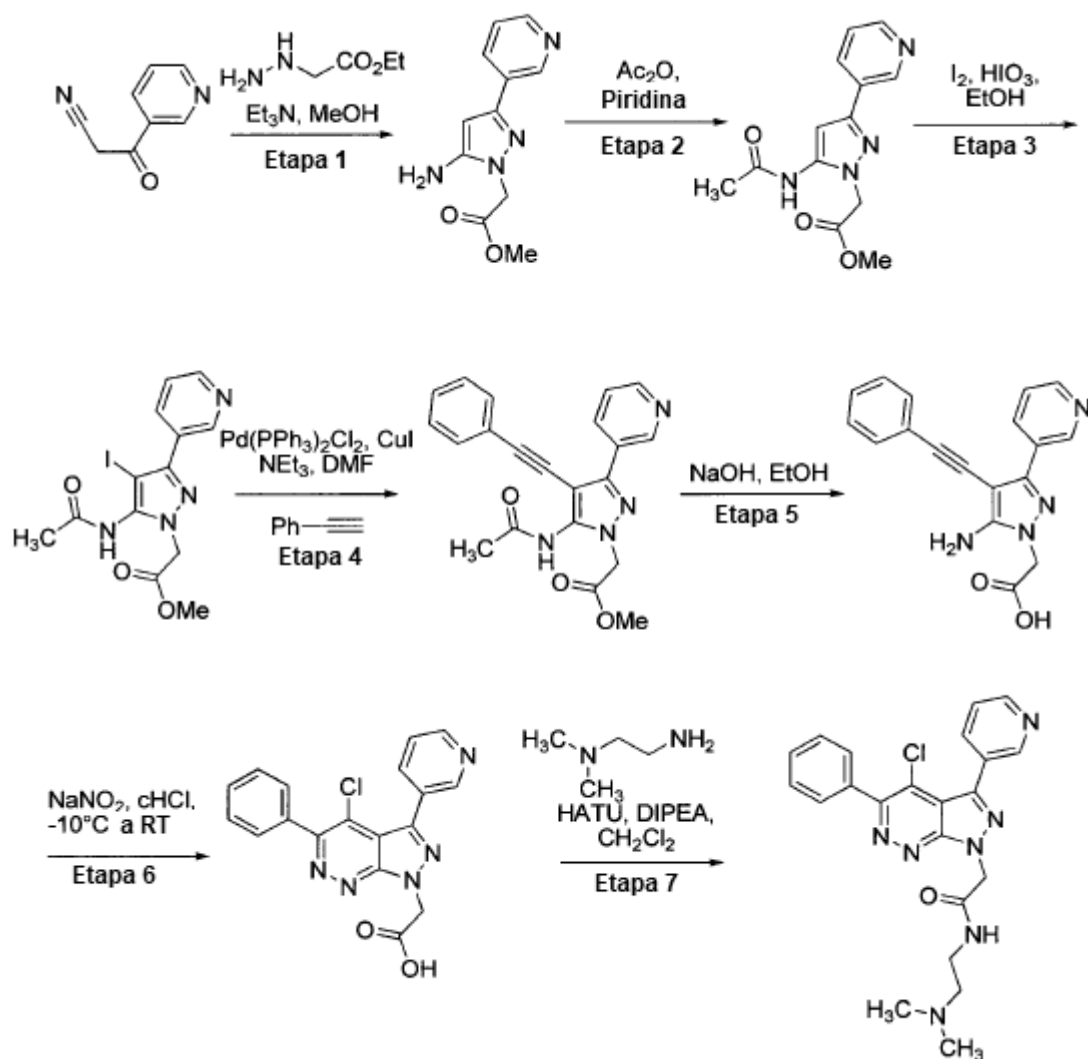


El compuesto lff se sintetizó según el ejemplo 55, etapa 4, como se describe a continuación, pero usando 2-(5-amino-3-ciclopropil-pirazol-1-il)acetato de etilo en lugar de 2-(5-amino-3-fenil-pirazol-1-il)acetato de etilo en la etapa 1.

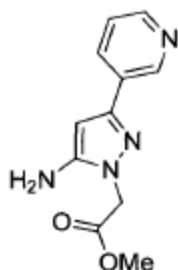
20 ^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 7.79-7.75 (2 H, m), 7.57-7.49 (3 H, m), 4.79 (2 H, t), 4.21-4.15 (2 H, m), 3.18 (1 H, t), 2.61-2.56 (1 H, m), 1.14-1.09 (4 H, m).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR HPLC_CH3CN) Rt 11.06 min; m/z 315 [M+H] 90.2 % de pureza.

Ejemplo 32: 2-[4-cloro-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]-N-(2-dimetilaminoetil)acetamida (compuesto lgg)



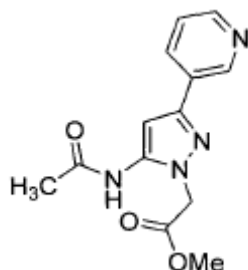
Etapa 1: 2-[5-amino-3-(3-piridil)pirazol-1-il]acetato de metilo



5

Una mezcla de 3-oxo-3-piridin-3-ilpropano nitrilo (1.31 g, 9 mmol), clorhidrato de hidrazinoacetato de etilo (1.39 g, 9 mmol) en metanol (9 mL) se calentó bajo irradiación de microondas a 120°C , durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo) produciendo el compuesto base como un sólido (510 mg).

Etapa 2: 2-[5-acetamido-3-(3-piridil)pirazol-1-il]acetato de metilo

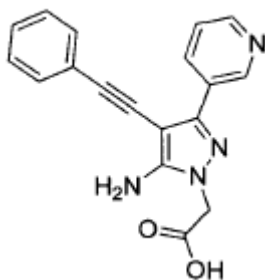


5 Se añadió anhídrido acético (431 mL, 4.4 mmol) gota a gota a una solución de 2- [5-amino-3- (3-piridil) pirazol-1-il] acetato de metilo (510 mg, 2.2 mmol) en piridina (1.7 mL) a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras la adición completa, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con éter dietílico para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (430 mg).

Etapa 3 y 4: 2-[5-acetamido-4-(2-feniletinil)-3-(3-piridil)pirazol-1-il]acetato de metilo

Se sintetizó 2- [5-acetamido-4- (2-feniletinil) -3- (3-piridil) pirazol-1-il] acetato de metilo según el ejemplo 55, etapas 2 y 3, como se describe a continuación, pero usando 2- [5-acetamido-3- (3-piridil) pirazol-1-il] acetato de metilo.

Etapa 5: ácido 2-[5-amino-4-(2-feniletinil)-3-(3-piridil)pirazol-1-il]acético

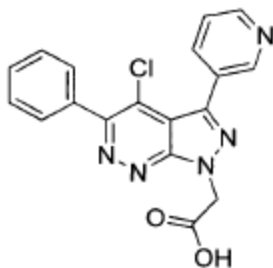


10

A una suspensión de 2-[5-acetamido-4-(2-feniletinil)-3-(3-piridil)pirazol-1-il] acetato de etilo (410 mg, 1.1 mmol) en etanol (10 mL) se añadió una solución acuosa de NaOH al 25% (6.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 85 °C, durante 6 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el etanol se evaporó a vacío. La suspensión acuosa resultante se filtró y el sólido se lavó con acetonitrilo y se secó, produciendo 235 mg de ácido 2-[5-amino-4-(2-feniletinil)-3-(3-piridil) pirazol-1-il] acético.

15

Etapa 6: ácido 2-[4-cloro-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]acético

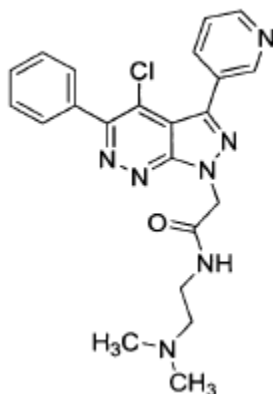


20

Se añadió nitrito de sodio (185 mg, 2.67 mmol) en porciones a CHCl_3 (5 mL) a 0 °C y se agitó durante 20 minutos. Se añadió ácido 2-[5-amino-4-(2-feniletinil)-3-(3-piridil)pirazol-1-il]acético (285 mg, 0.89 mmol) como un sólido. La mezcla de reacción se dejó calentar y se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró y el pH del licor madre acuoso se ajustó a 2 con bicarbonato de sodio y HCl 1N. El licor madre acuoso se extrajo con CH_2Cl_2 tres veces y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron. El residuo se trituró en éter dietílico, produciendo 88 mg de un sólido, que consta de 2-[4-cloro-5-fenil-3-(3-piridil) pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]acético a una pureza estimada del 35% por LC/MS, que se usó como tal en la siguiente etapa.

25

Etapa 7: 2-[4-cloro-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]-N-(2-dimetilaminoetil)acetamida (compuesto Igg)

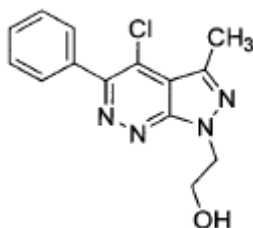


5 Una mezcla de 2-[4-cloro-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]acético (88 mg, 35% de pureza, 0.084 mmol), DIPEA (67 μ L, 0.38 mmol), HATU (112 mg, 0.30 mmol) y 2-(dimetilamino)etilamina (32 μ L, 0.30 mmol) en CH_2Cl_2 se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 . La capa orgánica combinada se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto lgg. (8 mg)

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 9.05 (1 H, d), 8.72 (1 H, dd), 8.48 (1 H, s), 8.13 (1 H, dt), 7.75-7.71 (2 H, m), 7.56-7.47 (3 H, m), 7.44 (1 H, dd), 5.53 (2 H, s), 3.67-3.59 (2 H, m), 2.98 (2 H, t), 2.64 (6 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 2.79 min; m/z 436 [M+H] 95.24 % de pureza.

10 Ejemplo 33: 2-(4-cloro-3-metil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)etanol (compuesto lhh)

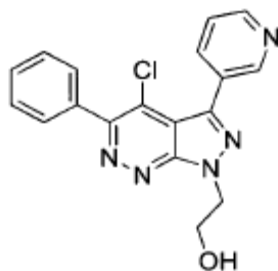


El compuesto lhh fue según el ejemplo 55, etapa 4, como se describe a continuación, pero usando 2-(5-amino-3-metilpirazol-1-il)acetato de etilo en lugar de 2-(5-amino-3-fenil-pirazol-1-il)acetato de etilo en la etapa 1.

15 ^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 7.78-7.75 (2 H, m), 7.56-7.49 (3 H, m), 4.85-4.80 (2 H, m), 4.24-4.18 (2 H, m), 3.13-3.08 (1 H, m), 2.81 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.35 min; m/z 289 [M+H] 95.23 % de pureza.

Ejemplo 34: 2-[4-cloro-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]etanol (compuesto III)

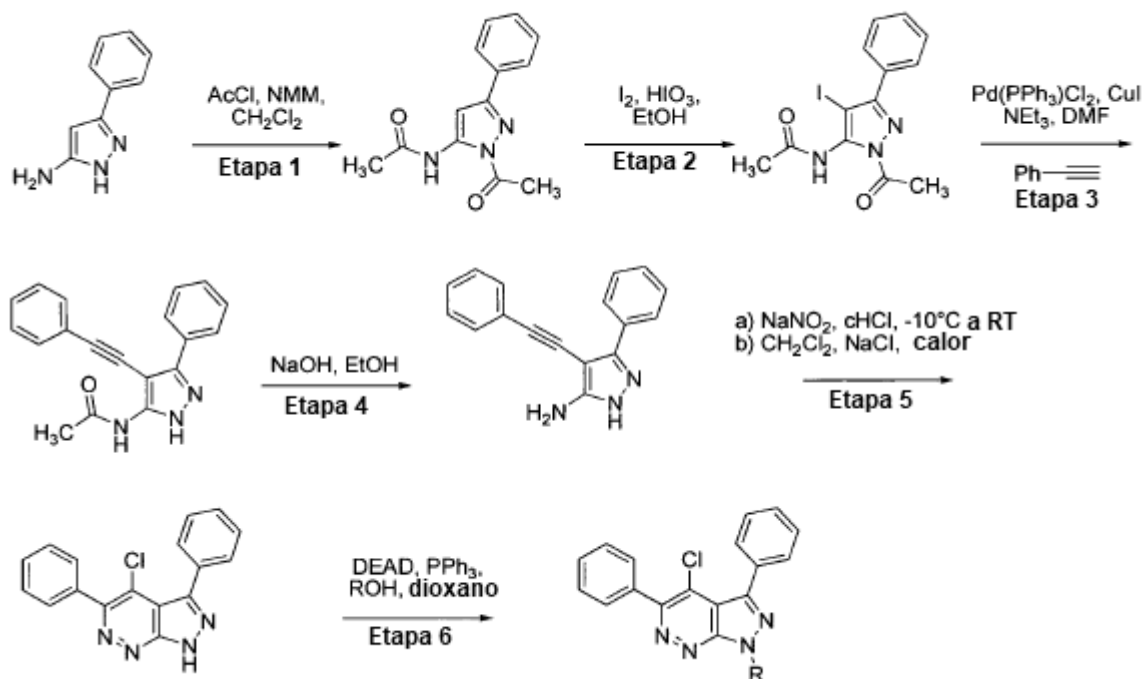


20 El compuesto III se sintetizó según el ejemplo 69, como se muestra a continuación, pero usando 2-hidroxi-etil-hidrazina en lugar de metil-hidrazina en la etapa 3.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 9.04 (1 H, s), 8.73 (1 H, m), 8.11 (1 H, m), 7.76 (2 H, m), 7.54 (3 H, m), 7.45 (1 H, m), 5.01 (2 H, m), 4.31 (2 H, m), 2.92 (1 H, s).

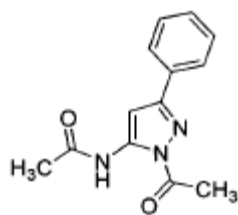
LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 3.1 min; m/z 352 [M+H] 98.44 % de pureza.

Esquema III: Esquema general de síntesis de los compuestos de fórmula II



5 Ejemplo 35: 4-cloro-1-[(3-metilimidazol-4-il)metil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIa)

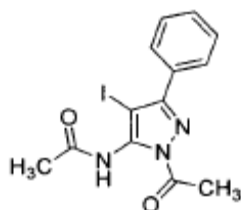
Etapa 1: N-(2-acetil-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida



10

A una solución de 5-fenil-1H-pirazol-3-amina (18.6 g, 0.117 mol) y N-metilmorfolina (30.8 mL, 0.281 mol) en CH_2Cl_2 (250 mL) se añadió cloruro de acetilo (20 mL, 0.281 mol) gota a gota a 0°C en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. Se añadió éter dietílico al residuo y el sólido se recogió por filtración, produciendo el compuesto base como un sólido (25.1 g).

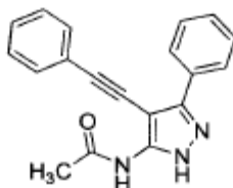
Etapa 2: N-(2-acetil-4-yodo-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida



15

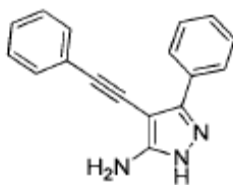
Una suspensión de N-(2-acetil-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida (25.1 g, 0.103 mol), ácido yódico (4.5 g, 0.026 mol) y yodo (15.7 g, 0.062 mol) en etanol (250 mL) se calentó a 50 °C, durante 3 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se repartió entre CH₂Cl₂ y solución acuosa de Na₂S₂O₃ 2 M. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío para proporcionar una mezcla del compuesto base y el material de partida (2.2: 1, 30.3 g). La mezcla se puso en reacción nuevamente usando ácido yódico (1.6 g, 9.6 mmol) y yodo (9.7 g, 0.038 mol) en etanol (250 mL) en las mismas condiciones, para proporcionar el compuesto base como un sólido (31.9 g).

Etapa 3: N-[3-fenil-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-il]acetamida



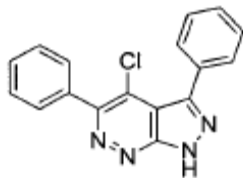
Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de N-(2-acetil-4-yodo-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida (31.87 g, 86.4 mmol), fenilacetileno (17.6 g, 173 mmol), trietilamina (200 mL) y DMF (100 mL), durante 15 minutos. Se añadieron yoduro de cobre (1.64 g, 8.6 mmol) y dicloruro de bis (trifenilfosfina) paladio (II) (3.0 g, 4.3 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C bajo nitrógeno durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexanos/acetato de etilo 5:1 a 1:1) produciendo el compuesto base como un sólido (12.5 g).

Etapa 4: 3-fenil-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-amina



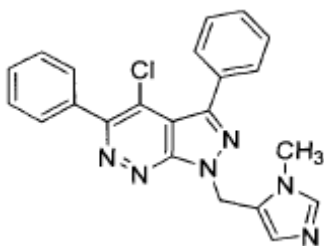
Una mezcla de N-[3-fenil-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-il]acetamida (12.5 g, 42 mmol), etanol (100 mL) y solución acuosa de NaOH al 25% (100 mL) se agitó y se calentó a 90 °C, durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. Se añadió éter dietílico al residuo y el sólido se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (5.4 g).

Etapa 5: 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



Se añadió nitrito de sodio (2.88 g, 42 mmol) en porciones a cHCl (314 mL) a -15 °C y se agitó durante 15 minutos. Se añadió 3-fenil-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-amina (5.4 g, 21 mmol) como un sólido, seguido de la adición de CH₂Cl₂ (10 mL). La mezcla de reacción se dejó calentar y se agitó a temperatura ambiente, durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (44 mL) y se añadió NaCl (2.7 g). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C, durante 1 d. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexanos/acetato de etilo 4:1, luego CH₂Cl₂/acetato de etilo 1:0 a 4:1) produciendo el compuesto base como un sólido (3.0 g).

Etapa 6: 4-cloro-1-[(3-metilimidazol-4-il)metil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIa)



5 Una mezcla de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (100 mg, 0.33 mmol), 1-metil-1H-imidazol-5-il) metanol (73 mg, 0.65 mmol), azodicarboxilato de dietilo (114 mg, 0.65 mmol) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4 - dioxano (2 mL) se calentó usando irradiación de microondas a 100 °C, durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto IIa (46 mg).

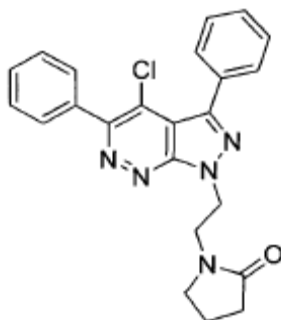
¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.77-7.70 (4 H, m), 7.56-7.46 (7 H, m), 7.37 (1 H, s), 5.97 (2 H, s), 3.91 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.88 min; m/z 401 [M+H] 94.62% de pureza.

Ejemplo 36: procedimiento general para la reacción de Mitsunobu:

10 Una mezcla de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmol), el alcohol (0.65 mmol), azodicarboxilato de dietilo (114 mg, 0.65 mmol) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL) se calentó usando irradiación de microondas a una temperatura entre 85 y 120 °C, durante un período de 30 a 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto base.

Ejemplo 37: 1-[2-(4-cloro-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)etil] pirrolidin-2-ona (compuesto IIb)

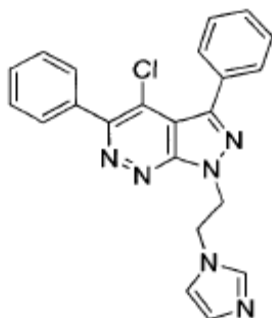


15 El compuesto IIb se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 1-(2-hidroxietil) pirrolidin-2-ona siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.78-7.73 (4 H, m), 7.56-7.48 (6 H, m), 4.98 (2 H, t), 3.95 (2 H, t), 3.49 (2 H, t), 2.16 (2 H, t), 2.01-1.90 (2 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.16 min; m/z 418 [M+H] 99.69% de pureza.

20 Ejemplo 38: 4-cloro-1-(2-imidazol-1-ilet)l)-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIc)



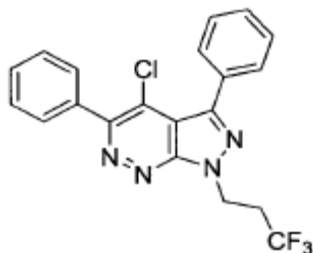
ES 2 687 854 T3

El compuesto IIc se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(1H-imidazol-1-il)etanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.76-7.71 (4 H, m), 7.55-7.48 (6 H, m), 7.31 (1 H, s), 6.98 (1 H, d), 6.96 (1 H, d), 5.16 (2 H, t), 4.72 (2 H, t).

5 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.38 min; m/z 401 [M+H] 98.08% de pureza

Ejemplo 39: 4-cloro-3,5-difenil-1-(3,3,3-trifluoropropil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIc)

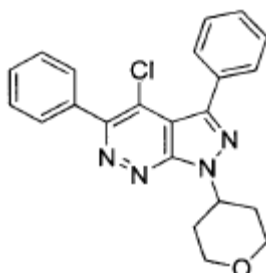


El compuesto IIc se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 3,3,3-trifluoropropan-1-ol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

10 $^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.79-7.74 (4 H, m), 7.56-7.47 (6 H, m), 5.09 (2 H, t), 3.07-2.94 (2 H, m).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 13.00 min; m/z 403 [M+H] 97.24% de pureza.

Ejemplo 40: 4-cloro-3,5-difenil-1-tetrahidropiran-4-il-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIe)

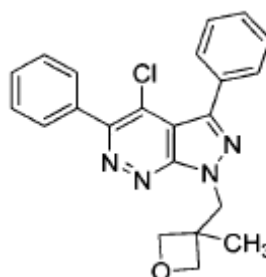


15 El compuesto IIe se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y tetrahydro-2Hpiran-4-ol siguiendo el procedimiento general de la reacción de Mitsunobu.

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.80-7.75 (4 H, m), 7.56-7.46 (6 H, m), 5.52-5.46 (1 H, m), 4.23-4.19 (2 H, m), 3.71 (2 H, td), 2.60-2.54 (2 H, m), 2.18-2.14 (2 H, m).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 13.06 min; m/z 391 [M+H] 96.12% de pureza.

Ejemplo 41: 4-cloro-1-[(3-metiloxetan-3-il)metil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIf)



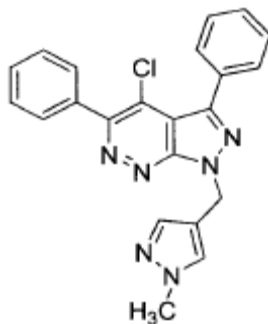
20

El compuesto IIf se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y (3-metiloxetan-3-il)metanol siguiendo el procedimiento general de la reacción de Mitsunobu.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.79-7.74 (4 H, m), 7.56-7.48 (6 H, m), 5.02 (2 H, s), 4.95 (2 H, d), 4.50 (2 H, d), 1.40 (3 H, s).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.19 min; m/z 391 [M+H] 94.86% de pureza.

Ejemplo 42: 4-cloro-1-[(1-metilpirazol-4-il)metil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIg)



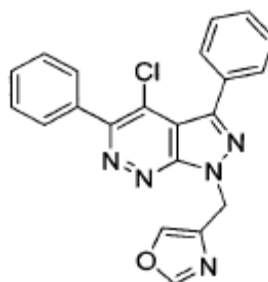
5

Compuesto IIg se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y (1-metil-1H-pirazol-4-il)metanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.73 (4 H, m), 7.67 (1 H, s), 7.64 (1 H, s), 7.55-7.46 (6 H, m), 5.86 (2 H, s), 3.85 (3 H, s).

LCMS (10cm_Fórmico_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 12.26 min; m/z 401 [M+H] 95.22% de pureza.

10 Ejemplo 43: 4-[(4-cloro-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]-piridazin-1-il)metil]oxazol (compuesto IIh)

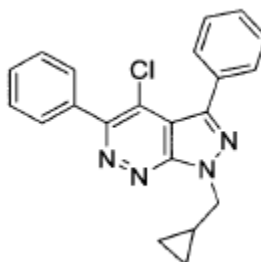


El compuesto IIh se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y oxazol-4-ilmetanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.85 (1 H, s), 7.83 (1 H, d, J = 1.12 Hz), 7.79-7.75 (4 H, m), 7.56-7.46 (6 H, m), 5.97 (2 H, s).

15 LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.81 min; m/z 388 [M+H] 93.58% de pureza.

Ejemplo 44: 4-cloro-1-(ciclopropilmetil)-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto III)

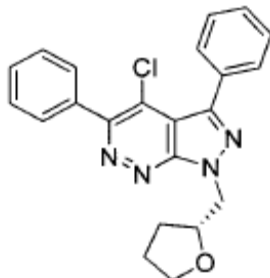


El compuesto III se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y ciclopropilmetanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.81-7.76 (4 H, m), 7.55-7.45 (6 H, m), 4.69 (2 H, d), 1.62-1.58 (1 H, m), 0.65-0.61 (4 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.77 min; m/z 361 [M+H] 96.25% de pureza.

Ejemplo 45: 4-cloro-3,5-difenil-1-[(2R)-tetrahydrofuran-2-il]metil pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIj)

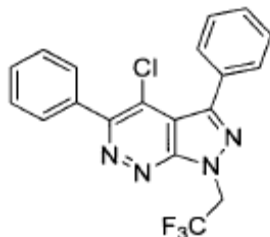


5 El compuesto IIj se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y R)-(tetrahydrofuran-2-il)metanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.80-7.76 (4 H, m), 7.55-7.44 (6 H, m), 4.97 (1 H, dd), 4.78-4.64 (2 H, m), 3.99 (1 H, q), 3.83-3.74 (1 H, m), 2.16-2.03 (1 H, m), 2.03-1.80 (3 H, m).

LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 12.93 min; m/z 391 [M+H] 92.23% de pureza.

10 Ejemplo 46: 4-cloro-3,5-difenil-1-(2,2,2-trifluoroetil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIk)

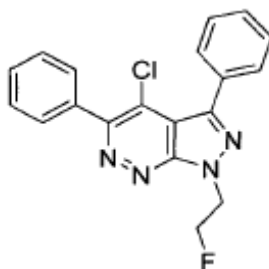


El compuesto IIk se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2,2,2-trifluoroetanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.81-7.75 (4 H, m), 7.58-7.50 (6 H, m), 5.40 (2 H, q).

15 LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 12.89 min; m/z 389 [M+H] 97.09% de pureza.

Ejemplo 47: 4-cloro-1-(2-fluoroetil)-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto III)

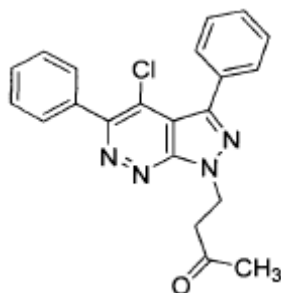


El compuesto III se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-fluoroetanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

20 ^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.80-7.75 (4 H, m), 7.56-7.49 (6 H, m), 5.18-5.07 (3 H, m), 5.01 (1 H, t).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.05 min; m/z 353 [M+H] 96.03% de pureza.

Ejemplo 48: 4-(4-cloro-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)butan-2-ona (compuesto IIIm)

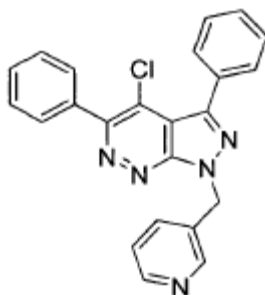


El compuesto IIIm se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 4-hidroxiбутан-2-ona siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

5 ^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.73 (4 H, m), 7.56-7.45 (6 H, m), 5.09 (2 H, t), 3.34 (2 H, t), 2.26 (3 H, s).

LCMS (10cm_Fórmico_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 12.5 min; m/z 377 [M+H] 95.07% de pureza.

Ejemplo 49: 4-cloro-3,5-difenil-1-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIIn)

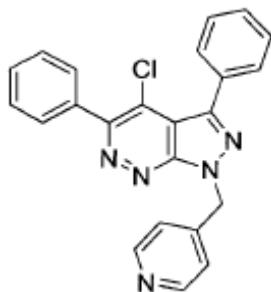


10 Compuesto IIIn se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y piridin-3-ilmetanol siguiendo el procedimiento general de la reacción de Mitsunobu.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 8.85 (1 H, d), 8.57 (1 H, dd), 7.93 (1 H, dt), 7.79-7.73 (4 H, m), 7.56-7.48 (6 H, m), 7.31-7.27 (1 H, m), 6.00 (2 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.03 min; m/z 398 [M+H] 97.31% de pureza.

Ejemplo 50: 4-cloro-3,5-difenil-1-(4-piridilmetil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIo)



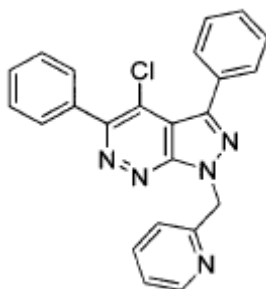
15

El compuesto IIo se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y piridin-4-ilmetanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 8.60 (2 H, dd), 7.79-7.75 (4 H, m), 7.56-7.48 (6 H, m), 7.39 (2 H, d), 5.98 (2 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 3.77 min; m/z 398 [M+H] 97.2% de pureza.

Ejemplo 51: 4-cloro-3,5-difenil-1-(2-piridilmetil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIp)

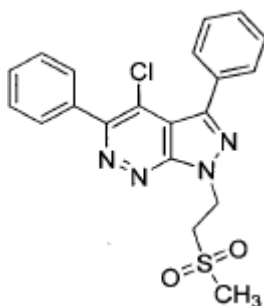


El compuesto IIp se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y piridin-2-ilmetanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

5 $^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 8.60-8.57 (1 H, m), 7.80-7.75 (4 H, m), 7.68-7.62 (1 H, m), 7.55-7.46 (7 H, m), 7.23-7.20 (1 H, m) 6.15 (2 H, s).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.05 min; m/z 398 [M+H] 95.92% de pureza.

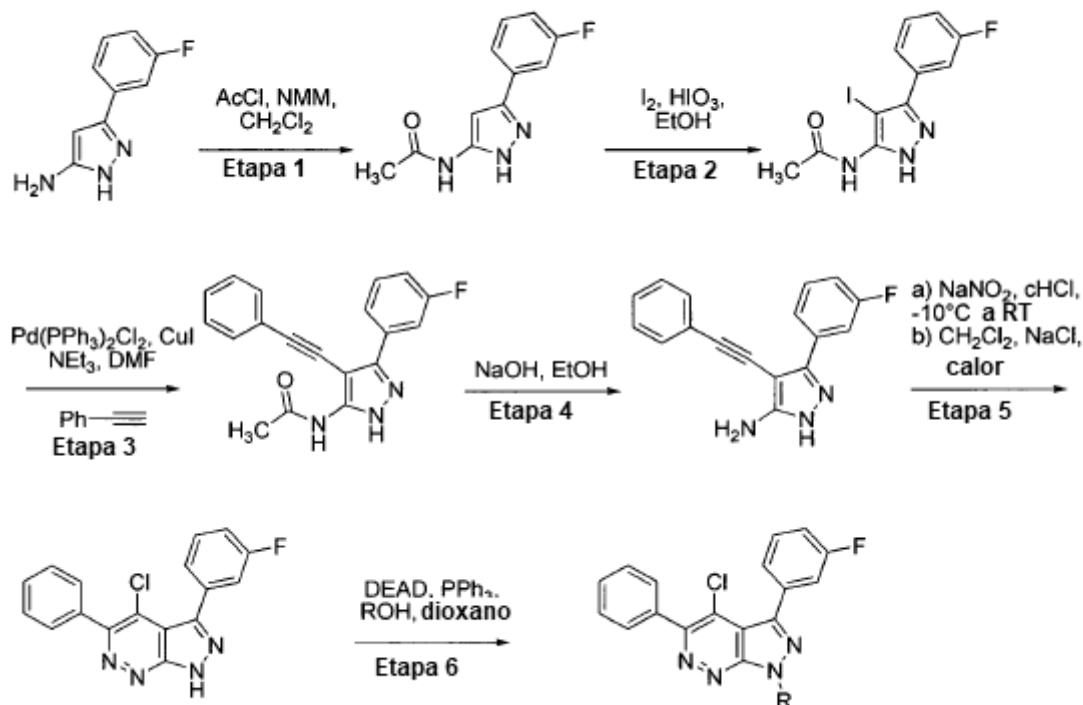
Ejemplo 52: 4-cloro-1-(2-metilsulfoniletil)-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIq)



10 El compuesto IIq se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(metilsulfonyl) etanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

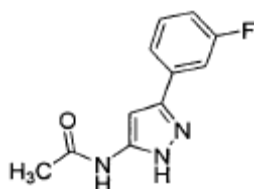
$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.74 (4 H, m), 7.56-7.48 (6 H, m), 5.34-5.29 (2 H, m), 3.88 (2 H, t), 3.05 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.13 min; m/z 413 [M+H] 97.31% de pureza.

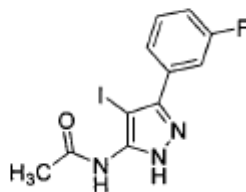
Esquema IV: Esquema general de síntesis de los compuestos de fórmula II

Ejemplo 53: 1-[2-[4-cloro-3-(3-fluorofenil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)etil]pirrolidin-2-ona (compuesto IIr)

Etapa 1: N-[3-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-il]acetamida

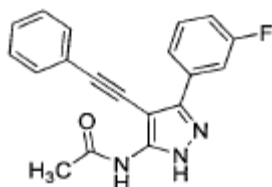


- 5 A una solución de 3-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-amina (6.5 g, 36 mmol) y N-metilmorfolina (9.7 mL, 88 mmol) en CH_2Cl_2 (150 mL) se le añadió cloruro de acetilo (6 mL, 85 mmol) gota a gota a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 1 d. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Se añadieron MeOH (50 mL) y THF (50 mL) al residuo, seguido de la adición de una solución de NaOH (solución acuosa 2.5 M, 42.5 mL) a 0°C . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 15 minutos y se añadió una solución de HCl hasta que el pH alcanzó ~ 6 . Los solventes orgánicos se evaporaron a vacío. El sólido de la suspensión acuosa resultante se recogió por filtración, produciendo el compuesto base como un sólido (7.6 g).

Etapa 2: N-[3-(3-fluorofenil)-4-yodo-1H-pirazol-5-il]acetamida

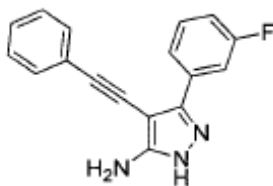
Una suspensión de N-[3-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-il]acetamida (7.6 g, 34.7 mmol), ácido yódico (1.5 g, 8.5 mmol) y yodo (4.4 g, 17.3 mmol) en etanol (200 mL) se calentó a 60 °C, durante 1 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se repartió entre CH₂Cl₂ y solución acuosa de Na₂S₂O₃ 2 M. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (10.8 g).

Etapa 3: N-[3-(3-fluorofenil)-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-il]acetamida



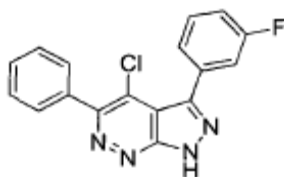
Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de N-[3-(3-fluorofenil)-4-yodo-1H-pirazol-5-il]acetamida (10.8 g, 44 mmol), fenilacetileno (12.5 g, 123 mmol), trietilamina (100 mL) y DMF (40 mL), durante 15 min. Se añadieron yoduro de cobre (840 mg, 4.42 mmol) y dicloruro de bis(trifenilfosfina) paladio (II) (1.5 g, 2.1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C bajo nitrógeno durante 6 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 1:0 a 0:1) produciendo el compuesto base como un sólido (4 g).

Etapa 4: 3-(3-fluorofenil)-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-amina



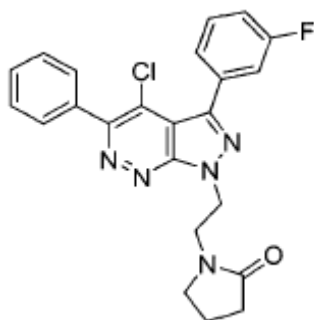
Una mezcla de N-[3-(3-fluorofenil)-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-il]acetamida (2 g, 6.2 mmol), etanol (22 mL) y solución acuosa de NaOH al 25% (22 mL) se agitó y calentó a 80 °C, durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido (1.2 g).

Etapa 5: 4-cloro-3-(3-fluorofenil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



Se añadió nitrito de sodio (740 mg, 10.7 mmol) en porciones a CHCl₃ (24 mL) a -15 °C y se agitó durante 15 minutos. Se añadió 3-(3-fluorofenil)-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-amina (1 g, 3.6 mmol) como un sólido, seguido de la adición de CH₂Cl₂ (10 mL). La mezcla de reacción se dejó calentar y se agitó a temperatura ambiente, durante 1.5 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (20 mL) y se añadió NaCl (0.5 g). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C, durante 1 d. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohexano 0:1 a 7:3) produciendo el compuesto base como un sólido (500 mg).

Etapa 6: 1-[2-[4-cloro-3-(3-fluorofenil)-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il]etil]pirrolidin-2-ona (compuesto IIr)

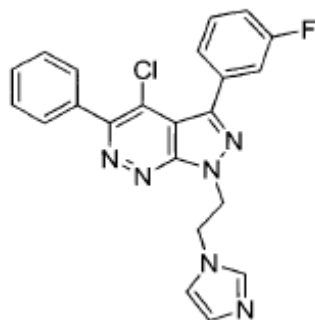


El compuesto IIr se sintetizó a partir de 4-cloro-3-(3-fluorofenil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 1-(2-hidroxietil)pirrolidin-2-ona siguiendo el procedimiento general de la reacción de Mitsunobu como se describe.

¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.77-7.74 (2 H, m), 7.59-7.51 (4 H, m), 7.51-7.43 (2 H, m), 7.22-7.16 (1 H, m), 4.98 (2 H, t), 3.94 (2 H, t), 3.51 (2 H, t), 2.14 (2 H, t), 2.02-1.92 (2 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.92 min; m/z 436 [M+H] 99.49% de pureza.

Ejemplo 54: 4-cloro-3-(3-fluorofenil)-1-(2-imidazol-1-iletíl)-5-fenil-pirazolo [3,4-c]piridazina (compuesto IIs)

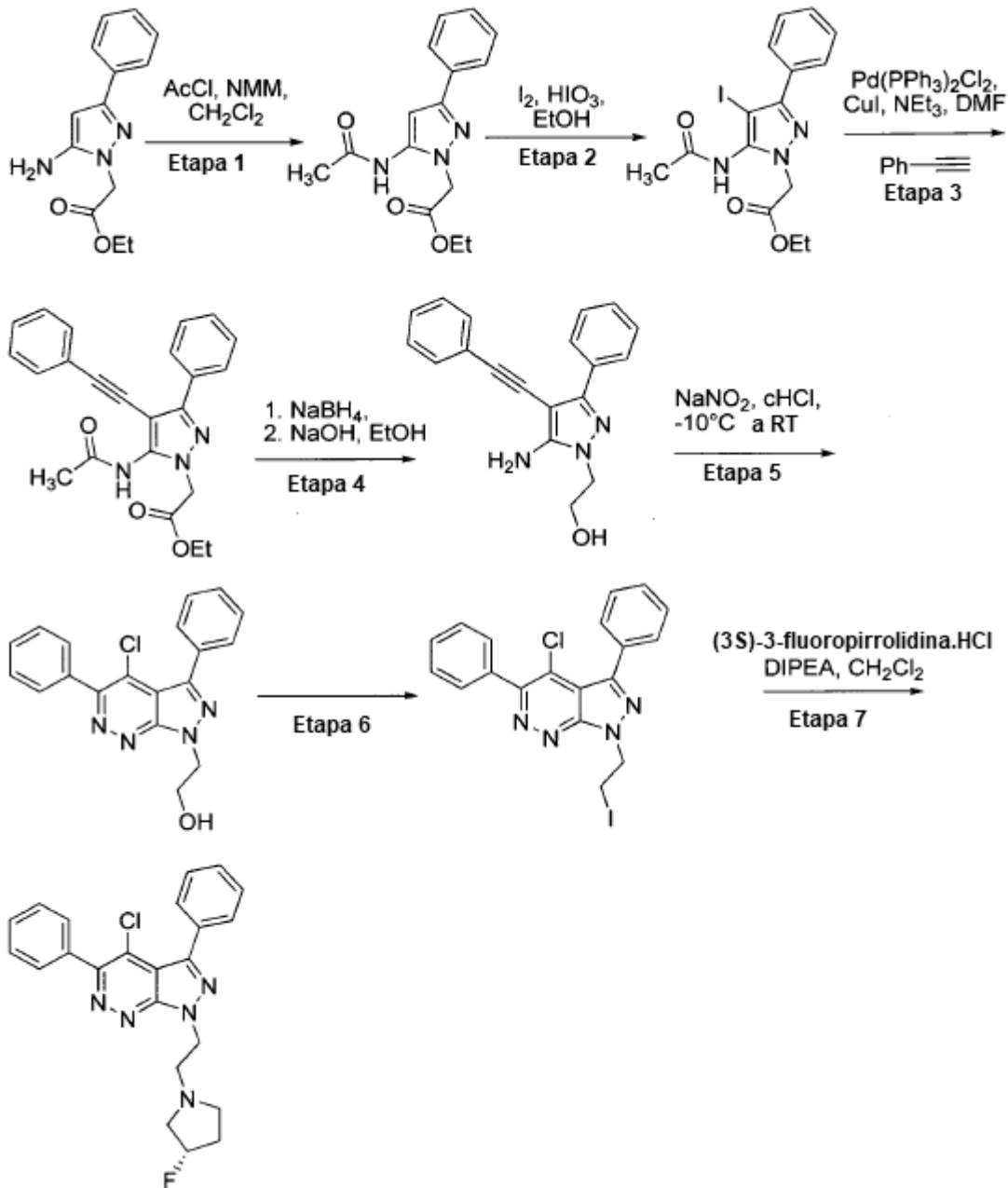


El compuesto IIs se sintetizó a partir de 4-cloro-3-(3-fluorofenil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(1H-imidazol-1-il)etanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrito anteriormente.

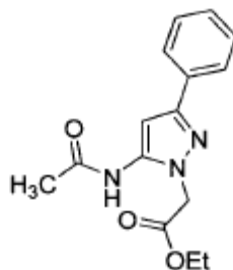
¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.77-7.73 (2 H, m), 7.55-7.46 (6 H, m), 7.36 (1 H, s), 7.31-7.23 (1 H, m), 7.01-6.99 (1 H, m), 6.97 (1 H, s), 5.17 (2 H, t), 4.72 (2 H, t).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.85 min; m/z 419 [M+H] 92.97 % de pureza.

Ejemplo 55: 4-cloro-1-[2-[(3S)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIr)



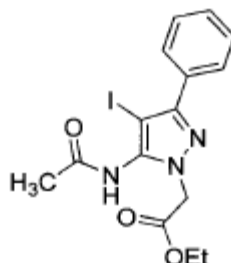
Etapa 1: 2-(5-acetamido-3-fenil-pirazol-1-il)acetato de etilo



5 Se añadió anhídrido acético (12.7 mL, 134.8 mmol) gota a gota a una solución de 2- (5-amino-3-fenil-pirazol-1-il) acetato de etilo (31.5 g, 128.4 mmol) en piridina (200 mL) a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras la adición completa, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró al

vacío. El residuo se diluyó en CH_2Cl_2 (250 mL). La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se trituró en éter dietílico, se filtró y se secó para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (34.81 g).

Etapa 2: 2-(5-acetamido-4-yodo-3-fenil-pirazol-1-il)acetato de etilo

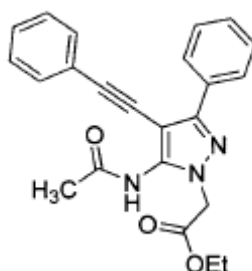


5

10

Una suspensión de 2-(5-acetamido-3-fenil-pirazol-1-il) acetato de etilo (34.81 g, 60.6 mmol), ácido yódico (5.33 g, 30.3 mmol) y yodo (15.37 g, 60.6 mmol) en etanol (250 mL) se calentó a 50 °C, durante 1.5 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (250 mL). La solución se lavó dos veces con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2 M seguido de solución de salmuera. La capa orgánica se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se trituró en éter dietílico, se filtró y se secó para proporcionar el compuesto base como un sólido (44.13 g).

Etapa 3: etil 2-[5-acetamido-3-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-1-il]acetato

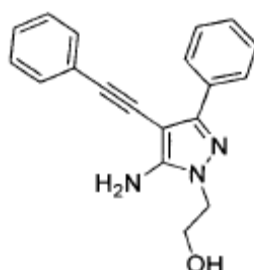


15

20

Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de 2-(5-acetamido-4-yodo-3-fenil-pirazol-1-il) acetato de etilo (34.95 g, 84.58 mmol), fenilacetileno (18.6 mL, 169.16 mmol), trietilamina (300 mL) y DMF (120 mL), durante 1.5 h. Se añadieron yoduro de cobre (1.61 g, 8.46 mmol) y dicloruro de bis(trifenilfosfina) paladio (II) (3 g, 4.23 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C bajo nitrógeno durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío, y el residuo se coevaporó con tolueno para eliminar el exceso de DMF. El residuo se diluyó con acetato de etilo (300 mL) y se lavó con agua (2 x 100 mL). La fase orgánica se filtró a través de celite, se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se trituró en acetato de etilo, produciendo el compuesto base como un sólido (25.67 g).

Etapa 4: 2-[5-Amino-3-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-1-il]etanol

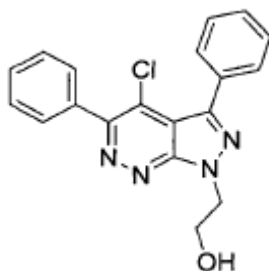


25

A una suspensión de 2-[5-acetamido-3-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-1-il]acetato de etilo (22.4 g, 58 mmol) en etanol (290 mL) se le añadió borohidruro de sodio (11 g, 289 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró parcialmente hasta un volumen final de 250 mL. Se añadió NaOH al 25% (250 mL) y la

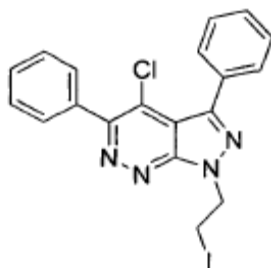
mezcla de reacción se agitó a 80 °C, durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y las dos fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo tres veces y las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se trituró en éter dietílico (20 mL) y el producto se filtró y se secó a vacío para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco crema (9.96 g). El licor madre se concentró a vacío y se purificaron por cromatografía en columna (gel de sílice, gradiente de 0 a 100% de acetato de etilo/isohehexano) produciendo 1.79 g adicionales del compuesto base.

Etapa 5: 2-(4-Cloro-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)etanol



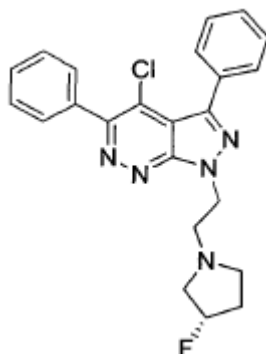
Se añadió nitrito de sodio (3.42 g, 49.5 mmol) en porciones a CHCl₃ (165 mL) a -10 °C y se agitó durante 20 minutos. Se añadió 2-[5-amino-3-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-1-il]etanol (5 g, 16.5 mmol) como un sólido. La mezcla de reacción se dejó calentar, se sonicó durante 5 min y luego se agitó a temperatura ambiente, durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y agua y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (gel de sílice, gradiente de 0 a 100% de acetato de etilo/isohehexano). El residuo resultante se trituró a continuación en éter dietílico, produciendo el compuesto base como un sólido (956 mg).

Etapa 6: 4-Cloro-1-(2-iodoetil)-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



Se añadieron trifetilfosfina (160 mg, 0.62 mmol), imidazol (42 mg, 0.62 mmol) y yodo (160 mg, 0.62 mmol) a una solución de 2-(4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-1-il)etanol (181 mg, 0.52 mmol) en CH₂Cl₂ (6 mL). Después de agitar a temperatura ambiente, durante 1 h, la reacción se filtró y el solvente se eliminó a vacío. La purificación usando cromatografía (gel de sílice, gradiente del 10 al 60% de acetato de etilo/isohehexano) dio 4-cloro-1-(2-yodoetil)-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina como un aceite claro (202 mg) que se usó como tal en la siguiente etapa.

Etapa 7: 4-Cloro-1-[2-[(3S)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto II)

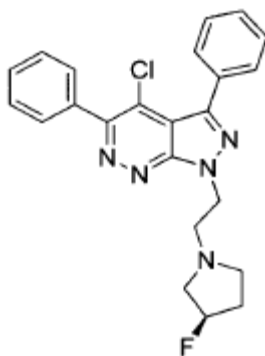


5 Se añadió una solución de 4-cloro-1-(2-yodoetil)-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (90 mg, 0.2 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) a clorhidrato de (S)-3-fluoropirrolidina (126 mg, 1 mmol), se añadió DIPEA (0.21 mL, 1.2 mmol) y la reacción se agitó durante 2 días. Se añadió más CH₂Cl₂ (3 mL), clorhidrato de (S)-3-fluoropirrolidina (126 mg, 1 mmol) y DIPEA (0.21 mL, 1.2 mmol) y la reacción se agitó durante 7 días adicionales. El residuo resultante se purificó usando cromatografía (gel de sílice, gradiente de 20 a 100% de acetato de etilo/isohehexano), seguido de HPLC preparativa para proporcionar el compuesto IIi como un sólido de color blanco (25 mg).

¹H RMN δ (ppm)(DMSO-d₆): 7.76-7.70 (2 H, m), 7.70-7.66 (2 H, m), 7.53-7.43 (6 H, m), 5.15-5.01 (1 H, m), 4.83 (2 H, t), 3.07 (2 H, t), 2.93-2.77 (2 H, m), 2.74-2.58 (1 H, m), 2.41-2.45 (1 H, m), 2.07-1.90 (1 H, m), 1.82-1.68 (1 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.27 min; m/z 422 [M+H] 98.15 % de pureza.

10 Ejemplo 56: 4-cloro-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIu)

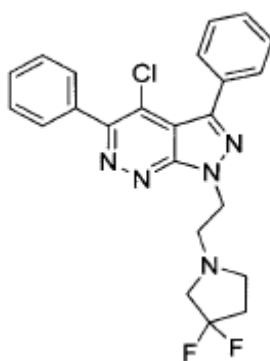


El compuesto IIu se sintetizó según el ejemplo 55, pero usando el clorhidrato de (R)-3-fluoropirrolidina en lugar de clorhidrato de (S)-3-fluoropirrolidina.

15 ¹H RMN δ (ppm)(DMSO-d₆): 7.76-7.70 (2 H, m), 7.70-7.66 (2 H, m), 7.53-7.43 (6 H, m), 5.15-5.01 (1 H, m), 4.83 (2 H, t), 3.07 (2 H, t), 2.93-2.77 (2 H, m), 2.74-2.58 (1 H, m), 2.41-2.45 (1 H, m), 2.07-1.90 (1 H, m), 1.82-1.68 (1 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 2.84 min; m/z 422 [M+H] 98.06 % de pureza.

Ejemplo 57: 4-cloro-1-[2-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)etil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIv)

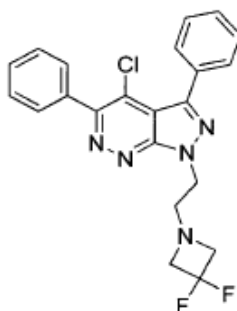


20 Una solución de 4-cloro-1-(2-yodoetil)-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (91 mg, 0.2 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) fue se añadió clorhidrato de 3,3-difluoropirrolidina (143 mg, 1 mmol), se añadió DIPEA (0.2 mL, 1.1 mmol) y la reacción se agitó durante 5 días. El residuo resultante se purificó usando cromatografía (gel de sílice, gradiente de 20 a 50% de acetato de etilo/isohehexano), seguido de HPLC preparativa para proporcionar el compuesto IIv como un sólido de color blanco (24.5 mg).

25 ¹H RMN δ (ppm)(DMSO-d₆): 7.74-7.70 (2 H, m), 7.70-7.65 (2 H, m), 7.52-7.41 (6 H, m), 4.84 (2 H, t), 3.07 (2 H, t), 2.97 (2 H, t), 2.75 (2 H, t), 2.16-2.03 (2 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.45 min; m/z 440 [M+H] 99.4 % de pureza.

Ejemplo 58: 4-cloro-1-[2-(3,3-difluoroazetidín-1-il)etil]-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIw)

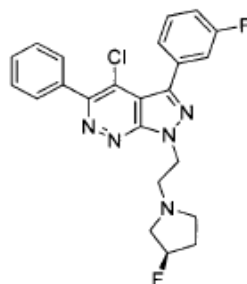


El compuesto IIw se sintetizó según el ejemplo 57, pero usando clorhidrato de 3, 3-difluoroazetidina en lugar de clorhidrato de 3, 3-difluoropirrolidina.

5 ^1H RMN δ (ppm)(DMSO- d_6): 7.74-7.70 (2 H, m), 7.70-7.66 (2 H, m), 7.53-7.43 (6 H, m), 4.74 (2 H, t), 3.56 (4 H, t), 3.15 (2 H, t).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.35 min; m/z 426 [M+H] 95.4 % de pureza.

Ejemplo 59: 4-cloro-3-(3-fluorofenil)-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIx)

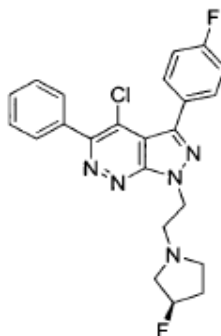


10 El compuesto IIx se sintetizó según el ejemplo 1, usando ácido 3-fluorofenilborónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol y 4-cloro-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3-yodo-5-fenil-pirazolo [3,4-c]piridazina en lugar de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina en la etapa 8.

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 7.79-7.75 (2 H, m), 7.60-7.44 (6 H, m), 7.18 (1 H, tdd), 5.22-5.04 (1 H, m), 4.96 (2 H, t), 3.25 (2 H, t), 3.01-2.91 (3 H, m), 2.68 (1 H, q), 2.13-1.96 (2 H, m).

15 LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.32 min; m/z 440 [M+H] 96.24 % de pureza

Ejemplo 60: 4-cloro-3-(4-fluorofenil)-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIy)

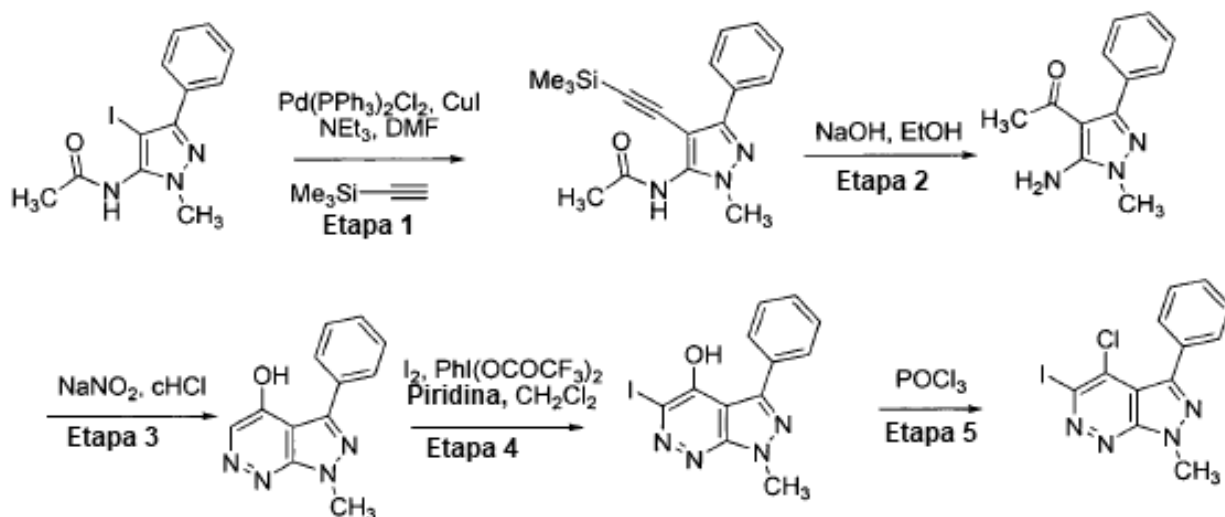


20 El compuesto IIy se sintetizó según el ejemplo 1, pero usando ácido 4-fluorofenilborónico en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol y 4-cloro-1-[2-[(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il]etil]-3-yodo-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina en lugar de 4-cloro-3-yodo-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina en la etapa 8.

^1H RMN δ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.73 (4 H, m), 7.55-7.46 (3 H, m), 7.23-7.15 (2 H, m), 5.21-5.03 (1 H, m), 4.95 (2 H, t), 3.24 (2 H, t), 3.01-2.91 (3 H, m), 2.68 (1 H, q), 2.12-1.96 (2 H, m).

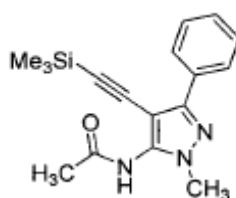
LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.29 min; m/z 440 [M+H] 93.55 % de pureza.

Esquema V: Esquema general de síntesis de los compuestos de fórmula III (compuestos de referencia)



5 Ejemplo 61: 4-cloro-5-yodo-1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIIa, compuesto de referencia)

Etapa 1: N-(1-metil-3-fenil-4-((trimetilsilyl)etnil)-1H-pirazol-5-il)acetamida

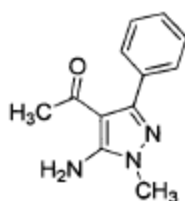


10

Se hizo burbujear nitrógeno a través de una mezcla de N-(4-yodo-1-metil-3-fenil-1H-pirazol-5-il)acetamida (5 g, 15 mmol) en DMF (15 mL) y trietilamina (35 mL), durante 15 min. Se añadieron yoduro de cobre (0.56 g, 3.0 mmol), dicloruro de bis (trifenilfosfina) paladio (II) (0.53 g, 0.75 mmol) y etiniltrimetilsilano (3.0 g, 30 mmol) y la mezcla de reacción se agitó en un tubo sellado a 90 °C bajo nitrógeno durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho de separación de fases) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 5:1 a 10:3) produciendo el compuesto base como un sólido (2.3 g).

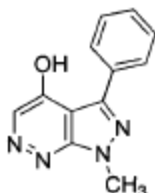
15

Etapa 2: 1-(5-amino-1-metil-3-fenil-pirazol-4-il)etanona



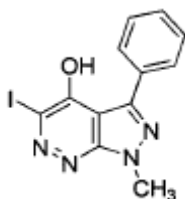
- 5 Una mezcla de N-(1-metil-3-fenil-4-((trimetilsilil)etil)etil)-1H-pirazol-5-il)acetamida (2.3 g, 7.4 mmol), etanol (20 mL) y solución acuosa de NaOH al 25% (20 mL) se calentó con agitación a 90 °C, durante 6 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (cartucho separador de fases) y se concentró al vacío. El residuo se purificó usando cromatografía (gel de sílice, gradiente de 0 a 40% de acetato de etilo/ CH₂Cl₂) seguido de trituración en éter dietílico para proporcionar el compuesto base como un sólido de color blanco (724 mg).

Etapa 3: 1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol



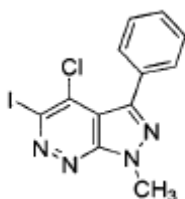
- 10 Se enfrió una suspensión de 1-(5-amino-1-metil-3-fenil-pirazol-4-il)etanona (241 mg, 1.12 mmol) en CHCl₃ (6.7 mL) y agua (1 mL) a -5 °C. Se añadió una solución de nitrito de sodio (155 mg, 2.24 mmol) en agua (0.6 mL) y la mezcla de reacción se agitó a -5 °C, durante 20 minutos, luego a temperatura ambiente, durante 10 minutos, luego a 65 °C, durante 30 minutos y finalmente se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con CHCl₃ (2 mL), se suspendió en MeOH/CH₂Cl₂ (9:1), se filtró y se secó, para dar el compuesto base como un sólido (125 mg).

- 15 Etapa 4: 5-yodo-1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol



- 20 Se añadió fenil [bis (2,2,2-trifluoroacetoxi)]-λ³-yodo (190 mg, 0.43 mmol) a una suspensión de 1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol (166 mg, 0.73 mmol) en CH₂Cl₂ (3.7 mL), seguido de la adición de yodo (111 mg, 0.43 mmol) y piridina (71 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h, luego se filtró. El sólido recogido se lavó con CH₂Cl₂ y se secó, para producir el compuesto base (160 mg).

Etapa 5: 4-cloro-5-yodo-1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIIa, compuesto de referencia)

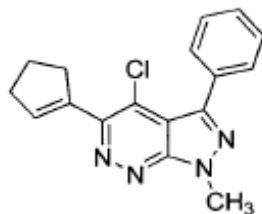


- 25 Se calienta 5-yodo-1-metil-3-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-4-ol (160 mg, 0.45 mmol) en oxocloruro de fósforo (0.6 mL) a 120 °C, durante 10 min. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y la suspensión se filtró. El sólido recogido se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua. La fase orgánica se secó (cartucho separador de fases) y se concentró a vacío, para producir el compuesto IIIa (130 mg).

¹H RMN δ (ppm)(DMSO-d₆): 7.80-7.76 (2 H, m), 7.62-7.56 (3 H, m), 4.43-4.35 (3 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.52 min; m/z 371 [M+H] 97.73 % de pureza.

- 30 Ejemplo 62: 4-cloro-5-(ciclopenten-1-il)-1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIIb, compuesto de referencia)

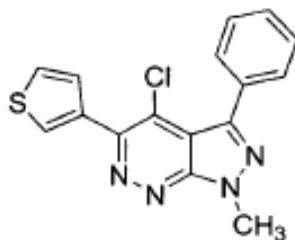


5 Se burbujeó nitrógeno a través de una suspensión de 4-cloro-5-yodo-1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (60 mg, 0.16 mmol), 2-(ciclopenten-1-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (35 mg, 0.18 mmol) y K_3PO_4 (103 mg, 0.48 mmol) en DMF (1 mL) y agua (0.3 mL), durante 15 min. Se añadió complejo de 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocenopaladio(II)dicloruro diclorometano (13 mg, 0.016 mmol) y el tubo se selló y se calentó a 30 °C, durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y agua. La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas combinadas se secaron (cartucho separador de fases) y se concentraron a vacío. El residuo resultante se purificó usando cromatografía (gel de sílice, CH_2Cl_2 /isohexano 1:1 a 1:0), para proporcionar el compuesto IIIb como un sólido (10 mg).

10 1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 7.75-7.69 (2 H, m), 7.52-7.46 (3 H, m), 6.62-6.59 (1 H, m), 4.39 (3 H, s), 3.11-3.04 (2 H, m), 2.71-2.64 (2 H, m), 2.14-2.04 (2 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.75 min; m/z 311 [M+H] 93.15 % de pureza.

Ejemplo 63: 4-cloro-1-metil-3-fenil-5-(3-tienil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIIc, compuesto de referencia)

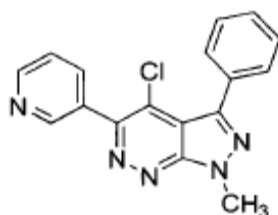


15 El compuesto IIIc se sintetizó según el ejemplo 19, pero usando N-(2-metil-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida en lugar de N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida en la etapa 2 y usando 3-etiniltiofeno en lugar de fenilacetileno en la etapa 3.

1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 8.01 (1H, dd), 7.79-7.75 (3H, m), 7.53-7.49 (3H, m), 7.46 (1H, dd), 4.44 (3H, s).

LCMS (15cm_Fórmico_ASCENTIS_HPLC_CH3CN) Rt 10.65 min; m/z 327 [M+H] 98.32 % de pureza.

Ejemplo 64: 4-cloro-1-metil-3-fenil-5-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto IIIId, compuesto de referencia)

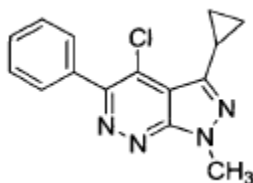


20 El compuesto IIIId se sintetizó según el ejemplo 19, pero usando N-(2-metil-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida en lugar de N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida en la etapa 2 y usando 3-etinilpiridina en lugar de fenilacetileno en la etapa 3.

1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 9.06 (1 H, s), 8.74 (1 H, s), 8.14 (1 H, dt), 7.79-7.74 (2 H, m), 7.55-7.43 (4 H, m), 4.47 (3 H, s).

LCMS (15cm_Fórmico_ASCENTIS_HPLC_CH3CN) Rt 8.99 min; m/z 322 [M+H] 98.02 % de pureza.

25 Ejemplo 65: 4-cloro-3-ciclopropil-1-metil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 21, compuesto de referencia)

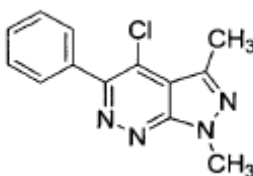


El compuesto 21 se sintetizó según el ejemplo 19, pero usando N-(5-ciclopropil-2-metil-pirazol-3-il)acetamida en lugar de N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida en la etapa 2.

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78 (2 H, m), 7.57-7.47 (3 H, m), 4.26 (3 H, s), 2.61-2.52 (1 H, m), 1.13-1.08 (4 H, m).

5 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.79 min; m/z 285 [M+H] 99.51 % de pureza.

Ejemplo 66: 4-cloro-1,3-dimetil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 22)



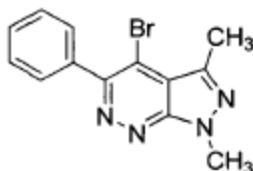
10

El compuesto 22 se puede sintetizar según Vasilevsky, S. F. and Tretyakov, E. V. (1995), "Cinnolines and pyrazolopyridazines: Novel synthetic and mechanistic aspects of the Richter reaction." Liebigs Ann./Reel., 1995: 775-779.

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.79-7.75 (2 H, m), 7.56-7.47 (3 H, m), 4.30 (3 H, s), 2.80 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESI_Fórmico_MeCN) Rt 3.69 min; m/z 259 [M+H] 99.32 % de pureza.

Ejemplo 67: 4-bromo-1,3-dimetil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 23)



15

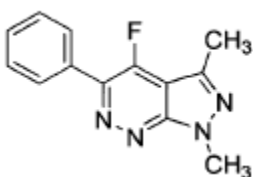
El compuesto 23 se puede sintetizar según Vasilevsky, S. F. and Tretyakov, E. V. (1995), "Cinnolines and pyrazolopyridazines: Novel synthetic and mechanistic aspects of the Richter reaction." Liebigs Ann.IRecl., 1995: 775-779.

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.73-7.70 (2 H, m), 7.55-7.46 (3 H, m), 4.30 (3 H, s), 2.80 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESI_Fórmico_MeCN) Rt 3.74 min; m/z 303 [M+H] 99.15 % de pureza.

20

Ejemplo 68: 4-fluoro-1,3-dimetil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 24, compuesto de referencia)

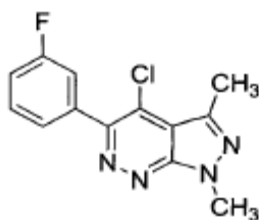


Una suspensión de 4-cloro-1,3-dimetil-5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazina (44 mg, 0.17 mmol), fluoruro de potasio (50 mg, 0.85 mmol) en DMF seco (1 mL) se agitó a 120 °C, durante 16 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto 24 (12 mg).

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 8.04-8.00 (2 H, m), 7.58-7.46 (3 H, m), 4.31 (3 H, s), 2.75 (3 H, s).

5 LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.25 min; m/z 243 [M+H] 91.64 % de pureza.

Ejemplo 69: 4-cloro-5-(3-fluorofenil)-1,3-dimetil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 25, compuesto de referencia)

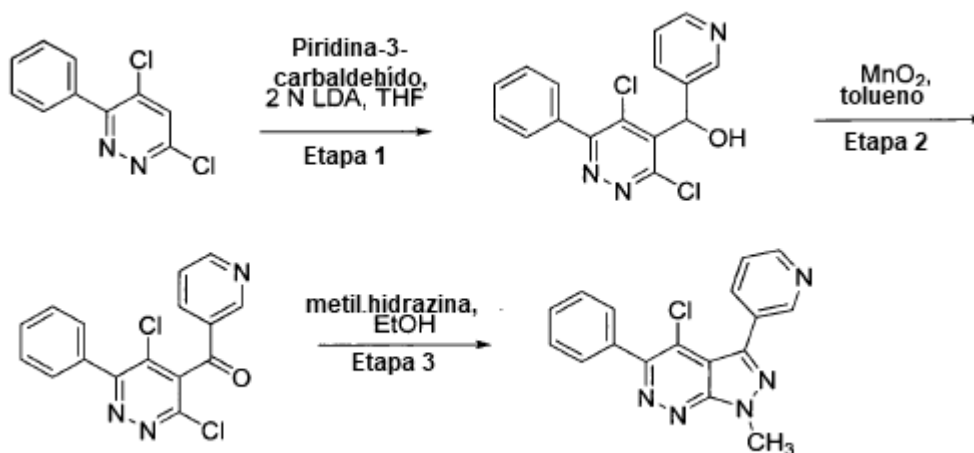


El compuesto 25 se sintetizó según el ejemplo 19, pero usando N-(2,5-dimetilpirazol-3-il)acetamida en lugar de N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)acetamida en la etapa 2 y usando 3-fluorofenilacetileno en lugar de fenilacetileno en la etapa 3.

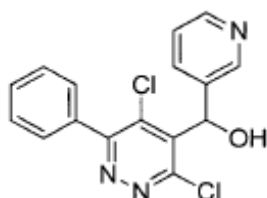
10 $^1\text{H RMN } \delta$ (ppm)($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.59-7.46 (3 H, m), 7.23-7.17 (1 H, m), 4.31 (3 H, s), 2.80 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 4.01 min; m/z 277 [M+H] 99.46 % de pureza.

Ejemplo 70: 4-cloro-1-metil-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 26, compuesto de referencia)



Etapa 1: (3,5-dicloro-6-fenil-piridazin-4-il)-(3-piridil)metanol

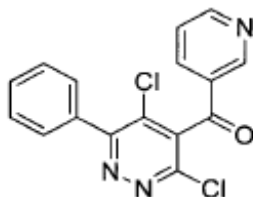


15

A una solución de 4,6-dicloro-3-fenil-piridazina (2.27 g, 0.01 mol) en THF seco (30 mL) se le añadió piridina-3-carbaldehído (1.3 g, 0.012 mol). La mezcla de reacción se enfrió a -78 °C y se añadió gota a gota una solución de LDA (2 N, 22 mL), manteniendo la temperatura interna por debajo de -50 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h, luego se añadieron agua y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (cartucho separador de fases) y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 9:1 a 8:2) produciendo el compuesto base como un sólido (4.1 g).

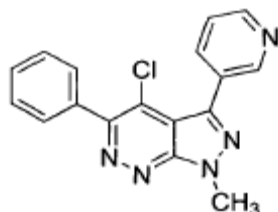
20

Etapa 2: (3,5-dicloro-6-fenil-piridazin-4-il)-(3-piridil)metanona



5 Una mezcla de 3,5-dicloro-6-fenil-piridazin-4-il)-(3-piridil) metanol (850 mg, 2.57 mmol) y dióxido de manganeso (1.1 g, 12.8 mmol) en tolueno (20 mL) se agitó a reflujo en un aparato Dean-Stark durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró y el sólido recogido se lavó con CH_2Cl_2 . El filtrado se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 8: 2) produciendo el compuesto base como un sólido (360 mg).

Etapa 3: 4-cloro-1-metil-5-fenil-3-(3-piridil)pirazolo[3, 4-c]piridazina (compuesto 26, compuesto de referencia)

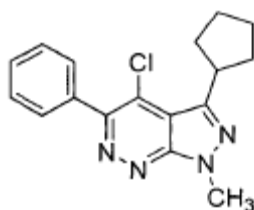


10 Una mezcla de (3,5-dicloro-6-fenil-piridazin-4-il) - (3-piridil) metanona (100 mg, 0.3 mmol) y metilhidrazina (19.5 mg, 0.42 mmol) en etanol (1.5 mL) se agitó en un tubo sellado a 60 °C, durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 9:1 a 8:2) produciendo el compuesto 26 como un sólido (30 mg).

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 9.05 (1 H, m), 8.73 (1 H, dd), 8.12 (1 H, dt), 7.79-7.76 (2 H, m), 7.57-7.48 (3 H, m), 7.46 (1 H, dd), 4.48 (3 H, s).

15 LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 3.6 min; m/z 322 [M+H] 98.72 % de pureza.

Ejemplo 71: 4-cloro-3-ciclopentil-1-metil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 27, compuesto de referencia)

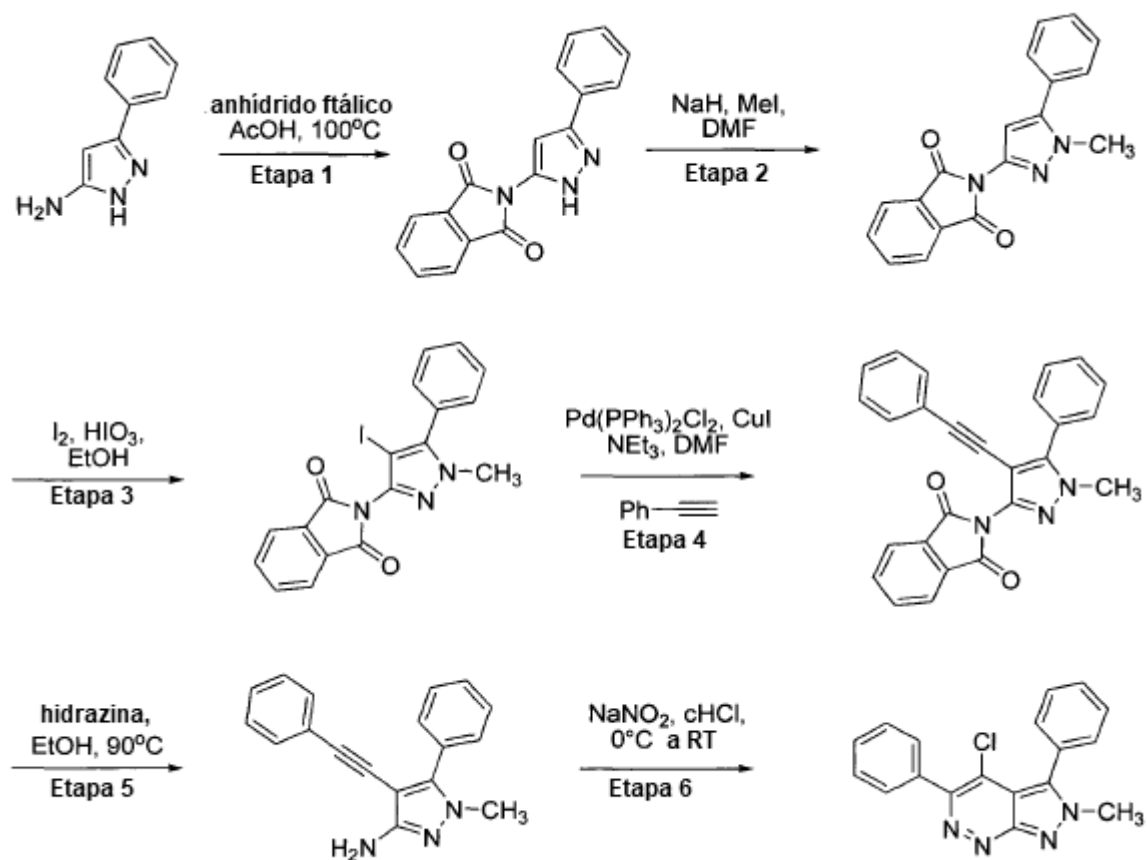


El compuesto 27 se sintetizó según el ejemplo 70, pero usando ciclopentano carboxaldehído en lugar de piridina-3-carbaldehído en la etapa 1.

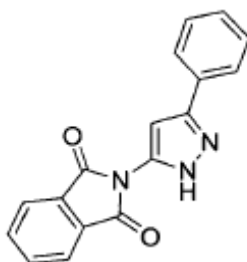
20 ^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 7.77 (2 H, m), 7.57-7.47 (3 H, m), 4.30 (3 H, s), 3.87-3.77 (1 H, m), 2.22-2.14 (2H, m), 2.06-1.93 (2 H, m), 1.95-1.83 (2 H, m), 1.80-1.71 (2 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11.97 min; m/z 313 [M+H] 98.14 % de pureza.

Ejemplo 72: 4-cloro-2-metil-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 28, compuesto de referencia)

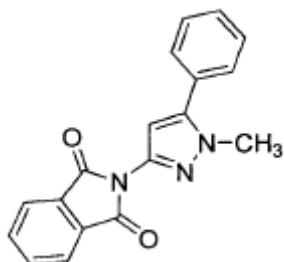


Etapa 1: 2-(3-fenil-1H-pirazol-5-il)isoindolina-1,3-diona



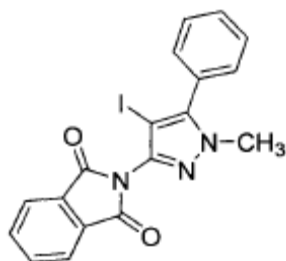
5 Una mezcla de 3-fenil-1H-pirazol-5-amina (6 g, 0.038 mol), anhídrido ftálico (5.6 g, 0.038 mol) en ácido acético (60 mL) se calentó a 100 °C, durante 2 h y a 120 °C, durante 2 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y la suspensión se filtró. El sólido recogido se lavó con agua, se secó, produciendo el compuesto base como un sólido (10 g).

Etapa 2: 2-(2-metil-5-fenil-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona

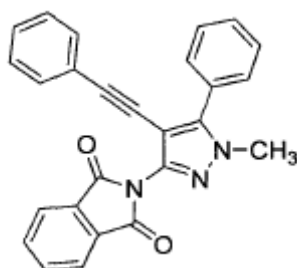


- 5 Se añadió hidruro de sodio (830 mg, 0.02 mol) en porciones a una mezcla de 2-(3-fenil-1H-pirazol-5-il) isoindolin-1,3-diona (5 g, 0.0173 mol) y yoduro de metilo (1.5 mL, 0.024 mol) en DMF (80 mL) a 10 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo dos veces. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohexano 1:19 a 2:8) produciendo una mezcla del compuesto base y el regioisómero 2-(2-metil-5-fenil-pirazol-3-ilo) isoindolin-1,3-diona (850 mg, 5:1).

Etapas 3: 2-(4-yodo-1-metil-5-fenil-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona

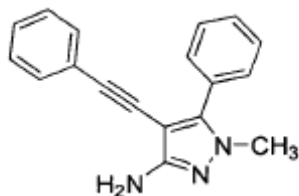


- 10 Una suspensión de 2-(2-metil-5-fenil-pirazol-3-il) isoindolin-1,3-diona (850 mg, 2.8 mmol), ácido yódico (123 mg, 0.7 mmol) y yodo (427 mg, 1.68 mmol) en etanol (30 mL) se calentó a 50 °C, durante 2 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (gel de sílice, CH₂Cl₂), luego se trituró con éter dietílico, produciendo el compuesto base como un sólido (660 mg).
- 15 Etapas 4: 2-[1-metil-5-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-3-il]isoindolina-1,3-diona



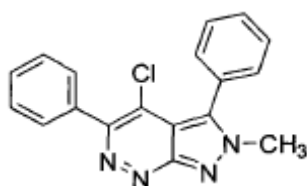
- 20 Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de 2-(4-yodo-1-metil-5-fenil-pirazol-3-il)isoindolina-1,3-diona (660 mg, 1.49 mmol), fenilacetileno (182 mg, 1.78 mmol), trietilamina (8 mL) y DMF (3 mL), durante 15 minutos. Se añadieron yoduro de cobre (28 mg, 0.149 mmol) y dicloruro de bis (trifenilfosfina) paladio (II) (52 g, 0.074 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C bajo nitrógeno durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 8:2 a 6:4) produciendo el compuesto base como un sólido (600 mg).

Etapas 5: 1-metil-5-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-3-amina



5 Una mezcla de 2-[1-metil-5-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-3-il]isoindolina-1,3-diona (300 mg, 0.74 mmol), etanol (5 mL) e hidrato de hidrazina (56 μ L, 1.11 mL) se agitó en un tubo sellado a 90 °C, durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró. El filtrado se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 7:3 a 1:1) produciendo el compuesto base como un sólido (150 mg).

Etapa 6: 4-cloro-2-metil-3,5-difenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto 28, compuesto de referencia)



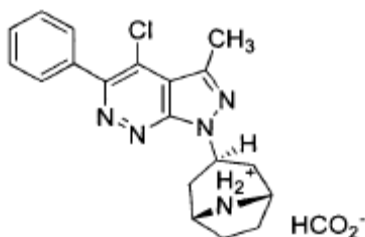
10 Se añadió nitrito de sodio (57 mg, 0.82 mmol) en porciones a una mezcla de 1-metil-5-fenil-4-(2-feniletinil)pirazol-3-amina (150 mg, 0.55 mmol) en CHCl_3 (5 mL) a 0 °C y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h.

La mezcla de reacción se vertió en una solución de carbonato de sodio y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las fases orgánicas combinadas se secaron (cartucho separador de fases) y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohexano 2:8 a 4:6) produciendo el compuesto 28 como un sólido (76 mg).

15 ^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 7.84-7.80 (2 H, m), 7.60-7.55 (3 H, m), 7.53-7.44 (5 H, m), 4.21 (3 H, s).

LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.47 min; m/z 321 [M+H] 97.05 % de pureza.

Ejemplo 73: 1-[(8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il]-4-cloro-3-metil-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto XIIIa, compuesto de referencia)

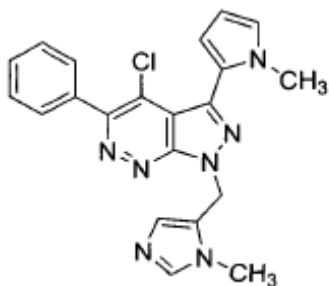


20 El compuesto XIIIa se sintetizó a partir de 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina y nortropina siguiendo el procedimiento general de la reacción de Mitsunobu descrito en el ejemplo 20.

^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 8.62 (1 H, s), 7.77 (2 H, m), 7.57-7.48 (3 H, m), 5.62-5.52 (1 H, m), 4.14 (2 H, s), 2.79 (3 H, s), 2.73 (2 H, m), 2.32 (2 H, m), 2.19-2.06 (4 H, m).

LCMS (15cm_Fórmico_ASCENTIS_HPLC_CH3CN) Rt 7.7 min; m/z 354 [M+H] 93.89% de pureza.

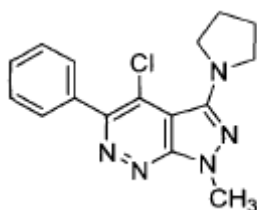
25 Ejemplo 74: 4-cloro-1-[(3-metilimidazol-4-il)metil]-3-(1-metilpirrol-2-il)-5-fenil-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto XIIIb)



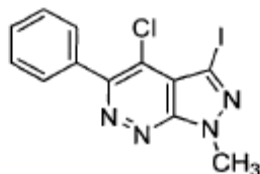
El compuesto XIIIb se sintetizó siguiendo procedimientos similares del ejemplo 1 (compuesto Ic), usando (1-metil-1-Himidazol-5-il) metanol en lugar de 2-(4-metilpiperazin-1-il)etanol en la etapa 7 y 1-metil-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirrolo en lugar de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en la etapa 8.

- 5 ^1H RMN δ (ppm)(CHCl_3 -d): 7.76-7.73 (2 H, m), 7.55-7.46 (3 H, m), 7.43 (1 H, s), 7.31 (1 H, s), 6.81 (1 H, t), 6.57 (1 H, dd), 6.25 (1 H, dd), 5.94 (2 H, s), 3.86 (3 H, s), 3.68 (3 H, s). LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 9.81 min; m/z 404 [M+H] 92.03% de pureza.

Ejemplo 75: 4-cloro-1-metil-5-fenil-3-pirrolidin-1-il-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto XIIIc)

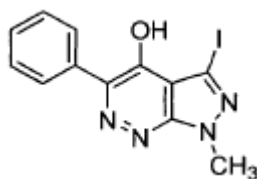


- 10 Etapa 1: 4-cloro-3-yodo-1-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina



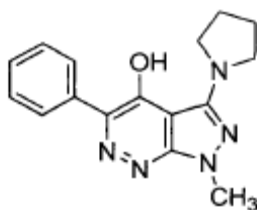
- 15 Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 674 mg, 16.9 mmol) a una suspensión de 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina (3 g, 8.4 mmol) en DMF seco (42 mL), luego se añadió yoduro de metilo (1.05 mL, 16.9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h. Se añadieron disolución de LiCl (4% en agua) y acetato de etilo y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/isohexano 0:1 a 1:1) produciendo el intermedio como un sólido (1.51 g).

Etapa 2: 3-yodo-1-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol



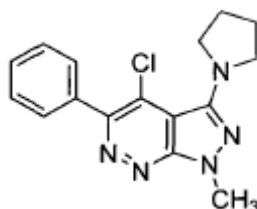
- 20 Una mezcla de 4-cloro-3-yodo-1-metil-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (1.5 g, 4.05 mmol) y solución acuosa de NaOH (4 M, 2 mL) en DMSO (6 mL) y dioxano (6 mL) se calentó a 50 °C, durante 2.5 h. La mezcla se dejó enfriar a rt, luego se neutralizó a pH 2-3, cuando se formó un precipitado. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó, para dar 1.33 g del intermedio.

Etapa 3: 1-metil-5-fenil-3-(pirrolidin-1-il)-1H-pirazolo[3,4-c]piridazin-4-ol



5 Una mezcla de 3-yodo-1-metil-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazin-4-ol (100 mg, 0.28 mmol), yoduro de cobre (11 mg, 0.056 mmol), L-prolina (13 mg, 0.11 mmol), K_2CO_3 (193 mmol, 1.4 mmol) en DMF anhidro (5.6 mL) se desgasificó burbujeando nitrógeno durante 10 minutos, luego se calentó a 110 °C, durante 20 h. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se repartió entre acetato de etilo y agua, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron. El residuo (117 mg) se usó como tal en la siguiente etapa.

Etapa 4: 4-cloro-1-metil-5-fenil-3-(pirrolidin-1-il)-pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto XIIIc)



10

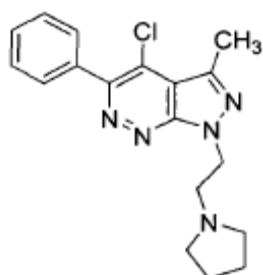
Una suspensión de 1-metil-5-fenil-3-(pirrolidin-1-il)-1H-pirazolo [3,4-c]piridazin-4-ol (117 mg) en $POCl_3$ (1.9 mL) se calentó a 60 °C, durante 2.5 h. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre CH_2Cl_2 y solución acuosa saturada de $NaHCO_3$. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 , las capas orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para dar el compuesto base (81 mg).

15

1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 7.74-7.70 (2 H, m), 7.53-7.44 (3 H, m), 4.18 (3 H, s), 3.62-3.56 (4 H, m), 2.05-1.97 (4 H, m).

LCMS (10cm_ESCI_Fórmico_MeCN) Rt 4.55min; m/z 314.04 [M+H] 97.21% de pureza.

Ejemplo 76: 4-cloro-3-metil-5-fenil-1-(2-pirrolidin-1-iletíl)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto XIIIId, compuesto de referencia)



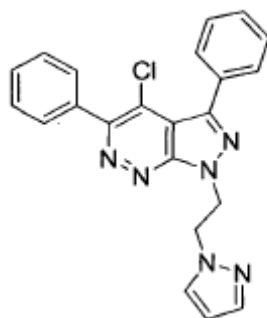
20

El compuesto XIIIId se sintetizó a partir de 4-cloro-3-metil-5-fenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(pirrolidin-1-il)etanol siguiendo el procedimiento general para la reacción de Mitsunobu descrita en el ejemplo 20.

1H RMN δ (ppm)($CHCl_3$ -d): 7.79-7.76 (2 H, m), 7.56-7.47 (3 H, m), 4.82 (2 H, t), 3.11 (2 H, t), 2.80 (3 H, s), 2.64 (4 H, m), 1.78-1.72 (4 H, m).

25 LCMS (10cm_Fórmico_ ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 9.07 min; m/z 342 [M+H] 91.77% de pureza.

Ejemplo 77: 4-cloro-3,5-difenil-1-(2-pirazol-1-iletíl)pirazolo[3,4-c]piridazina (compuesto XIVA)

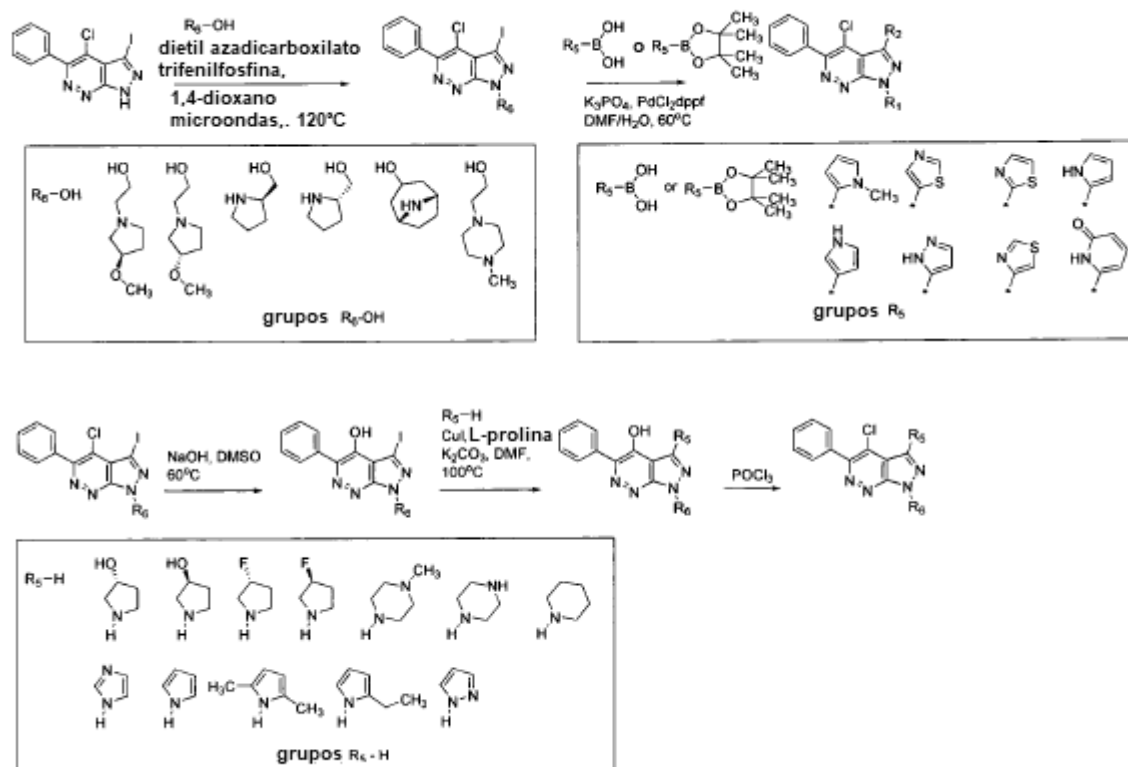


El compuesto XIVa se sintetizó a partir de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo[3,4-c]piridazina y 2-(1H-pirazol-1-il)etanol siguiendo el procedimiento general de la reacción de Mitsunobu descrita en el ejemplo 20.

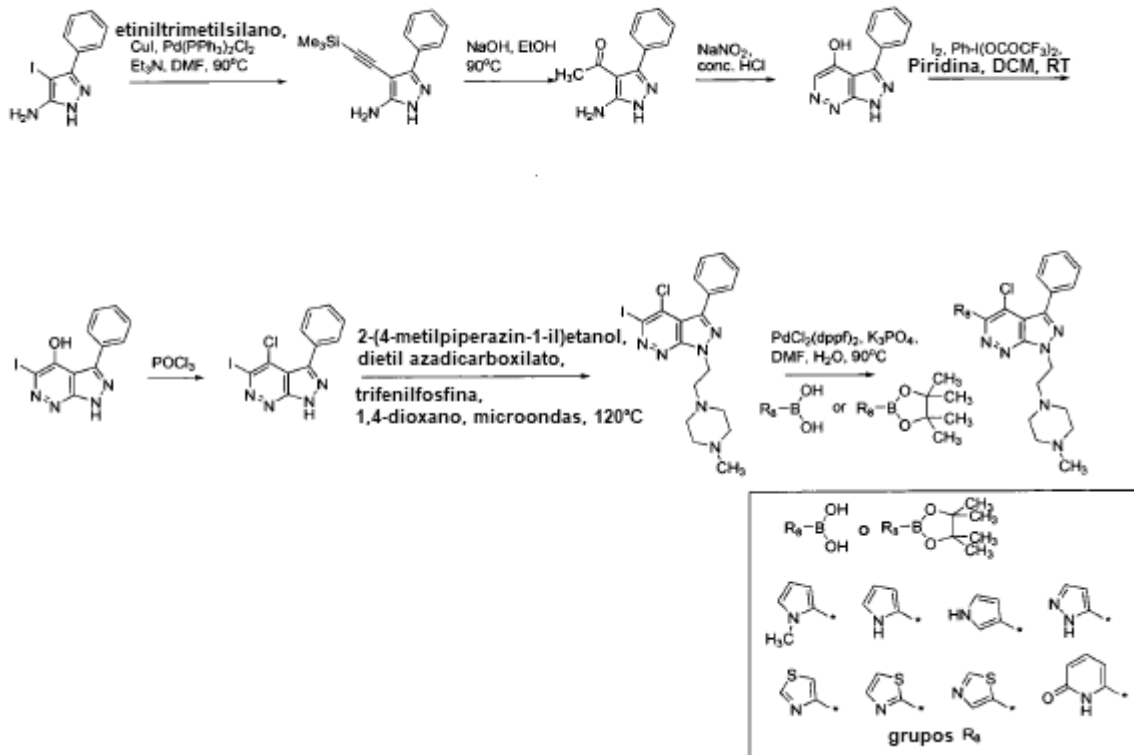
¹H RMN δ (ppm)(CHCl₃-d): 7.78-7.69 (4 H, m), 7.55-7.46 (7 H, m), 7.25 (1 H, m), 6.17 (1 H, t), 5.25 (2 H, t), 4.87 (2 H, t).

5 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.67 min; m/z 401 [M+H] 99.6% de pureza.

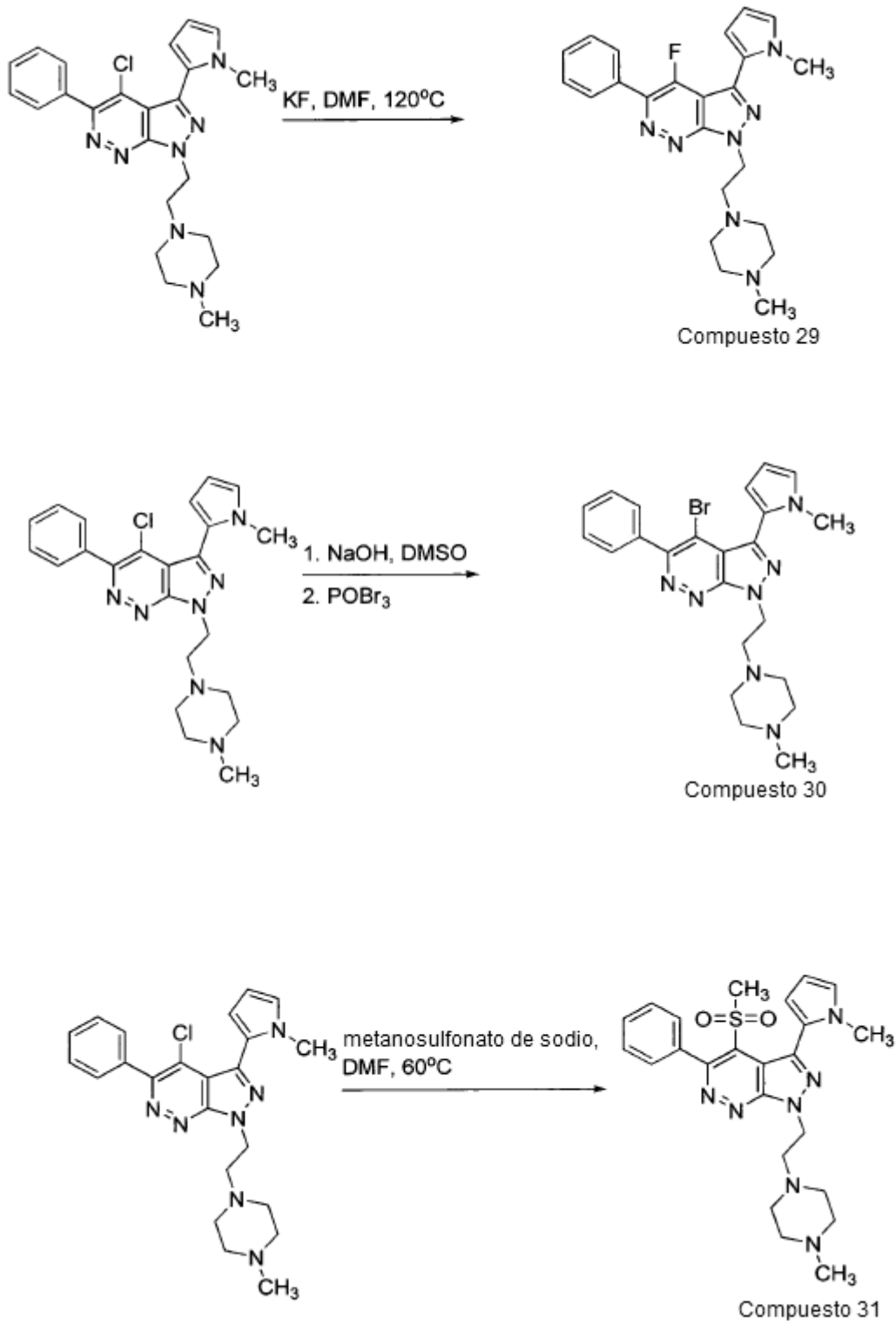
Esquema VI: Esquema general de síntesis de los compuestos de fórmula XIII



Esquema VII: Esquema general de síntesis de los compuestos de fórmula XV



Esquema VIII: Esquema general de síntesis de los compuestos 29-31 a partir del compuesto Ik:



Ejemplo 78: Método de ensayo que muestra la actividad de los compuestos de la invención o como se describe en este documento que restaura la expresión de N48K Clarin-1 (24 horas de incubación)

Clarín-1 es la proteína codificada por el gen mutado en el síndrome de Usher III (Adato et al., 2002). La mutación más prevalente en Clarín-1 en América del Norte es N48K, que se informa que causa pérdida de glucosilación y un defecto de tráfico (Tian et al., 2009). Como consecuencia, la proteína N48K no llega a la membrana plasmática y se degrada por el proteasoma. De este modo, se cree que restablecer el tráfico de N48K Clarín-1 a la superficie celular proporciona una vía de intervención para el síndrome de Usher III.

Un modelo celular útil para demostrar la utilidad de los compuestos de la invención o como se describe en este documento que restauran la expresión de N48K Clarín-1 es la línea celular HEK293-Clarín-1 N48K-HA D9 (Tian et al., 2009). En un experimento típico, estas células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno a una densidad celular de 20.000 células por pocillo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero bovino fetal en una incubadora humidificada a 37 °C, CO₂ al 5%. Después de una incubación durante la noche, se añadieron compuestos para una incubación de 24 horas en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% en una incubadora humidificada a 37 °C, CO₂ al 5%. Como control negativo, se usó DMSO al 0.25% de las concentraciones finales. Los compuestos fueron típicamente probados por triplicado. Después de la incubación de 24 horas con los compuestos, las células se fijaron mediante la adición de formalina regulada al 10% a los pocillos para lograr una concentración final de formalina al 4%. Después de una fijación de 20 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con solución salina regulada con fosfato (PBS) que contenía Triton X-100 (fosfato 0.02, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0.1%).

Se detectó N48K Clarín-1 marcada con HA con un anticuerpo contra la etiqueta de HA (anticuerpo monoclonal HA.11 Clon 16B12, Covance # MMS-101P) a una dilución de 1:1000 en PBS que contiene Triton X-100. Después de una incubación de 90 min, los pocillos se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100, y se añadió un anticuerpo secundario (IgG-Cy3 de cabra anti-ratón (1.5 mg/mL), Jackson IR Europe # 115165003) a los pocillos en una dilución de 1:250 en PBS que contiene Triton X-100 durante 45 min. Los pocillos se lavaron posteriormente tres veces con PBS que contenía Triton X-100, y se realizó una tinción final para los núcleos mediante la adición de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) a una dilución de 1:10.000. La imagen de las células teñidas se realizó en un InCell 1000 High Content Imager (GE Healthcare), leyendo el canal Cy3 para N48K Clarín-1 y el canal DAPI para los núcleos. Las imágenes se analizaron y cuantificaron usando un algoritmo específico. Este algoritmo midió la tinción de HA-Clarín-1 para cada célula basándose en la segmentación nuclear adicional de la señal de DAPI (Figura 1). Este algoritmo midió la intensidad por célula y, de este modo, es menos sensible a la variación en el número de células. Por pocillo, se midieron aproximadamente 2,000 células para lograr una densidad promedio por medición celular.

Ejemplo 79: Un método de ensayo que muestra actividad de compuestos de la invención que restauran la expresión de N48K Clarín-1 (2 horas de incubación)

Clarín-1 es la proteína codificada por el gen mutado en el síndrome de Usher III (Adato et al., 2002). La mutación más prevalente en Clarín-1 en América del Norte es N48K, que se informa que causa pérdida de glucosilación y un defecto de tráfico (Tian et al., 2009). Como consecuencia, la proteína N48K no llega a la membrana plasmática y se degrada por el proteasoma. De este modo, se cree que restablecer el tráfico de N48K Clarín-1 a la superficie celular proporciona una vía de intervención para el síndrome de Usher III.

Un modelo celular útil para demostrar la utilidad de los compuestos de la invención que restauran la expresión de N48K Clarín-1 es la línea celular HEK293-Clarín-1 N48K-HA D9 (Tian et al., 2009). En un experimento típico, estas células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno a una densidad celular de 20,000 células por pocillo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero bovino fetal en una incubadora humidificada a 37 °C, CO₂ al 5%. Después de una incubación durante la noche, se añadieron los compuestos durante 2 horas de incubación en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% en una incubadora humidificada a 37 °C, CO₂ al 5%. Como control negativo, se usó DMSO al 0.25% de las concentraciones finales. Los compuestos fueron por lo general probados por triplicado. Después de 2 horas de incubación con compuestos, las células se incubaron en medio nuevo durante 22 h. Las células se fijaron luego mediante la adición de formalina regulada al 10% a los pocillos para lograr una concentración final de formalina al 4%. Después de una fijación de 20 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con solución salina regulada con fosfato (PBS) que contenía Triton X-100 (fosfato 0.02, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0.1%).

La N48K Clarín-1 marcada con HA se detectó con un anticuerpo contra la etiqueta HA (anticuerpo monoclonal HA.11 Clon 16B12, Covance # MMS-1 01P) a una dilución de 1:1000 en PBS que contiene Triton X-100. Después de una incubación de 90 min, los pocillos se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100, y se añadió un anticuerpo secundario (IgG-Cy3 de cabra anti-ratón (1.5 mg/mL), Jackson IR Europe # 115165003) a los pocillos en una dilución de 1:250 en PBS que contiene Triton X-100 durante 45 min. Los pocillos se lavaron posteriormente tres veces con PBS que contenía Triton X-100, y se realizó una tinción final para los núcleos mediante la adición de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) a una dilución de 1:10,000. La imagen de las células teñidas se realizó en un InCell 1000 High Content Imager (GE Healthcare), leyendo el canal Cy3 para N48K Clarín-1 y el canal DAPI para los núcleos. Las imágenes se analizan y cuantifican usando un algoritmo específico. Este algoritmo midió la tinción de HA-Clarín-1 para cada célula basándose en la segmentación nuclear adicional de la señal de DAPI (Figura 1). Este algoritmo midió la intensidad por célula y, de este modo, es menos sensible a la variación en el número de células. Por pocillo, se midieron aproximadamente 2,000 células para lograr una densidad promedio por medición celular.

Ejemplo 80: Datos de IC₅₀ para compuestos ilustrativos de la invención

Los valores de IC₅₀ para compuestos ilustrativos de pirazolopiridazina de la invención o como se describen en este documento se obtuvieron según el método de ensayo del ejemplo 78. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 1.

5

Tabla 1

Compuesto	IC ₅₀ *
la	A
lb	C
lc	A
ld	A
le	A
lf	A
lg	A
lh	B
li	A
lj	A
lk	A
ll	A
lm	A
ln	A
lu	B
lv	A
lw	B
laa	B
lbb	B
ldd	A
lee	B
lff	A, B
lgg	B
lhh	A
lii	A
lla	A
llb	A

ES 2 687 854 T3

IIc	A
IIId	A
IIe	A
IIf	A
IIg	A
IIh	A
IIi	A
IIj	A
IIk	A
III	A
IIIm	A
IIIn	A
IIo	A
IIp	A
IIq	A
IIr	A
IIs	A
IIIc	A
IIId	A
20	C
21	B
22	A
23	B
24	A
25	A
26	A
27	B
<p>* A = Menor que o igual a 2μM B = Mayor que 2 μM y menor que o igual a 5 μM C = Mayor que 5 μM y menor que o igual a 21 μM</p>	

Los valores de IC₅₀ para los compuestos ilustrativos de pirazolopiridazina de la invención se obtuvieron según el método de ensayo del ejemplo 79. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2

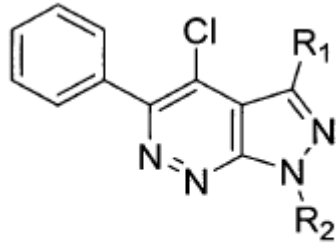
Compuesto.	IC ₅₀ **
lc	E
li	D
lk	D
ll	D
lo	D
lp	E
lq	E
lr	D
ls	D
lt	E
lx	F
ly	D
lz	D
lcc	D
lla	E
llb	D
llc	D
llf	D
llg	D
llh	D
llj	D
lll	D
lln	D
llq	D
lls	D
llt	D
llu	D
llv	E
llw	E
llx	D

ES 2 687 854 T3

Ily	D
IIIa	E
IIIb	E
XIIIa	E
XIIIb	E
XIIIc	F
XIIId	E
XIVa	D
<p>** D = Menor que o igual a 4 μM</p> <p>E = Mayor que 4 μM y menor o igual a 8 μM</p> <p>F = Mayor que 8 μM y menor o igual a 12 μM</p>	

REIVINDICACIONES

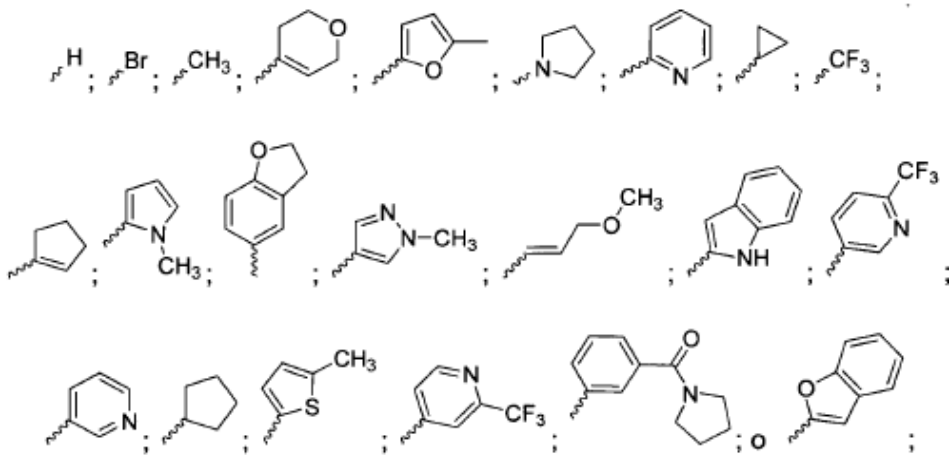
1. Un compuesto de fórmula I:



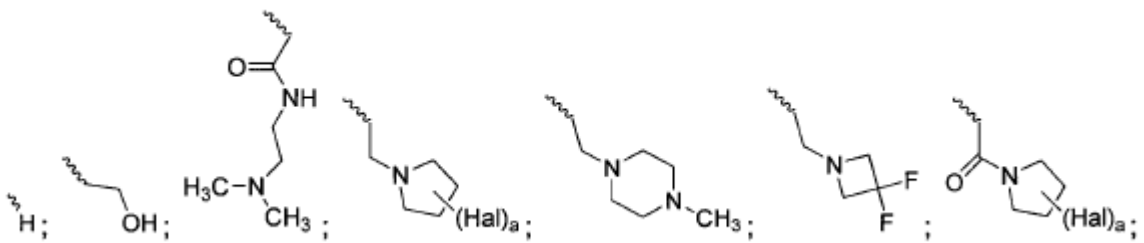
Fórmula I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

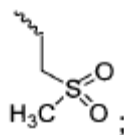
5 en la que R₁ es:



R₂ es:

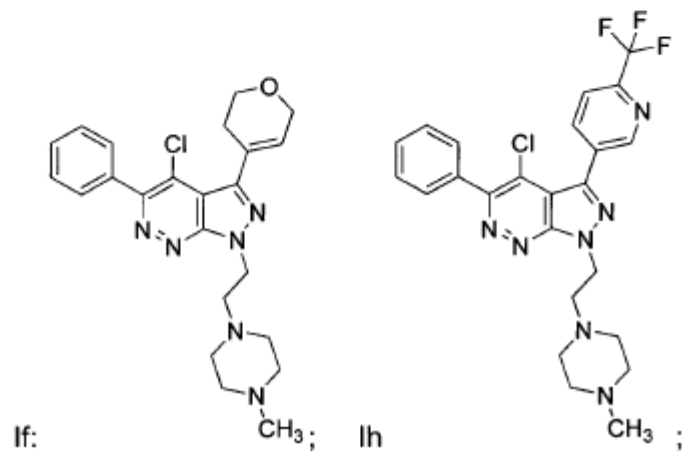
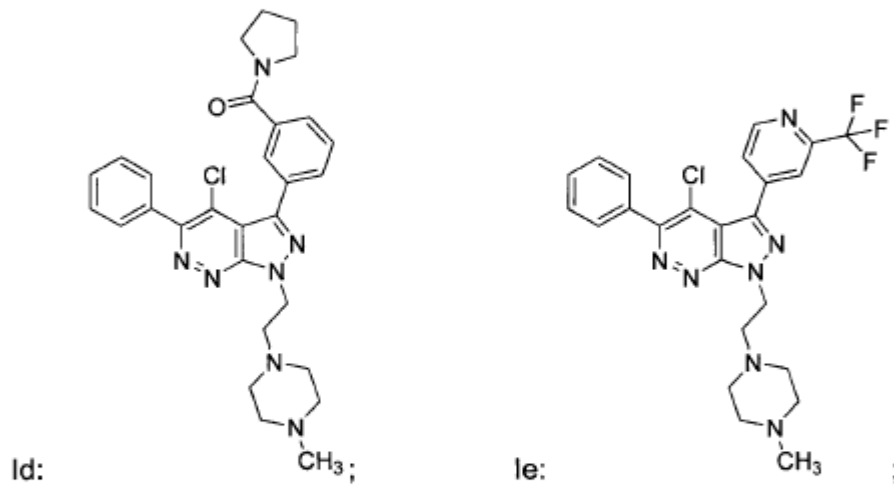
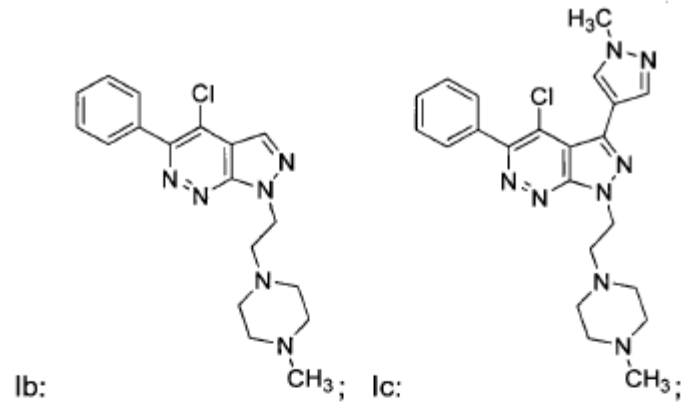


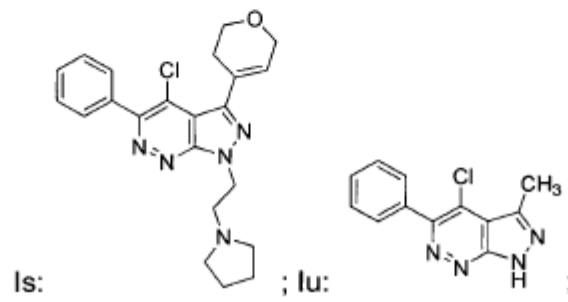
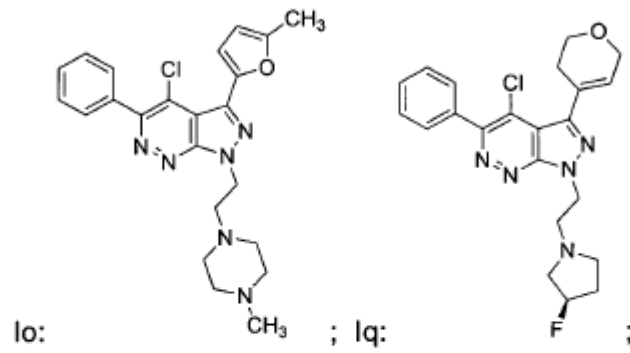
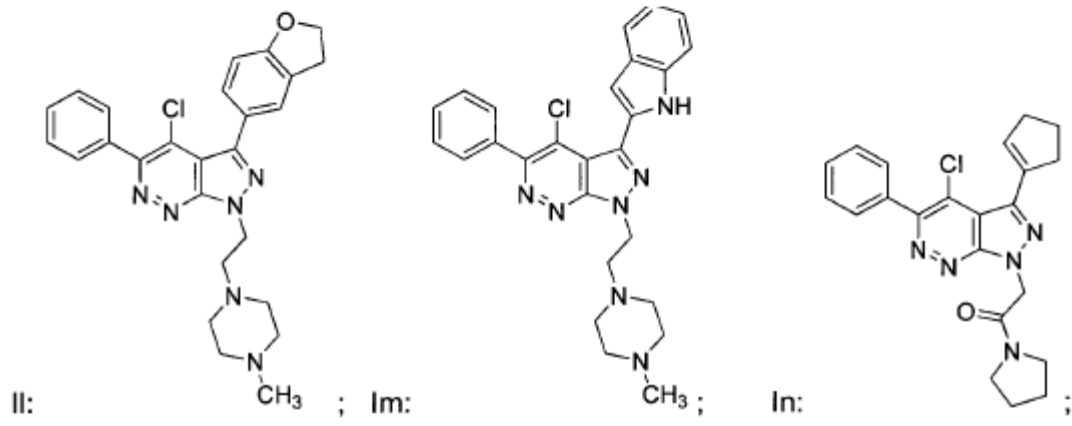
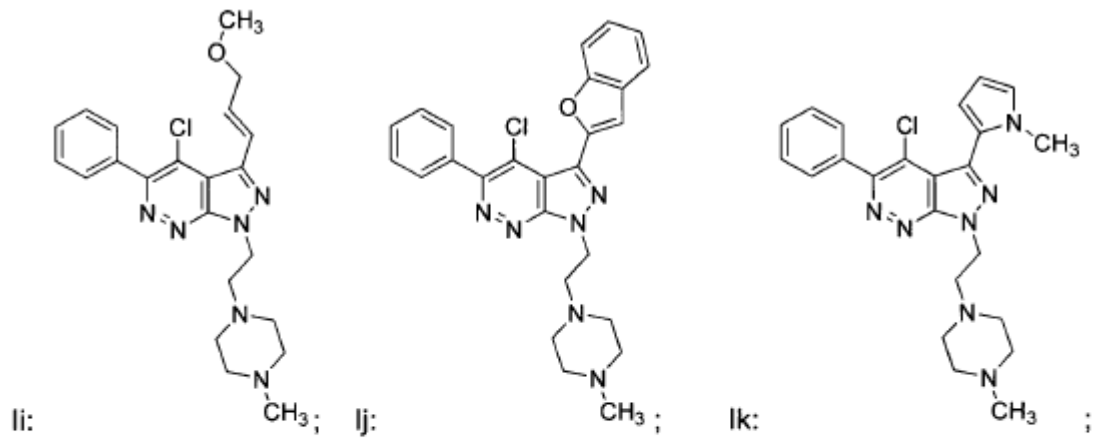
o

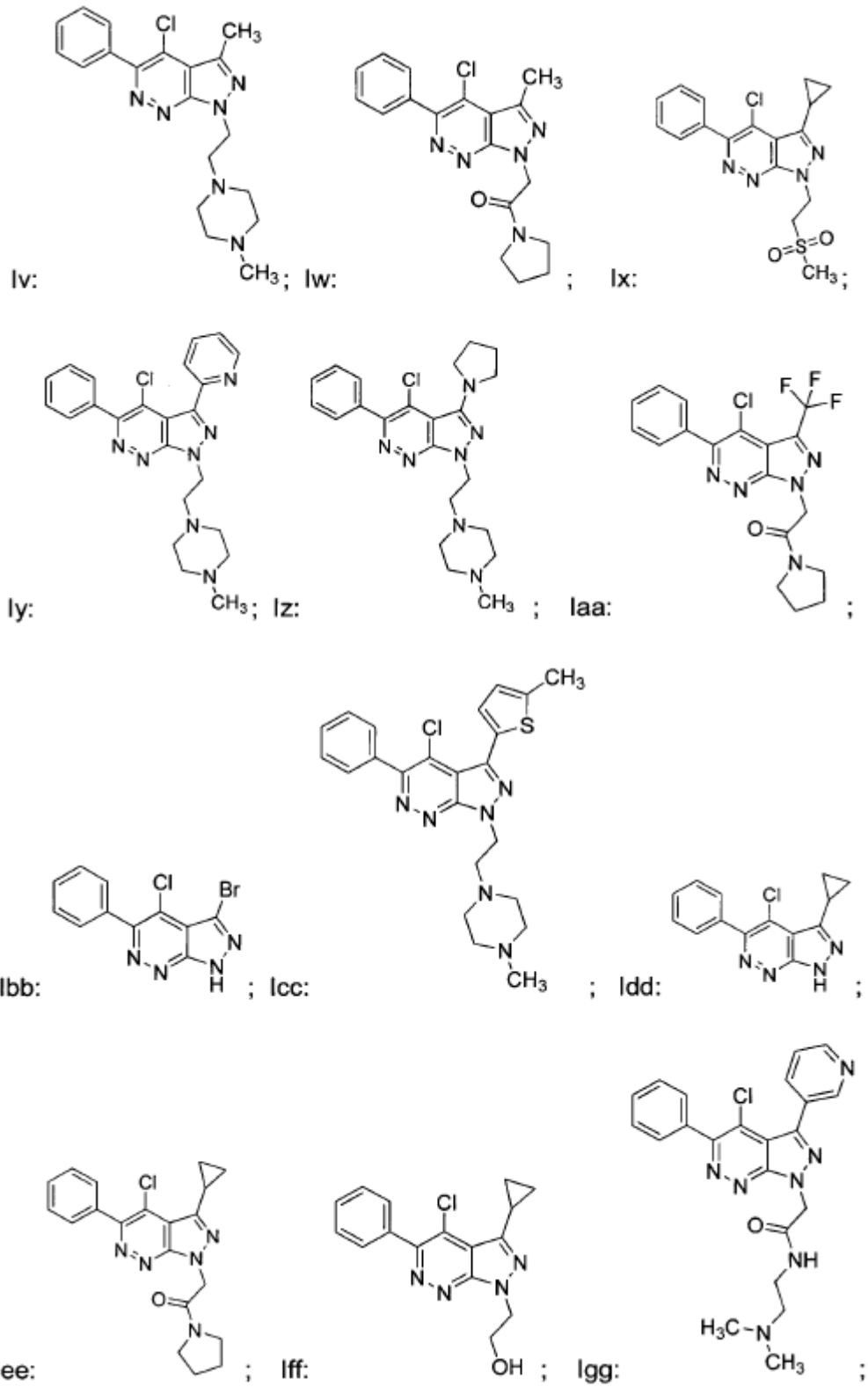


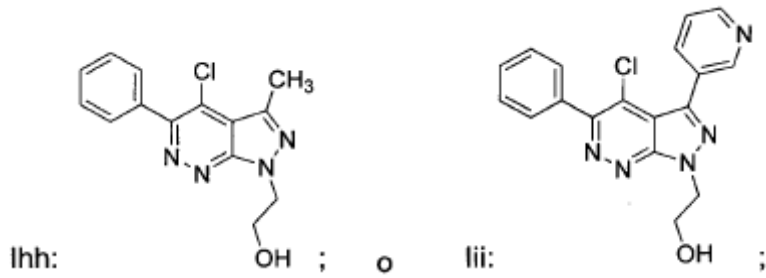
y a es 0, 1, o 2.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura



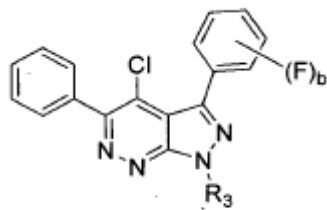






o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

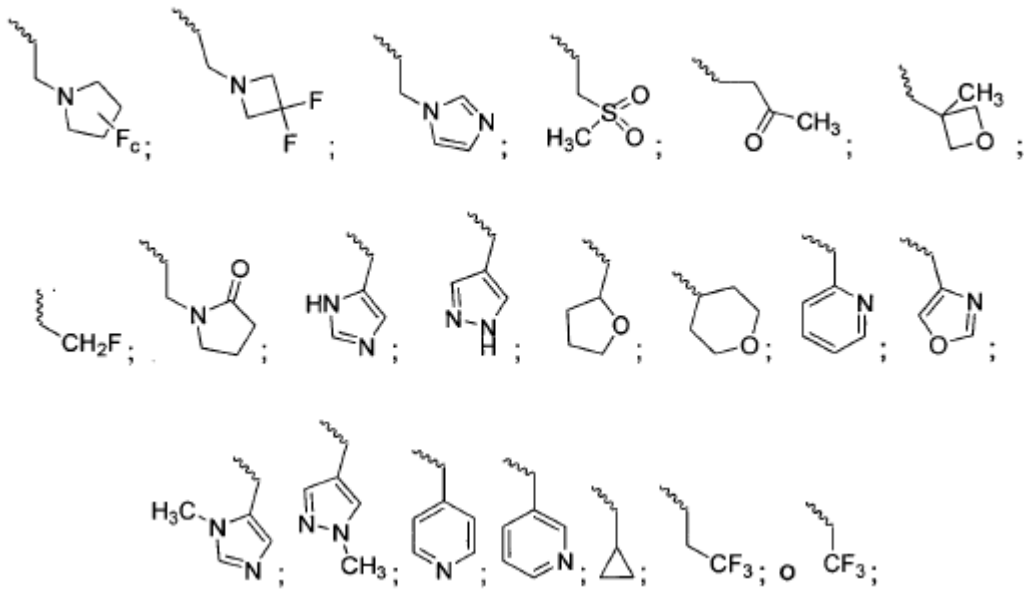
3. Un compuesto de fórmula II:



Fórmula II

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

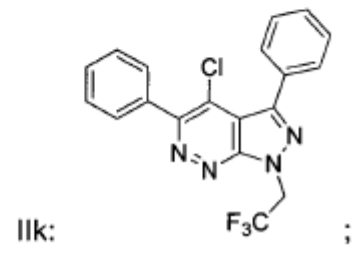
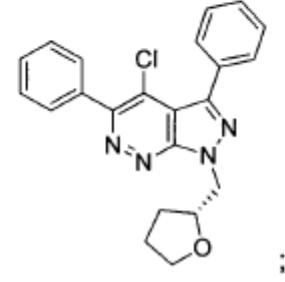
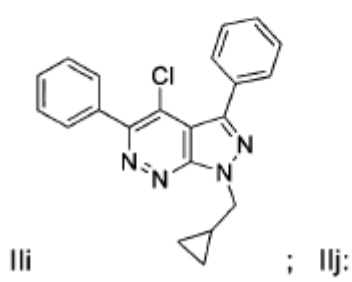
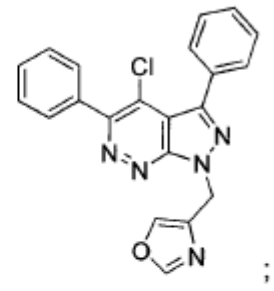
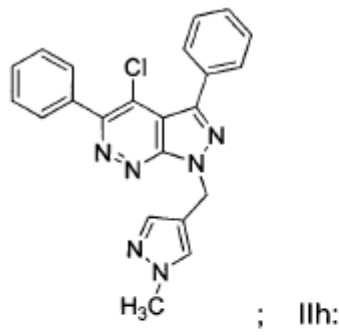
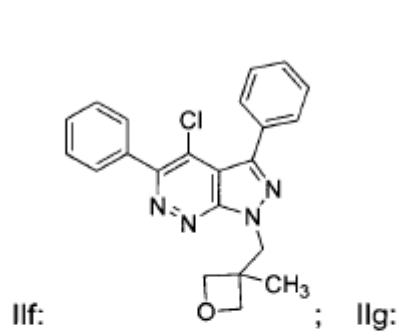
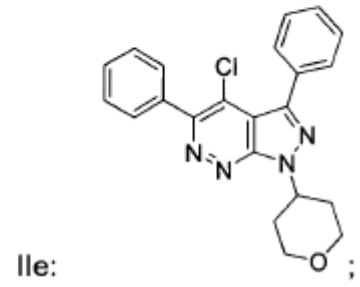
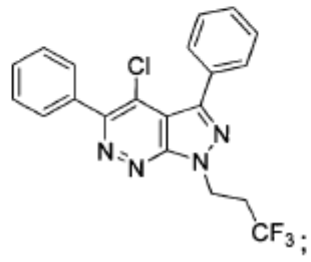
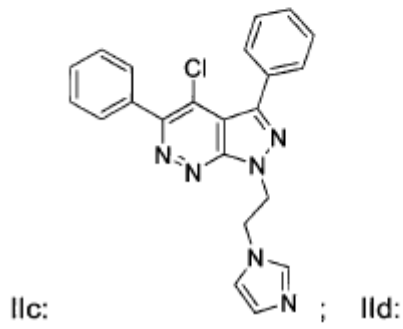
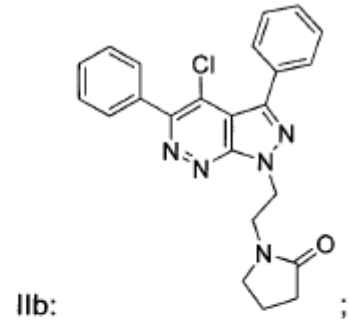
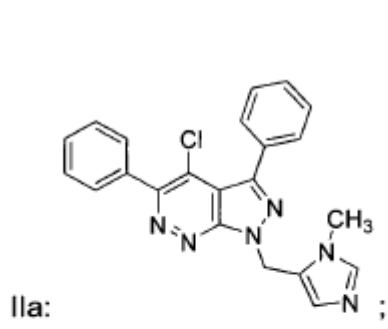
en la que R₃ es:

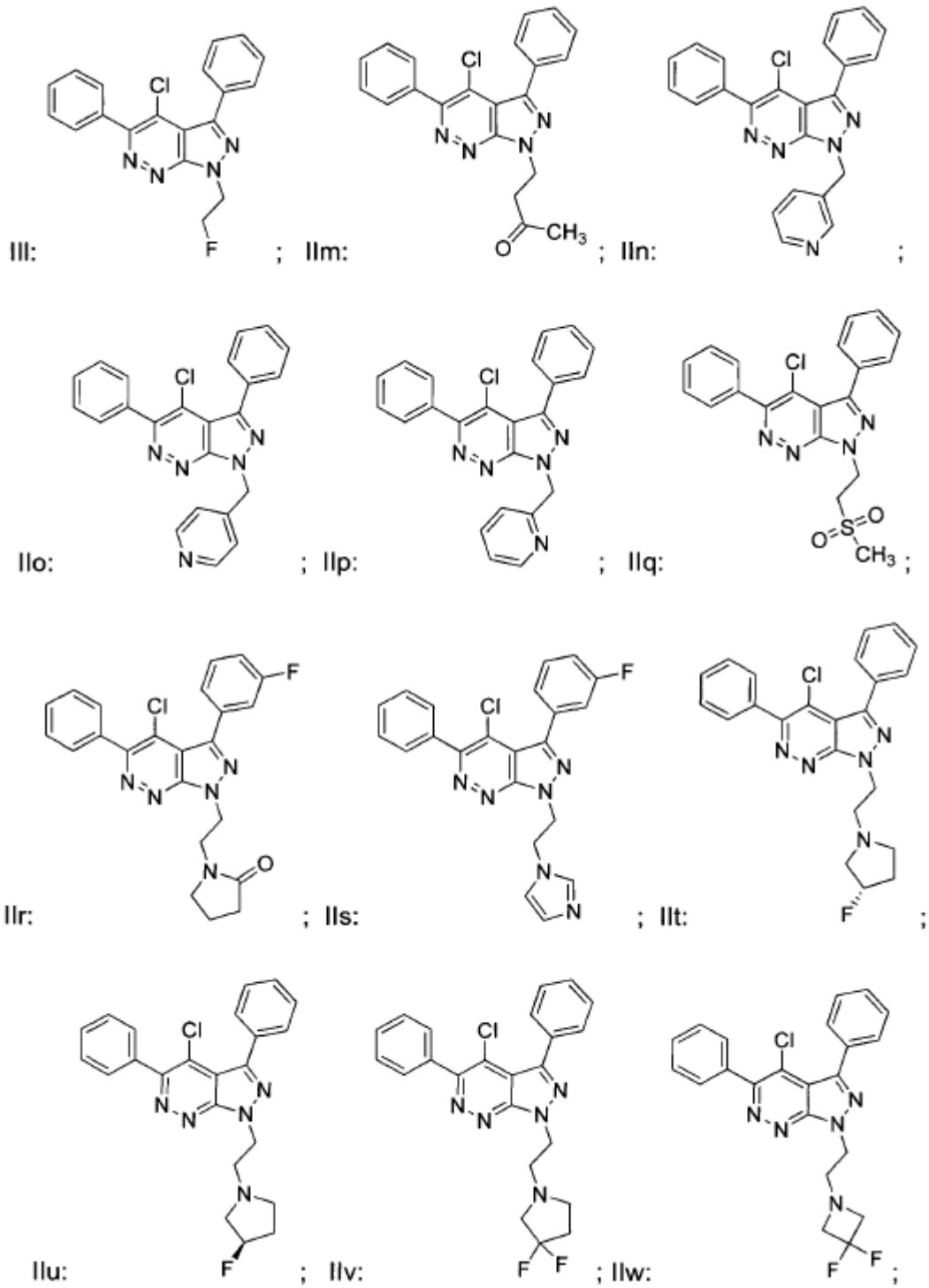


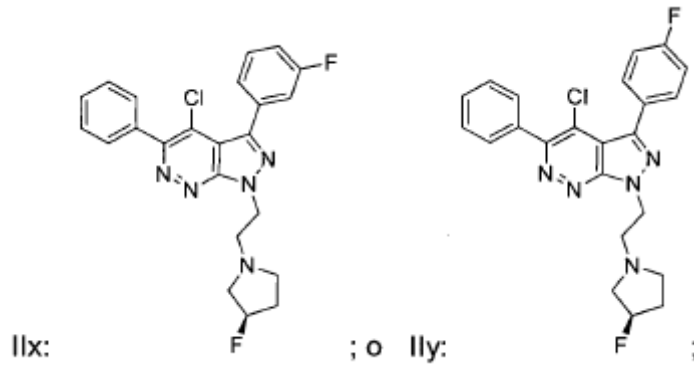
b es 0 o 1; y

c es 1 o 2.

10 4. El compuesto de la reivindicación 3, que tiene la estructura

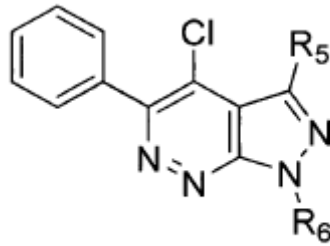






o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de fórmula XIII:

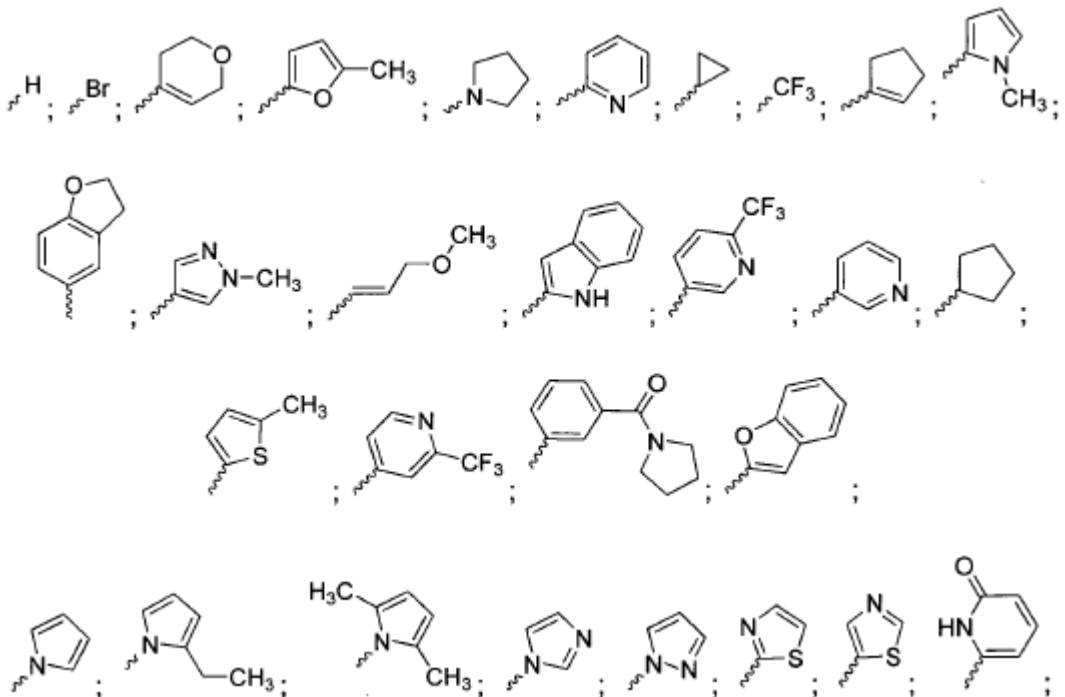


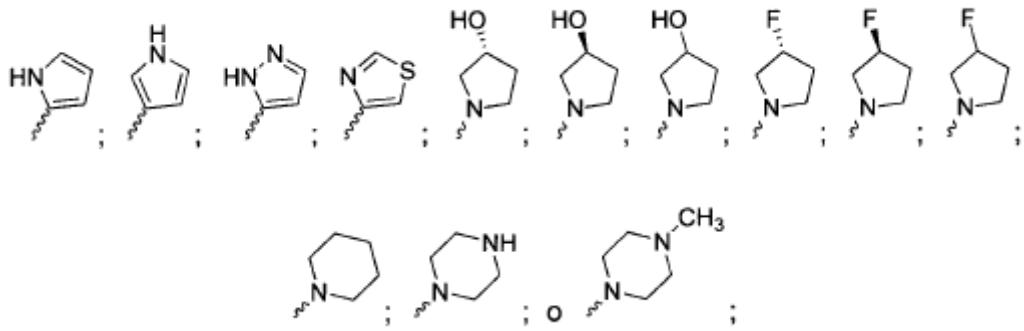
Fórmula XIII

5

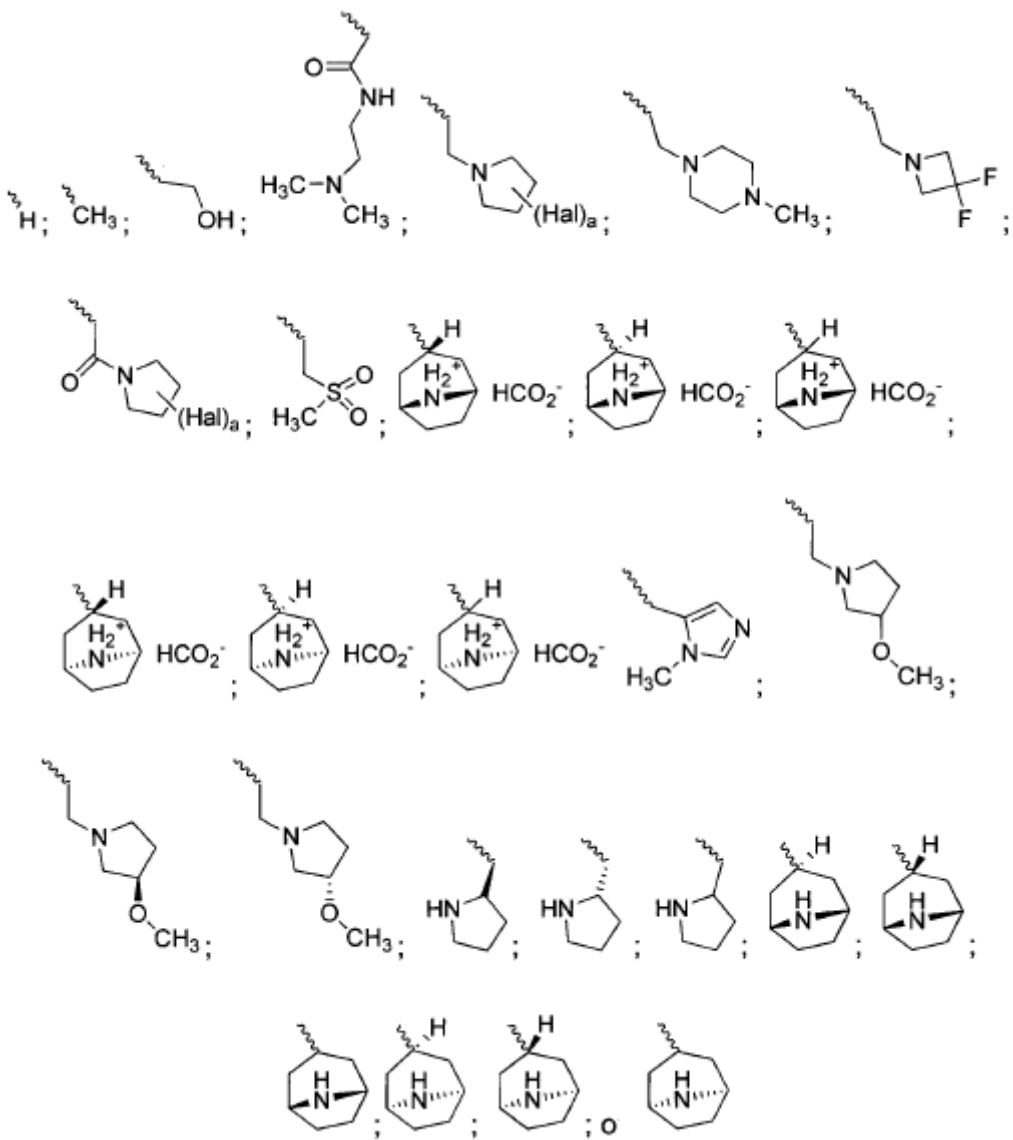
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que R₅ es:



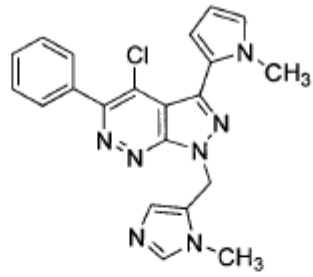


R₆ es:

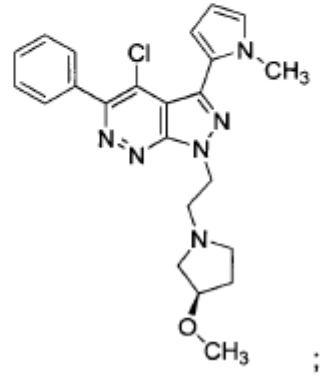


y a es 0, 1, o 2.

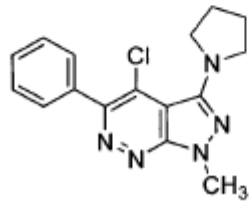
5 6. El compuesto de la reivindicación 5, que tiene la estructura



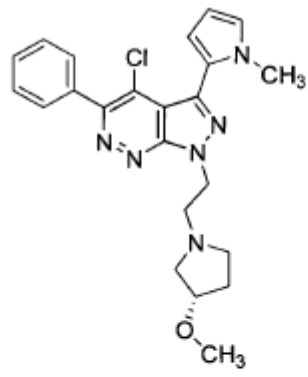
XIIIb:



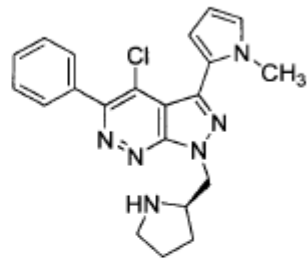
XIIIc:



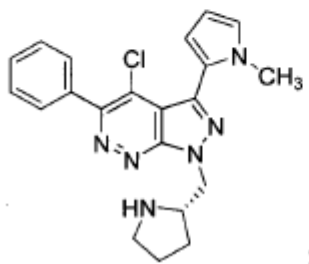
XIIIe:



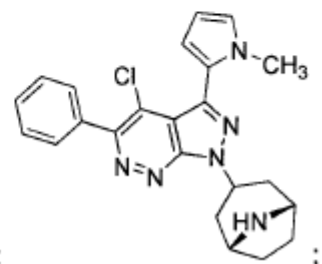
XIIIf:



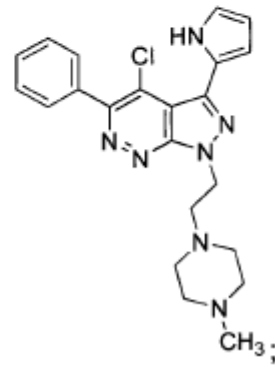
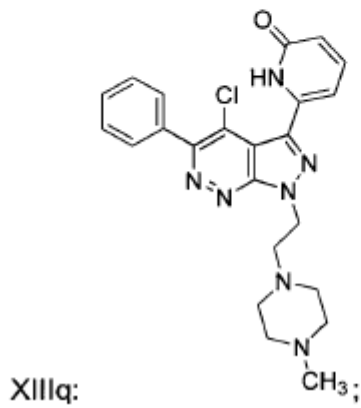
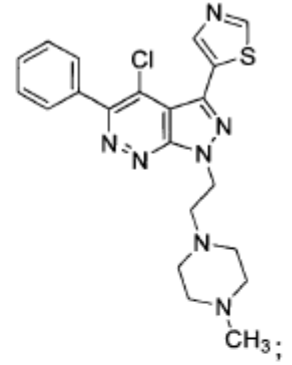
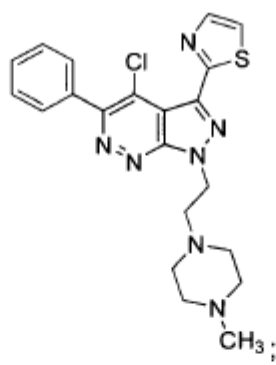
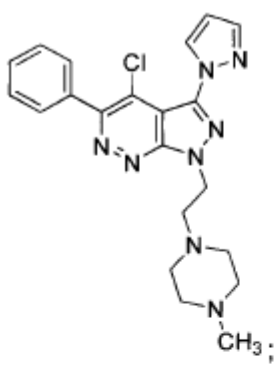
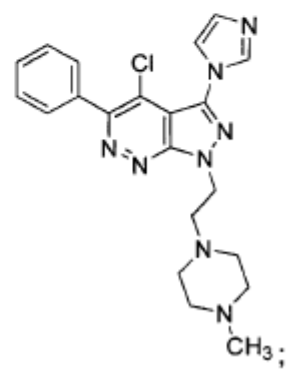
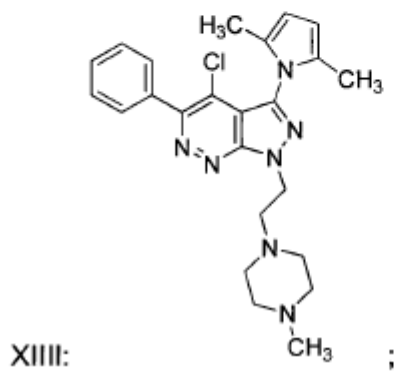
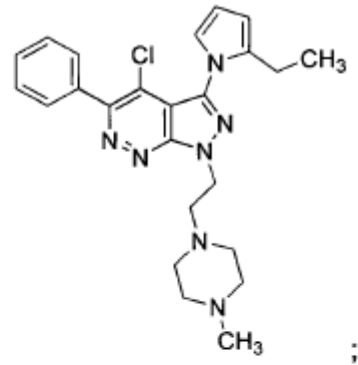
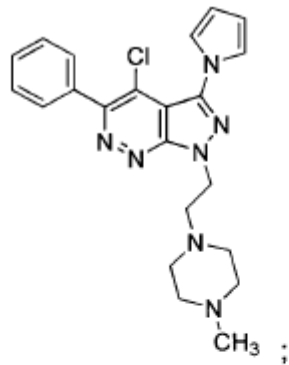
XIIIg:

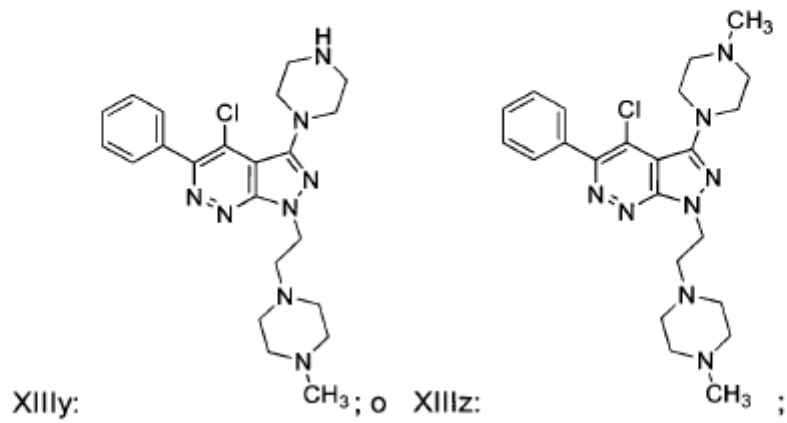
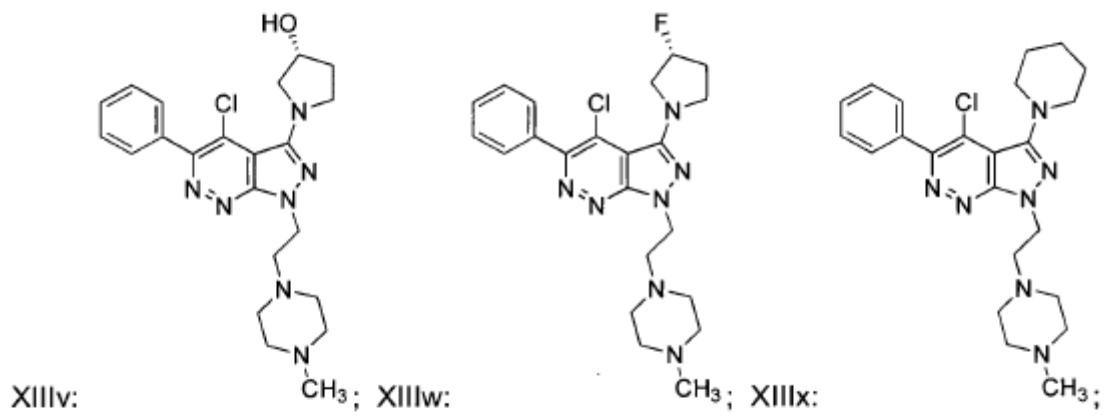
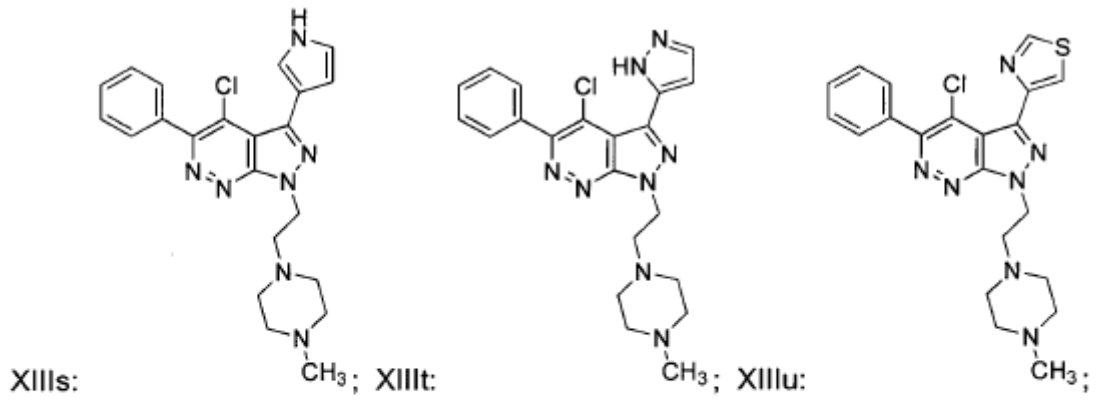


XIIIh:



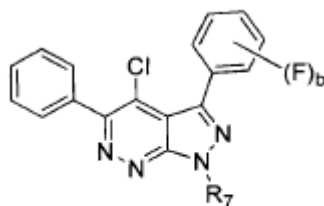
XIIIi:





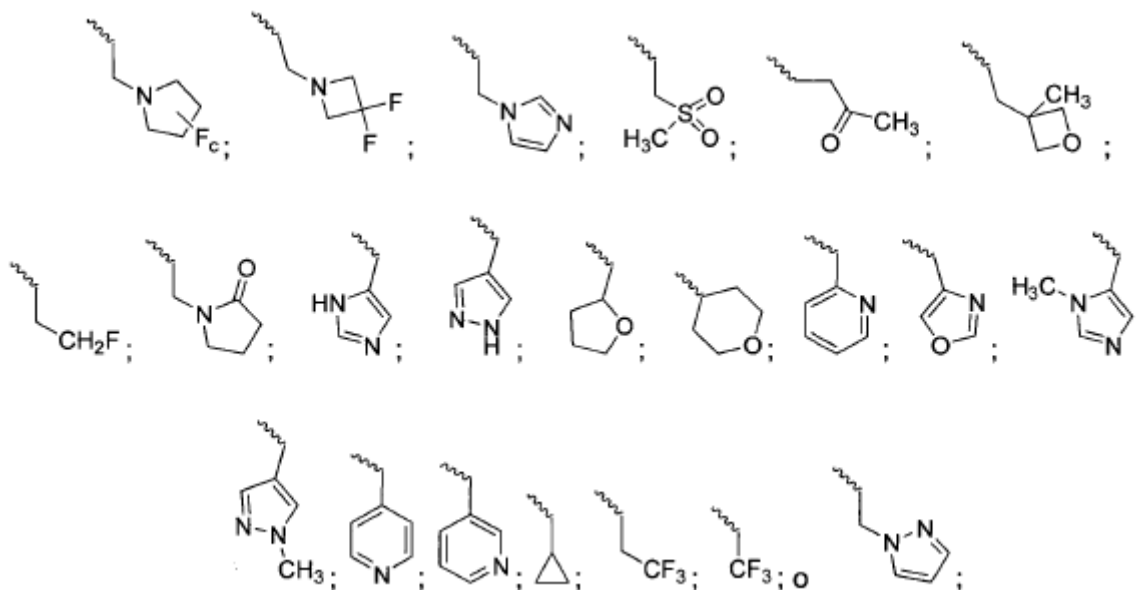
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto de fórmula XIV:



Fórmula XIV

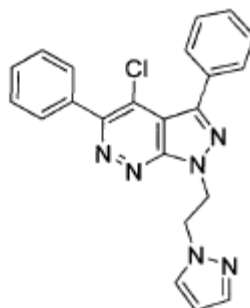
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R₇ es:



b es 0 o 1; y

c es 1 o 2.

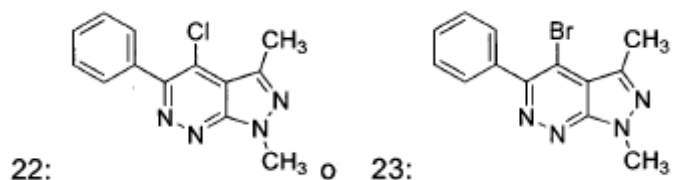
5 8. El compuesto de la reivindicación 7, que tiene la estructura



XIVa:

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

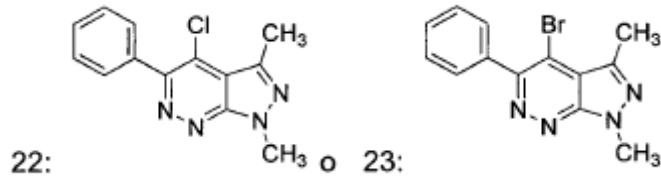
9. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un compuesto que tiene la estructura



10

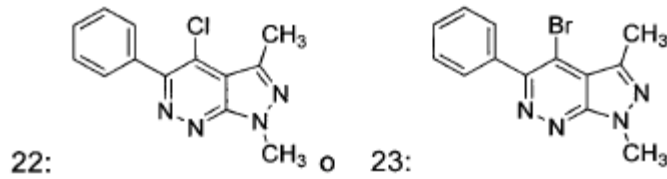
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un compuesto que tiene la estructura



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina.

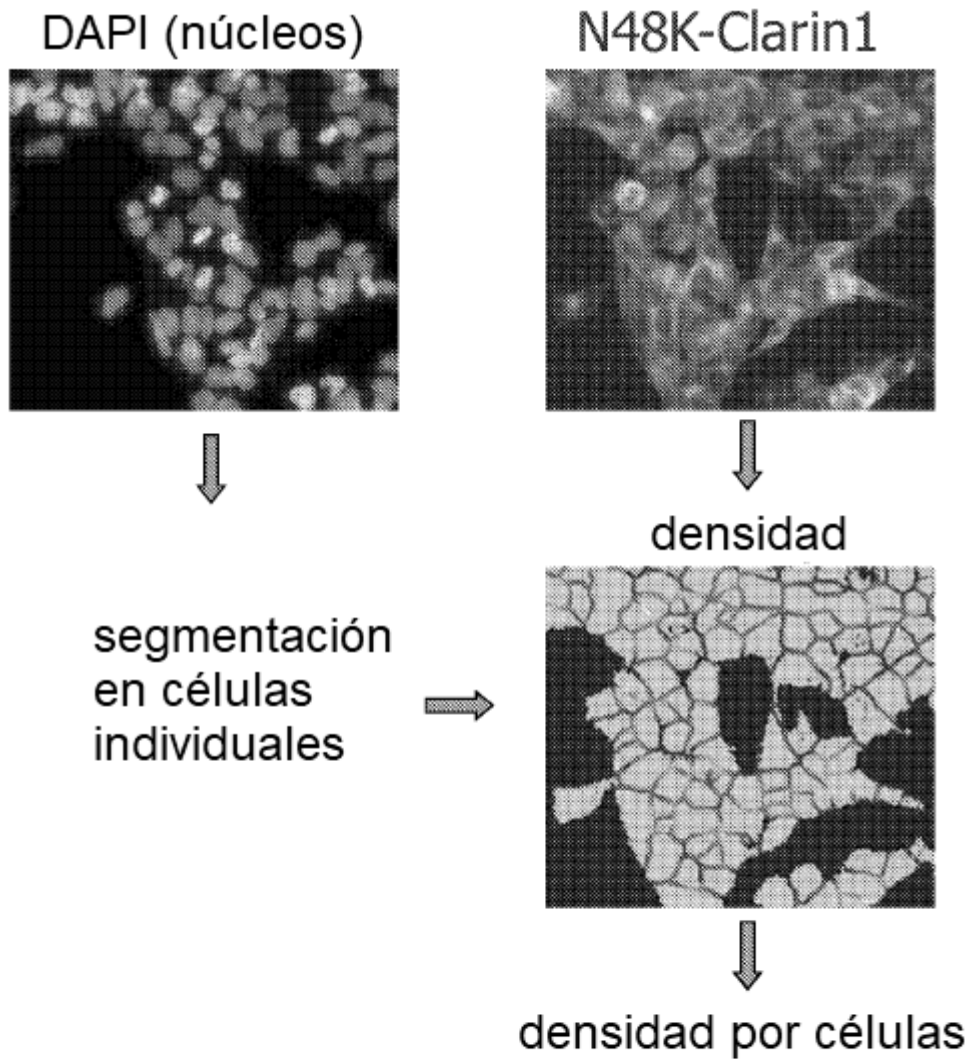
- 5 11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un compuesto que tiene la estructura



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher.

- 10 12. El compuesto como se define en la reivindicación 10 para el uso de la reivindicación 10, en el que la enfermedad degenerativa de la retina es retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, una degeneración de retina sintromica, degeneración macular relacionada con la edad o síndrome de Usher.

13. El compuesto como se define en la reivindicación 11 para el uso de la reivindicación 11 o 12, en el que el síndrome de Usher es el síndrome de Usher I, el síndrome de Usher II o el síndrome de Usher III.



Análisis de contenido alto. Los núcleos teñidos con DAPI se utilizan para realizar la segmentación de la imagen en células individuales. La densidad observada en el canal N48K Clarín-1 (Cy3) se calcula por célula y se promedia sobre un campo.

Fig. 1