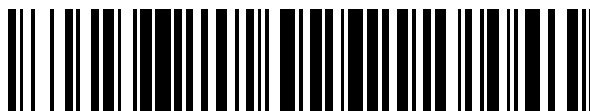


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 166**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/US2013/066938**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066835**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13849803 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2912038**

54 Título: **Pirazolopiridina y métodos para tratar las enfermedades retinales degenerativas y la pérdida auditiva asociadas con el síndrome de Usher**

30 Prioridad:

25.10.2012 US 201261718593 P
08.03.2013 US 201361775376 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2018

73 Titular/es:

USHER III INITIATIVE, INC. (100.0%)
191 North Wacker Drive, Suite 1790
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 2 693 166 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

Pirazolopiridina y métodos para tratar las enfermedades retinales degenerativas y la pérdida auditiva asociadas con el síndrome de Usher.

El Síndrome de Usher, un raro trastorno genético y una de las principales causas de sordera y ceguera, se asocia con una mutación en cualquiera de los diez genes. Otros nombres para el síndrome incluyen el síndrome de Hallgren, el síndrome de Usher-Hallgren, el síndrome de RP-Disacusia y el síndrome de la Disacusia de Distrofia Retinae.

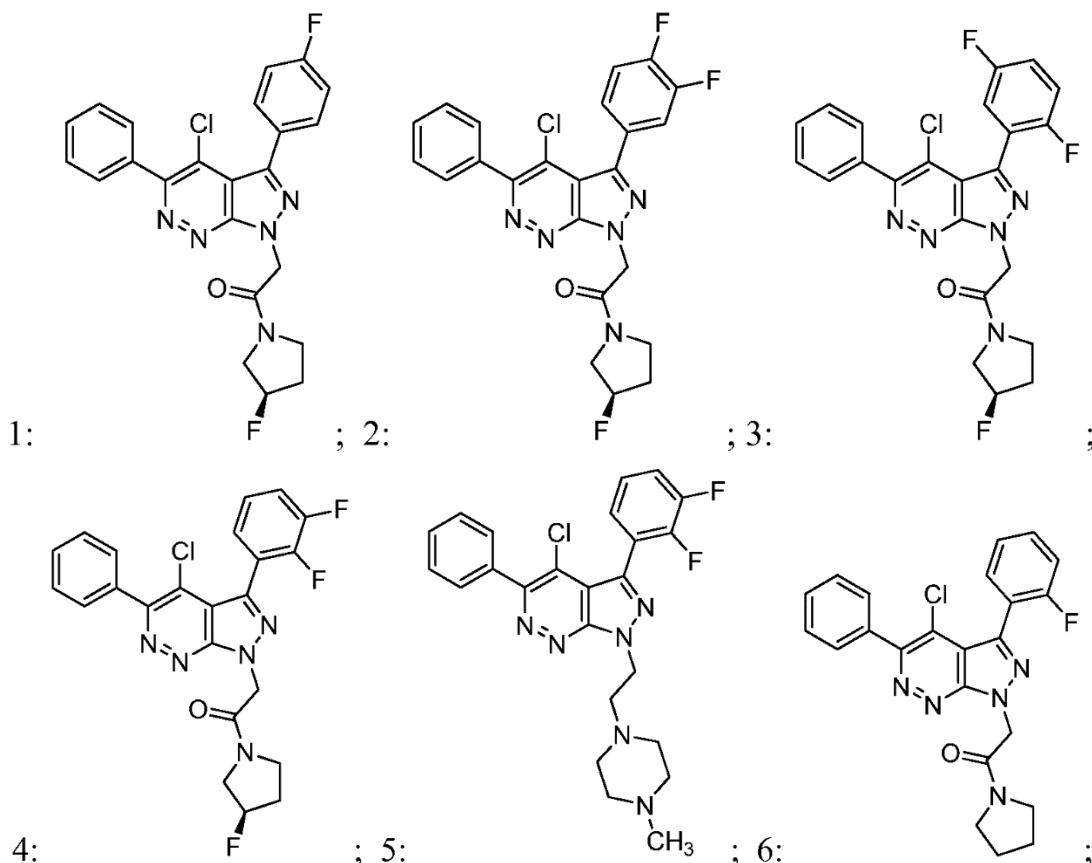
El Síndrome de Usher se caracteriza por sordera y pérdida gradual de la visión. La pérdida de audición se asocia con defectos del oído interno, mientras que la pérdida de visión se asocia con retinitis pigmentosa (RP), una degeneración de las células de la retina. Por lo general, las células bastones de la retina se ven afectadas primero, lo que lleva a la ceguera nocturna y la pérdida gradual de la visión periférica. Algunos casos involucran la degeneración temprana de las células del cono de la mácula, lo que lleva a una pérdida de la agudeza central. En algunos casos, la visión foveal del paciente se libra, lo que conduce a una "visión de dona", en la que la visión central y periférica permanece intacta, pero interrumpida por un anillo de ceguera.

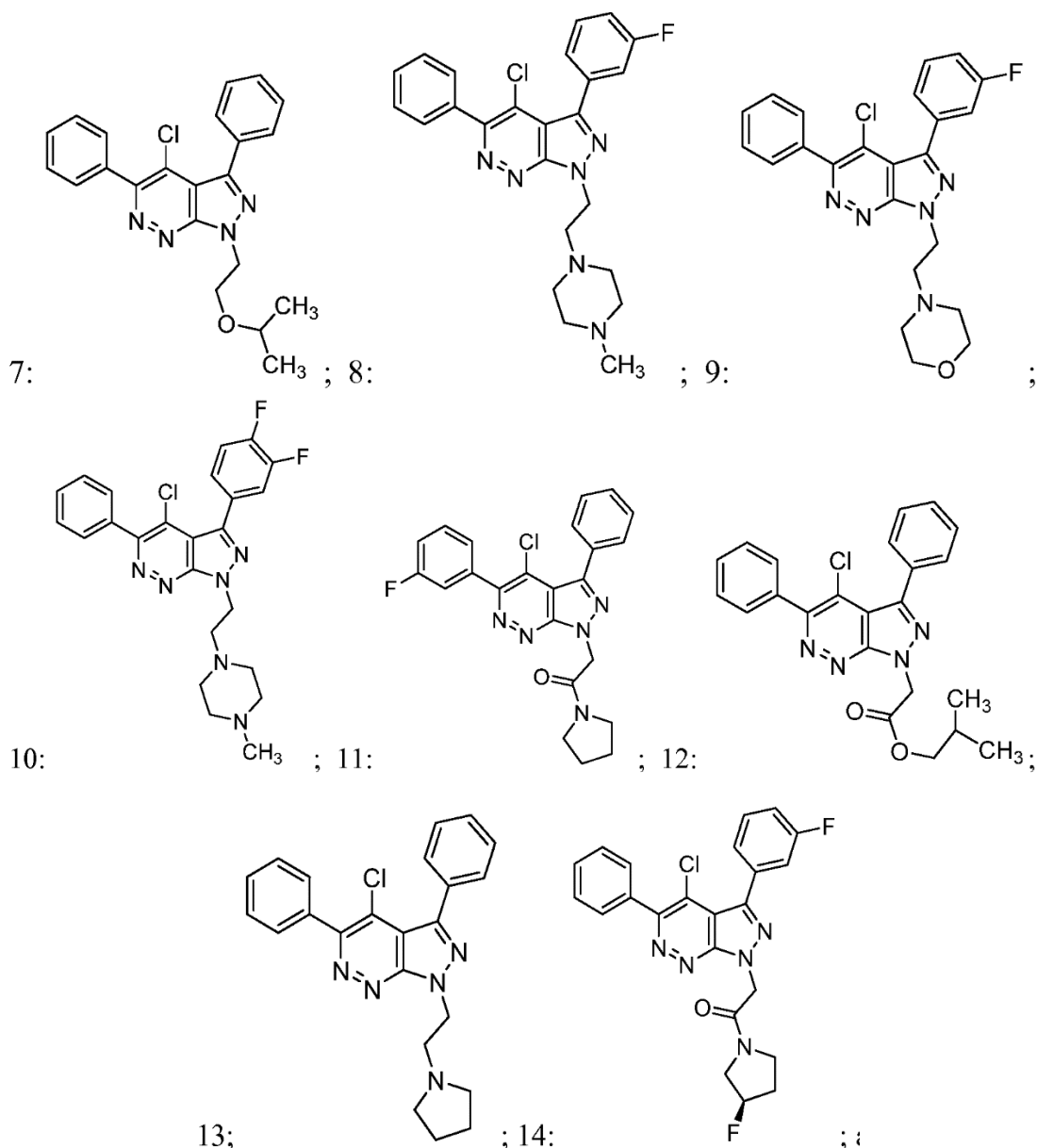
El Síndrome de Usher tiene tres subtipos clínicos, denotados: I, II y III. Los sujetos de Usher I nacen profundamente sordos, comienzan a perder visión en diez años y muestran dificultades de equilibrio. Son lentos para aprender a caminar cuando niños, debido a anomalías vestibulares. Los sujetos de Usher II sufren una pérdida auditiva menor, no sufren desequilibrios físicos y comienzan a perder la visión en la adolescencia. Gran parte de su audición se puede conservar en la mediana edad. Los sujetos de Usher III sufren pérdida gradual de audición y visión y pueden sufrir desequilibrios físicos.

El síndrome de Usher es una condición variable; el grado de severidad no está estrechamente vinculado al subtipo. Por ejemplo, un sujeto Usher III puede ser asintomático en la infancia, pero desarrollar una pérdida auditiva y visual profunda desde la edad adulta hasta la mitad de la edad adulta. El deterioro visual sustancial antes de los 50 años es común en los sujetos Usher III. Un sujeto de Usher I, por otro lado, puede ser sordo de nacimiento, pero mantener una buena visión central en la vejez. Se puede hacer referencia adicional a WO2014/066836 y WO2012/148994.

Resumen de la invención

La invención proporciona compuestos que tienen las siguientes estructuras:





5 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Sin embargo, el compuesto 14 no pertenece a la invención.

10 Cada uno de los Compuestos 1-14 anteriores, 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 una pérdida de audición asociada con el Síndrome de Usher.

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

La invención describe además métodos para tratar una enfermedad degenerativa de la retina, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de pirazolopiridazina.

20 La invención describe además métodos para tratar la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de pirazolopiridazina.

Breve descripción de la figura

25 La Figura 1 ilustra la densidad de la expresión Clarin-1 N48K en las células.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona compuestos de la invención, composiciones que comprenden un compuesto de la invención y métodos para tratar una enfermedad degenerativa de la retina o pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher, que comprende administrar un compuesto de Pirazolopiridazina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

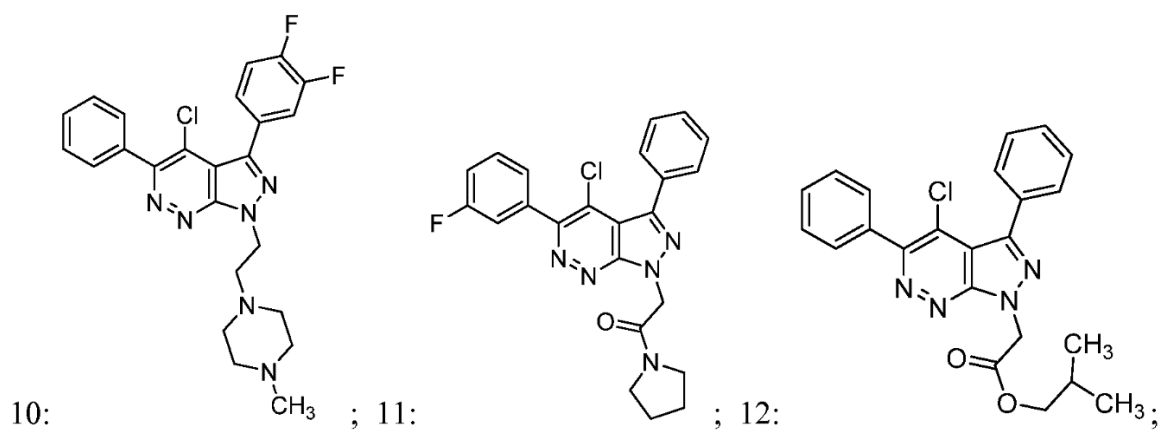
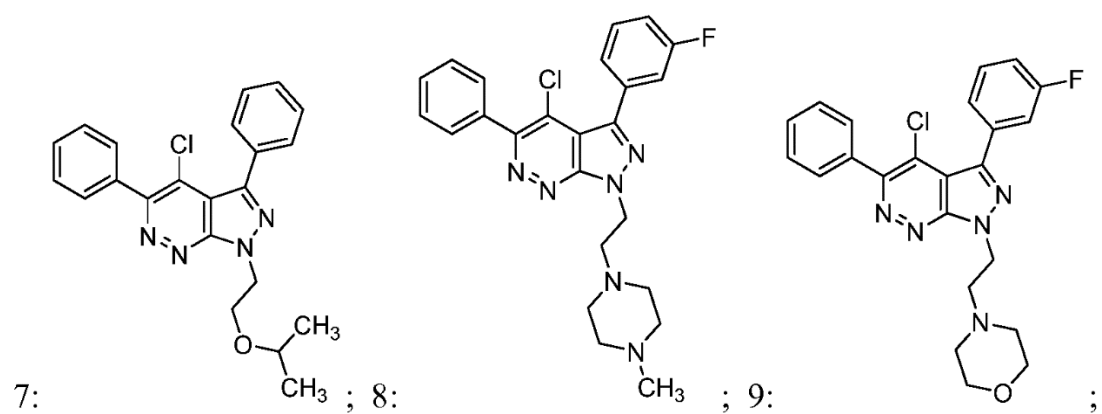
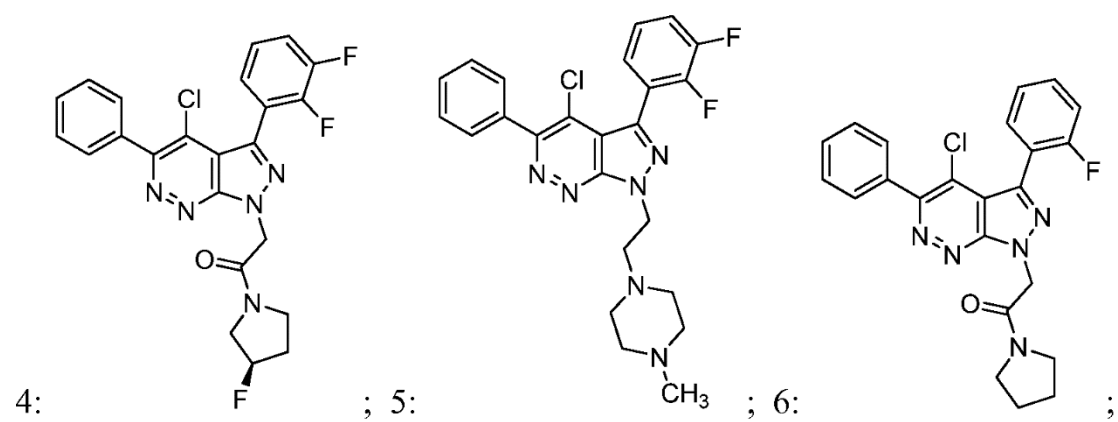
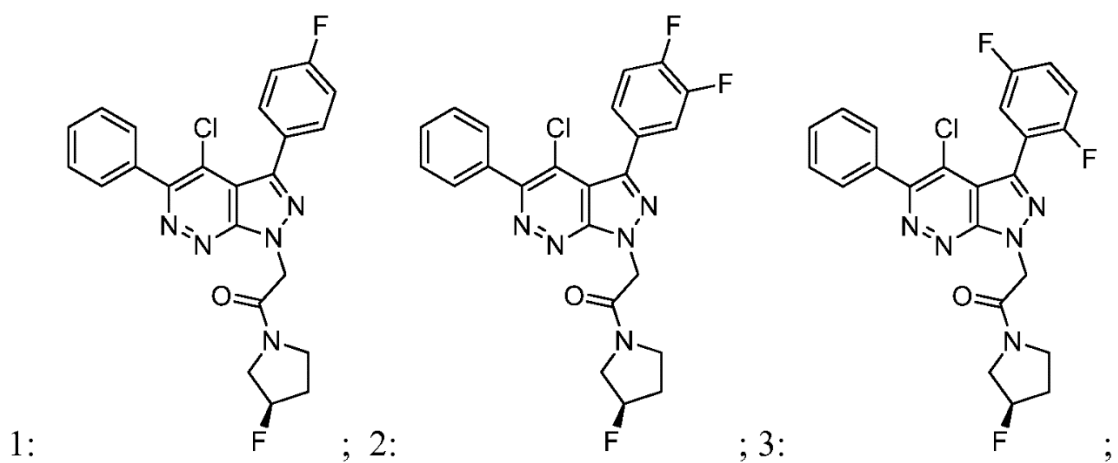
Compuestos de la invención

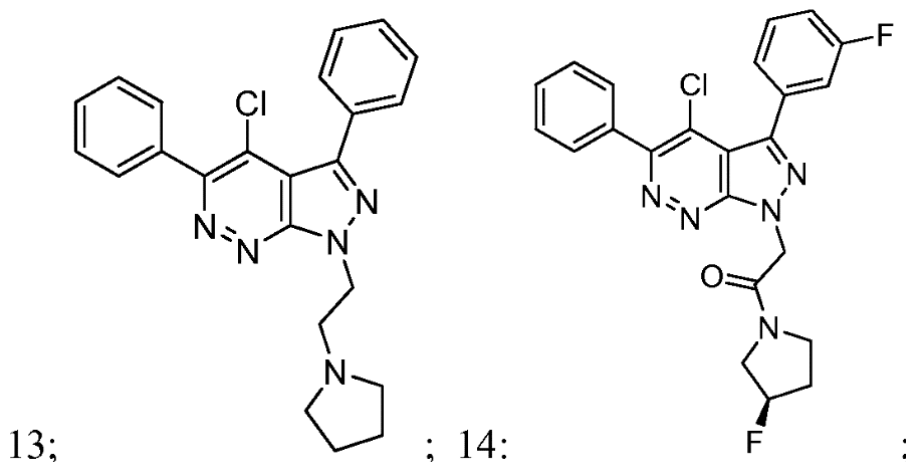
La palabra “aproximadamente” cuando precede inmediatamente a un valor numérico significa un intervalo de más o menos el 10% de ese valor, por ejemplo, “aproximadamente 100 mg” significa 90 mg a 110 mg, “aproximadamente 300 mg” significa 270 mg a 330 mg, etc.

Abreviaturas

15	APCI	Ionización Química de la Presión Atmosférica
	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
20	DIPEA	Diisopropiletilamina
	DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
	DMF	Dimetilformamida
25	DMSO	Dimetilsulfóxido
	EDAC	Clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
30	ESI	Ionización por electropulverización
	ESI-TOF	Ionización por electropulverización en tiempo de vuelo
	HATU	Hexafluorofosfato 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 -tetrametiluronio
35	HOPO	2-hidroxipiridina-N-óxido
	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
40	LCMS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
	LDA	Litio diisopropil amida
	m/z	Relación masa a carga
45	MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo
	MS	Espectrometría de masas
50	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	Rt	Tiempo de retención
	SDS	Dodecilsulfato de sodio
55	THF	Tetrahidrofurano

La invención proporciona compuestos que tienen las siguientes estructuras:





y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Algunos de los compuestos divulgados en el presente documento, por ejemplo, los Compuestos 1-4 y 14, se representan con una cuña en negrita o rayada, lo que indica una estereoquímica absoluta.

Sin estar limitado por ningún mecanismo en particular, se considera que la fracción bisfenil pirazolopiridazina de los compuestos de pirazolopiridazina está involucrado 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).

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 ácido y sales de adición de base. 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.

Las sales de adición de ácido pueden surgir 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. Ejemplos no limitantes de ácidos adecuados incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido fosfórico, ácido fosfórico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido 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, y ácido, ácido p-toluensulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido 2-fosfoglicérico, ácido 3-fosfoglicérico, ácido glucosa-6-fosfórico y un aminoácido.

Los ejemplos no limitantes de sales de adición de ácido adecuadas incluyen una sal de clorhidrato, una sal de bromhidrato, una sal de yoduro, 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 dihidrógeno fosfato, sal de carbonato, sal de bicarbonato, sal de nicotinato, sal de isonicotinato, sal de lactato, sal de salicilato, sal de 4-aminosalicilato, sal de tartrato, sal de ascorbato, sal de gentisinato, sal de gluconato, sal de glucaronato, sal de saccarato, sal de formiato, sal de benzoato, sal de glutamato, sal de pantotenato, sal de acetato, sal de propionato, sal de butirato, sal de fumarato, sal de succinato, sal de citrato, 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, y una sal de N-ciclohexilsulfamato, una sal de metanosulfonato, una sal de etanosulfonato, sal de bencenosulfonato, sal de p-toluenosulfonato, sal de 2-hidroxietanosulfonato, sal de etano-1,2-disulfonato, sal de 4-metilbencenosulfonato, sal de naftaleno-2-sulfonato, 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.

Las sales metálicas pueden surgir 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 de metal 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 adecuados incluyen litio, sodio, potasio, cesio, cerio, magnesio, manganeso, hierro, calcio, estroncio, cobalto, titanio, aluminio, cobre, cadmio y zinc.

Los ejemplos no limitantes de sales metálicas adecuadas 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, Sal de cobalto, sal de titanio, sal de aluminio, sal de cobre, sal de cadmio y sal de zinc.

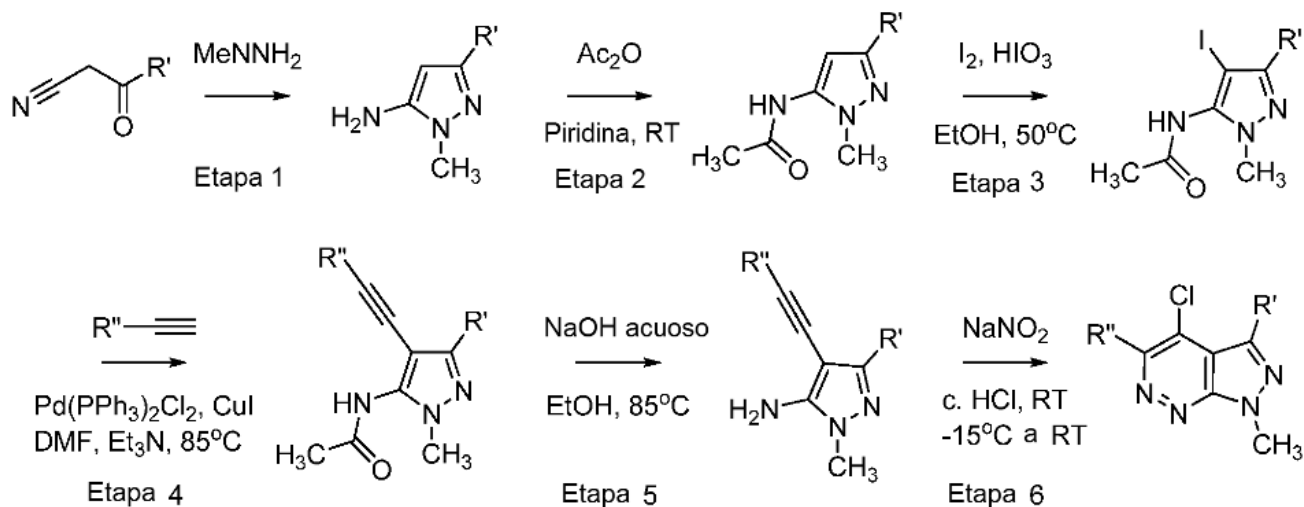
Las sales de amonio pueden surgir de la adición de amoníaco o una amina orgánica a un compuesto de la invención que tiene un grupo carboxilo. Los ejemplos no limitantes de aminas orgánicas adecuadas incluyen trietilamina, diisopropilamina, etanol amina, dietanol amina, trietanol amina, morfolina, N-metilmorfolina, piperidina, N-metilpiperidina, N-etilpiperidina, dibencilamina, piperazina, piridina, pirrazol, imidazol, pirazina, pipirazina, etilendiamina, N,N'-dibenciletilendiamina, procaina, cloroprocaína, colina, dicitlohexil amina y N-metilglucamina.

Entre los ejemplos no limitantes de sales de amonio adecuadas se 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-metilmorfolina, una sal de piperidinio, una sal de N-metilpiperidinina 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'-dibenciletilenodiamonio, una sal procainica, una sal de cloro procainica, una sal de colina, una sal de dicitlohexilamonio y una sal de N-metilglucamina.

Métodos para preparar los compuestos de pirazolopiridazina

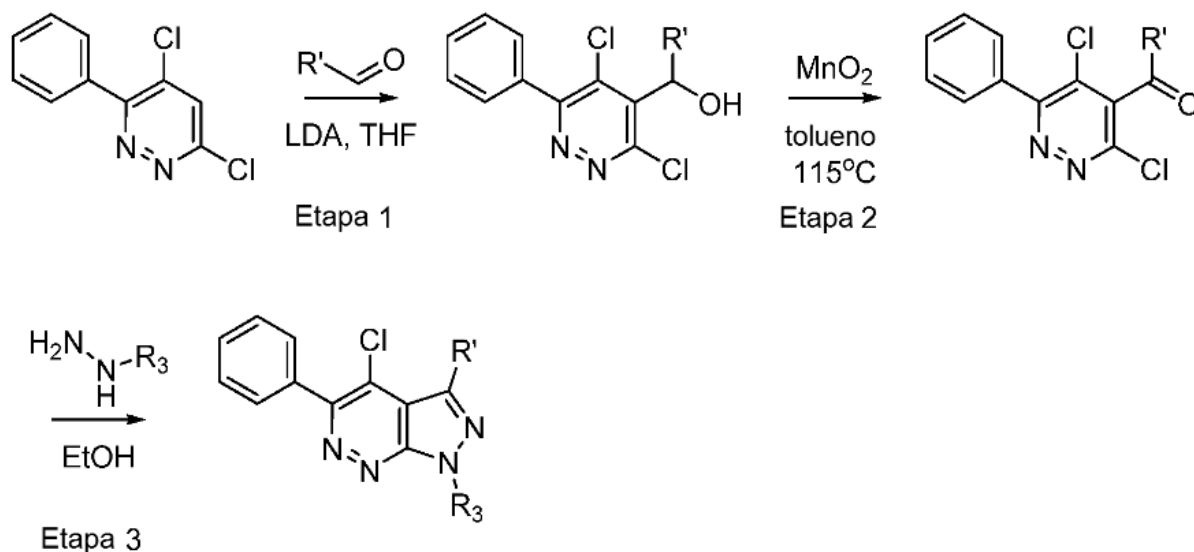
Los compuestos de pirazolopiridazina incluyen los siguientes.

Esquema 1



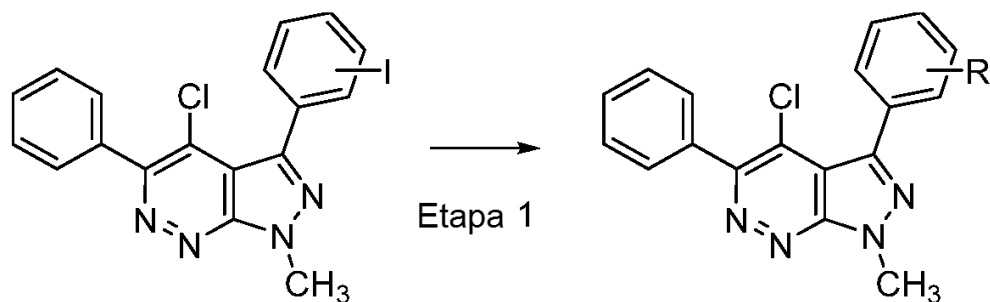
El Esquema 1 en general describe la preparación de compuestos de pirazolopiridazina que tienen un grupo 1-N-metilo y donde R' y R'' son independientemente un grupo fenilo no sustituido o sustituido. Por ejemplo, un compuesto de 2-cianocarbonilo en el que R' no está sustituido o fenilo sustituido se condensa con N-metilhidrazina para proporcionar una 1-metil-1H-pirazol-5-amino 3-sustituida. El grupo 5-amino se acila, por ejemplo, con anhídrido acético en presencia de una base, tal como piridina, para proporcionar un compuesto de 5-amido. El compuesto 5-amido se yoda, por ejemplo, con una mezcla de yodo y ácido yodado en un disolvente como etanol (EtOH) para proporcionar una N-(3-sustituida-4-yodo-1-metil-1H-pirazol) acetamida. Un acoplamiento cruzado mediado por paladio, tal como un acoplamiento cruzado de Sonagashira, de la acetamida con un alquino terminal sustituido en R'', catalizado, por ejemplo, por un complejo de paladio tal como el dicloruro de bistrifenilfosfina paladio (II) en presencia de yoduro de cobre (I) en un disolvente como la dimetilformamida (DMF) con una base como la trietilamina proporciona un alquino disustituido en el que R'' es fenilo no sustituido o sustituido. La saponificación de la acetamida de alquino con una base tal como hidróxido de sodio en un disolvente tal como etanol proporciona la amina primaria. La diazotización de la amina primaria con nitrito de sodio en ácido clorhídrico concentrado proporciona un intermediario diazo, que se cicla para proporcionar un compuesto de pirazolopiridazina que tiene un grupo 1-N-metilo y donde R' y R'' son independientemente un grupo fenilo no sustituido o sustituido.

Esquema 2



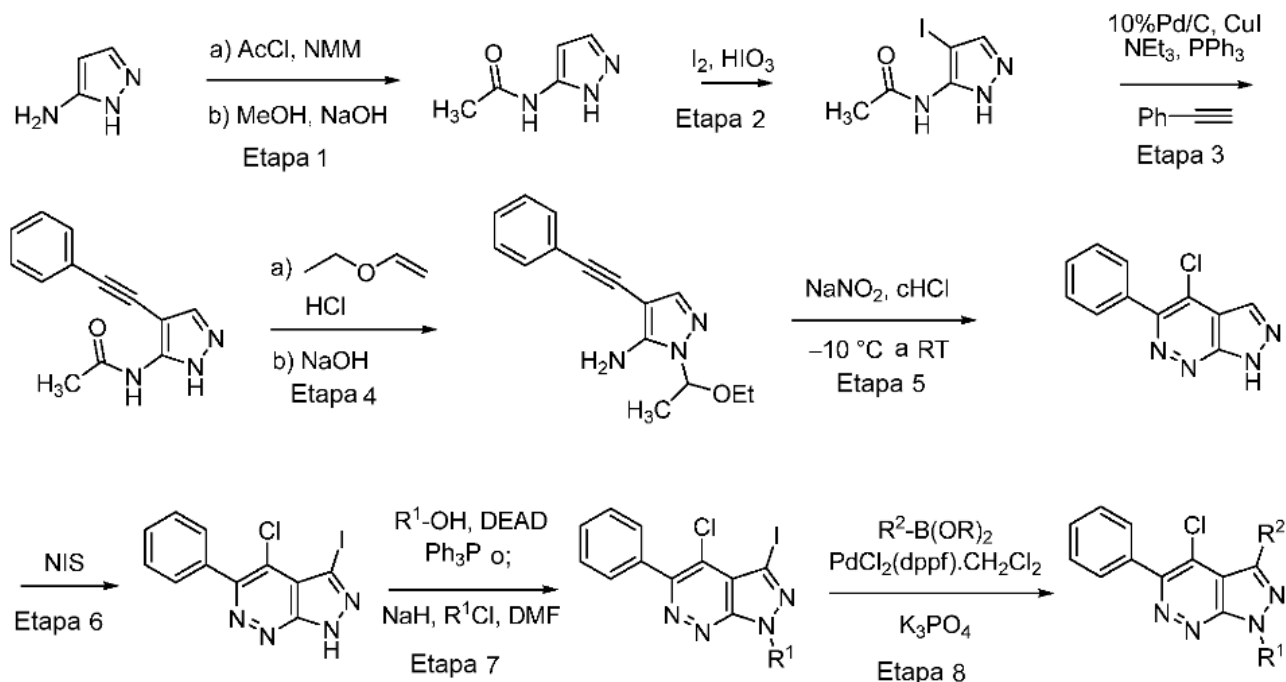
El Esquema 2 en general describe la preparación de compuestos de pirazolopiridazina que tienen un grupo R_3 y en la que R' es un grupo fenilo sustituido o no sustituido. R' y R_3 pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, la 4,6-dicloro-3-fenilpiridazina se desprotona con una base como la diisopropil amida de litio (LDA) en un disolvente como el tetrahidrofurano (THF), y la 5-litio resultante se condensa con un benzaldehído sustituido o no sustituido. para proporcionar un alcohol secundario. El alcohol se oxida a una cetona con un agente oxidante como el dióxido de manganeso en un disolvente como el tolueno. La cetona se condensa con una hidracina R_3 sustituida en un solvente tal como etanol para proporcionar una hidrazona intermedia, que cicla para proporcionar un compuesto de pirazolopiridazina que tiene un Grupo R_3 1-N, en el que R_3 se define como en las Fórmulas II y III y en el que R' es un grupo fenilo no sustituido o sustituido.

Esquema 3



El esquema 3 en general describe la preparación de compuestos de pirazolopiridazina que tienen un grupo 1-N-metilo y donde R' es un grupo ciano, un alquino, un alqueno o un grupo arilo. Por ejemplo, 1-metil-3-iodofenil-4-cloro-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazino se acopla con un compañero de acoplamiento adecuado, como una sal de cianuro, un alquino terminal, un haluro alqueno, o un haluro de arilo, opcionalmente en presencia de un catalizador adecuado tal como un complejo de paladio, opcionalmente en presencia de una sal de metal de transición no paladio tal como una sal de cinc o cobre, opcionalmente en presencia de un aditivo tal como trifenilfosfina o una base de amina orgánica, para proporcionar un compuesto de pirazolopiridazina que tiene un grupo 1-N-metilo y donde R' es un grupo ciano, un alquino, un alqueno o un grupo arilo. La posición de R' , es decir, orto, meta o para, en el producto es la misma que la posición del grupo yodo en el material de partida.

Esquema 4



El Esquema 4 en general describe la preparación de compuestos de pirazolopiridazina.

5 Usos terapéuticos

Un compuesto de la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesite 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 retinianas sindrómicas, degeneración macular relacionada con la edad, incluida la degeneración macular relacionada con la edad húmeda y seca, y 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.

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.

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

Los compuestos de la invención se pueden administrar a un sujeto como un componente de una composición que comprende un vehículo o vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitativos de portadores o vehículos farmacéuticos adecuados 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 descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, agua tamponada y solución salina tamponada 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 de acacia, 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 agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes.

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

La dosis de un compuesto de la invención puede variar según 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 pueden ser administradas en una dosis única o en dosis divididas. En algunas realizaciones, la dosis de un compuesto de la invención varía de aproximadamente 0.01 ng a aproximadamente 10 g por kg de masa corporal del sujeto, de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 0.1 g por kg, o de 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 rellenos 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 uso ocular pueden ser en forma de gotas para los ojos.

Un compuesto de la invención o composición del mismo puede proporcionarse en forma liofilizada para reconstituir, por ejemplo, en tampones isotónicos, acuosos o salinos para administración parental, 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 adecuada para administración oral, tal como una cápsula, comprimido, píldora y formulación sólida masticable. Una composición de la invención también puede prepararse 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 de aerosolización.

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

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

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

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

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas, polvos, gránulos, o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como un aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia). Las composiciones de la invención también pueden administrarse como un bolo, electuario o pasta.

Ejemplos adicionales de vehículos o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) rellenos o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol;

(4) agentes disgregantes, como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de 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 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 de tamponamiento. Se pueden emplear composiciones similares como rellenos en cápsulas de gelatina de relleno blando o duro.

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

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

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

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

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

Se puede hacer un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa de un compuesto de la invención con cualquier vehículo o vehículo farmacéuticamente aceptable, tales como tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol); proteínas tales como la albúmina sérica; ésteres de sorbitán; ácidos grasos; lecitina; aminoácidos; tampones sales; azúcares o alcoholes de azúcar.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden un compuesto de la invención y una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas, o emulsiones, o polvos estériles, farmacéuticamente aceptables, que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que puede contener antioxidantes, tampones, 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 ciertas realizaciones, otras realizaciones serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la consideración de la especificación. La invención se define adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos. Será evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse muchas modificaciones, tanto de los materiales como de los métodos, sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Métodos sintéticos generales

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos se compraron a proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional.

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

Se utiliza un Waters Xterra MS 5 µm C18, 100 x 4.6 mm (más el cartucho de protección) utilizando un acetonitrilo (grado UV lejano): agua (alta pureza a través de la unidad opción PureLab) con un gradiente de bicarbonato de amonio 10 mM (hidrogenocarbonato de amonio). El índice de fluidez fue de 2 ml/min. La detección UV se realizó utilizando un detector de matriz de diodos Waters (rango de inicio 210 nm, rango final 400 nm, intervalo de rango 4 nm). La detección de masa se realizó a través de un único instrumento LC-MS quadrupole. La ionización es ESI o APCI dependiente de

los tipos de compuestos. El gradiente utilizado abarcó desde el 95% de disolvente acuoso en el momento 0.00 min hasta el 5% de disolvente acuoso a 4.0 min.

Este porcentaje se mantuvo durante otros 1.5 min.

Condiciones estándar de HPLC ácida: (10 cm_Formic_ACE_3 C18 AR_HPLC_CH₃CN)

Se utilizó un Hichrom ACE 3 C18-AR modo mixto columna de 100 x 4.6 mm utilizando acetonitrilo (grado UV lejano) con ácido fórmico al 0.1% (V/V): agua (alta pureza a través de la unidad de opción PureLab) con un gradiente de ácido fórmico al 0.1%. El índice de fluidez fue de 1 ml/min. La detección de UV se realizó utilizando un detector de matriz de diodos Agilent (300 nm, ancho de banda 200 nm; ref. 450 nm, ancho de banda 100 nm). El gradiente utilizado se extendió desde 98% de disolvente acuoso desde el tiempo 0.00 min hasta 3.00 min, hasta 100% de solvente acuoso a las 12.00 min. Este porcentaje se mantuvo durante otros 2.4 min.

Condiciones básicas de HPLC estándar: (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC)

Se utilizó un Phenomenex, Gemini NX, 3 μ m C18, 150 x 4.6 mm columna utilizando un acetonitrilo (grado UV lejano): agua (alta pureza a través de la unidad opcional PureLab) con 10 mM de gradiente de bicarbonato de amonio. El índice de fluidez fue de 1 ml/min. La detección UV fue realizada utilizando un detector de matriz de diodos Agilent (300 nm, ancho de banda 200 nm; ref. 450 nm, ancho de banda 100 nm). El gradiente utilizado abarcó desde 95.5% de solvente acuoso a un tiempo de 0.00 min hasta 0% de solvente acuoso a 9.00 min. Este porcentaje se mantuvo durante 4.5 minutos más.

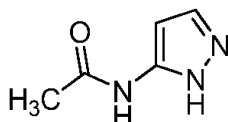
Condiciones estándar de HPLC ácida: (15cm_Formic_ASSENTIS_HPLC)

Se utilizó un Supelco, Ascentis® Express C18 o Hichrom Halo C18, columna de 2.7 μ m C18, 150 x 4.6 mm utilizando un acetonitrilo (grado UV lejano) con 0.1% (V/V) de ácido fórmico: agua (alta pureza a través de la unidad de opción PureLab) con gradiente de ácido fórmico al 0.1%. El índice de fluidez fue de 1 ml/min. La detección de UV se realizó utilizando un detector de matriz de diodos Agilent (300 nm, ancho de banda 200 nm; ref. 450 nm, ancho de banda 100 nm). El gradiente utilizado abarcó desde el 96% de disolvente acuoso en el momento 0.00 min hasta el 0% de disolvente acuoso a 9.00 min. Este porcentaje se mantuvo durante 4.5 minutos más.

Preparación sintética de compuestos ilustrativos de la invención

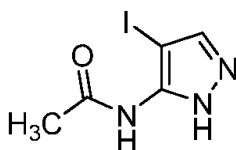
Ejemplo 1: 2-[4-cloro-3- (4-fluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il] -1 - [(3R) - 3 -fluoropirrolidin-1-il] etanona (Compuesto 1)

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



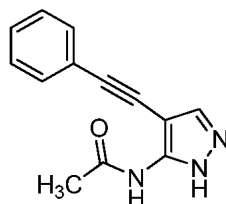
A una solución de 1H-pirazol-5-amina (50 g, 0.602 mol) y N-metilmorfolina (160 ml, 1.44 mol) en CH₂Cl₂ (2 l) se añadió cloruro de acetilo (99 ml, 1.38 mol) gota a gota a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 d. Se observó algo de producto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

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



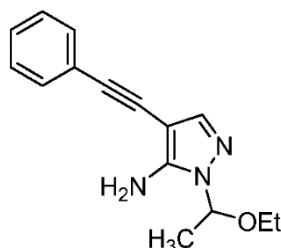
Una suspensión de N- (1H-pirazol-5-il) acetamida (60 g, 0.48 mol), ácido yódico (21.1 g, 0.12 mol) y yodo (61 g, 0.24 mol) en etanol (1.6 L) se calentó a 60 °C durante 1.5 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se repartió entre acetato de etilo solución ac. 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 del título en forma de un sólido (105 g).

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



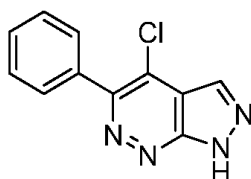
Se burbujeó nitrógeno a través de una suspensión de N- (4-yodo-1H-pirazol-5-il) acetamida (30 g, 120 mmol), paladio al 10% sobre carbono (50% de agua, 7.4 g, 3 mmol), yoduro de cobre (I) (1.14 g, 6 mmol), trifenilfosfina (6.3 g, 24 mmol) y trietilamina (50 ml, 360 mmol) en etanol (600 ml) durante 20 min. Se añadió fenil acetileno (18.3 g, 179 mmol) y se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla durante otros 25 minutos. La mezcla de reacción se calentó y se agitó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 3 días y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de celita y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 9:1 a 0:1) produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (17.6 g).

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



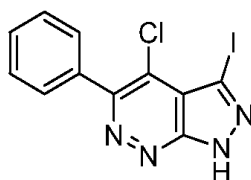
Una solución de N- (4- (feniletinil) -1H-pirazol-5-il) acetamida (17.6 g, 78 mmol), etoxieteno (11.2 mL, 117 mmol) y HCl en 1,4 -Dioxano (1 ml, 4 mmol) en CH₂Cl₂ (520 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en etanol (260 ml) y solución de NaOH ac. al 25% (260 ml) y la mezcla de reacción se calentaron a 75 °C durante 4 h y se enfriaron a temperatura ambiente. El etanol fue parcialmente concentrado al vacío y el sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y etanol frío mínimo y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido (16 g).

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



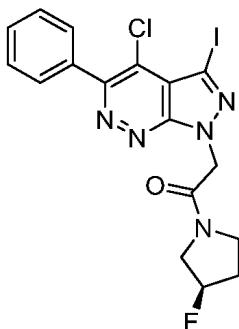
Nitrito de sodio (4.3 g, 63 mmol) se añadió HCl conc. (314 ml) a aproximadamente 15 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió 1- (1-etoxietil) -4- (feniletinil) -1H-pirazol-5-amina (3 g, 31,4 mmol) y la mezcla se agitó a aproximadamente 10 °C durante 10 minutos y a temperatura ambiente durante 1 día. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió CH₂Cl₂ (250 ml). Bajo agitación vigorosa, se añadió cuidadosamente Na₂CO₃ (160 g) seguido de una solución de NaHCO₃ ac. sat. durante un período de 2 h hasta que el pH fue 7 y no hubo más espumación en la adición adicional 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 al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/éter dietílico 1:0 a 0:1) produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (3.43 g).

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



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 amarillo se recogió por filtración mientras estaba caliente para proporcionar una mezcla del compuesto del título y el material de partida (9:1, 4 g).

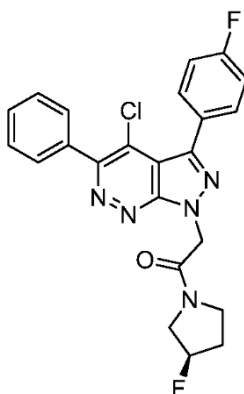
- 5 Etapa 7: 2- (4-cloro-3-yodo-5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il) -1-[(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il-etanona



- 10 El cloruro de cloroacetilo (632 μ L, 7.94 mmol) se añadió gota a gota a una solución de (3R) -3-fluoropirrolidina (1 g, 7.94 mmol) y trietilamina (2.2 ml, 15.9 mmol) en CH_2Cl_2 (20 ml) a 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron agua y CH_2Cl_2 . Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 . Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío, para dar 2 cloro-1 -[(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona (4.7 g).

- 15 Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 240 mg, 6 mmol) a una solución de 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo [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 añadieron solución ac. 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 al vacío. El residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 1:0 a 3:7). El sólido resultante se disolvió en CH_2Cl_2 mínimo y se añadió dietil éter hasta que precipitó un sólido. El sólido se recogió por filtración para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (846 mg).

- 25 Etapa 8: 2-[4-cloro-3- (4-fluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il]-1-[(3R) -3- fluoropirrolidin-1-il] etanona (Compuesto 1)

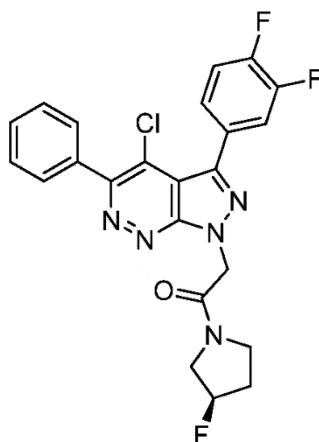


- 30 Se burbujeó nitrógeno a través de una suspensión de 2- (4-cloro-3-yodo-5- fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il) -1- [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona (70 mg, 0.144 mmol), ácido 4-fluorofenilborónico (22 mg, 0.158 mmol) y K_3PO_4 (92 mg, 0.43 mmol) en DMF (1.1 mL) y agua (0.4 ml) durante 20 min. Se añadió complejo de diclorometano de 1,1'- bis (difenilfosfino) ferroceno-paladio (II) dicloruro (12 mg, 0.014 mmol) y se selló el tubo y se calentó con radiación de microondas a 60 °C durante 30 min. La mezcla de reacción bruta se filtró y se purificó parcialmente mediante HPLC preparativa. El residuo se purificó mediante cromatografía (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 1:0 a 7:3) para proporcionar el Compuesto 1 (20 mg).

^1H RMN δ (ppm) (CHCl_3 -d): 7.82-7.72 (4 H, m), 7.55-7.47 (3 H, m), 7.22-7.13 (2 H, m), 5.68-5.52 (2 H, m), 5.50-5.20 (1 H, m), 4.00-3.79 (3 H, m), 3.68- 3.57 (1 H, m), 2.49-2.27 (2 H, m).

- 40 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3.97 min; m/z 454 [M + H] 99.6% de pureza.

Ejemplo 2: 2-[4-cloro-3- (3,4-difluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il]-1- [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona (Compuesto 2)

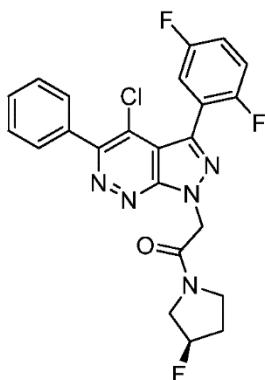


5 El compuesto 2 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, pero utilizando ácido 3,4-difluorofenilborónico en lugar de ácido 4-fluorofenilborónico en la Etapa 8.

10 ^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.75-7.72 (2 H, m), 7.68-7.62 (1 H, m), 7.57-7.48 (4 H, m), 7.34-7.30 (1 H, m), 5.70-5.53 (2 H, m), 5.46-5.19 (1 H, m), 3.98- 3.81 (3 H, m), 3.65-3.58 (1 H, m), 2.50-2.00 (2 H, m).

LCMS (15cm_Formic_ASCENTIS_HPLC_CH3CN) Rt 10.32 min; m/z 472 [M + H] 99.6% de pureza.

15 Ejemplo 3: 2-[4-cloro-3- (2,5-difluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il]-1- [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona (Compuesto 3)

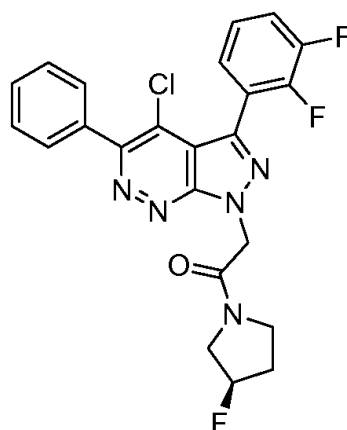


20 El Compuesto 3 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, pero utilizando ácido 2,5-difluorofenilborónico en lugar de 4-fluorofenilborónico ácido en la Etapa 8.

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.78-7.74 (2 H, m), 7.55-7.47 (3 H, m), 7.38-7.33 (1 H, m), 7.19-7.14 (2 H, m), 5.68-5.53 (2 H, m), 5.39-5.33 (1 H, m), 4.00- 3.81 (3 H, m), 3.65-3.55 (1 H, m), 2.50-2.00 (2 H, m).

25 LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.51 min; m/z 472 [M + H] 93.72% de pureza.

Ejemplo 4: 2-[4-cloro-3- (2,3-difluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il]-1- [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona (Compuesto 4)

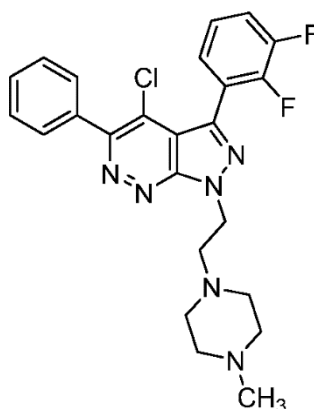


El compuesto 4 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, pero utilizando ácido 2,3-difluorofenilborónico en lugar de ácido 4-fluorofenilborónico en la Etapa 8.

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.77-7.74 (2 H, m), 7.54-7.47 (3 H, m), 7.43-7.37 (1 H, m), 7.33-7.29 (1 H, m), 7.24-7.17 (1 H, m), 5.69-5.54 (2 H, m), 5.41- 5.25 (1 H, m), 4.01-3.78 (3 H, m), 3.65-3.58 (1 H, m), 2.00 (2 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH 3 CN) Rt 10.52 min; m/z 472 [M + H] pureza del 95.5%.

Ejemplo 5: 4-cloro-3- (2,3-difluorofenil)-1-(2-(4-metilpiperazin-1-il) etil)-5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazina (Compuesto 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 trifetilfosfina (2.07 g, 7.9 mmol) en 1,4-dioxano (26 ml) se calentó a 85 °C por 1 h y luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, comenzando con isohexano/acetato de etilo 1:0 a 0:1, luego acetato de etilo/4 M NH $_3$ en MeOH 1:0 a 9:1) para proporcionar 4-cloro-3-yodo-1- (2- (4- metilpiperazin-1-il) etil) -5-fenil-1H pirazolo [3,4c] piridazina (761 mg).

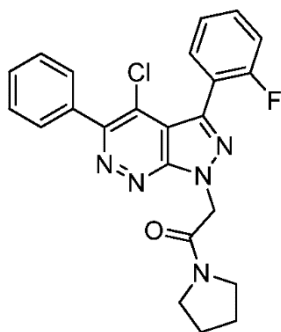
El compuesto 5 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, pero utilizando ácido 2,3-difluorofenilborónico en lugar de ácido 4-fluorofenilborónico y 4-cloro-3-yodo-1- (2- (4-metilpiperazin-1-il) etil) -5 -fenil-1H pirazolo [3,4c] piridazina en lugar de 2- (4-cloro-3-yodo-5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il) -1 - [(3R) - 3-fluoropirrolidin-1-il] etanona en la Etapa 8.

La HPLC preparativa produjo el Compuesto 5 como una sal diformato

^1H RMN δ (ppm) (DMSO-d_6): 8.18 (2 H, s), 7.68-7.64 (2 H, m), 7.62- 7.54 (1 H, m), 7.54-7.40 (4 H, m), 7.37-7.30 (1 H, m), 4.85 (2 H, t), 2.89 (2 H, t), 2.44 (4 H, bs), 2.13 (4 H, bs), 2.02 (3 H, bs).

LCMS (10cm_Formic_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH 3 CN) Rt 9.94 min; m/z 469 [M + H] pureza del 95.98%.

Ejemplo 6: 2 [4-cloro-3- (2-fluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il] 1-pirrolidin-1-il-etanona (Compuesto 6)



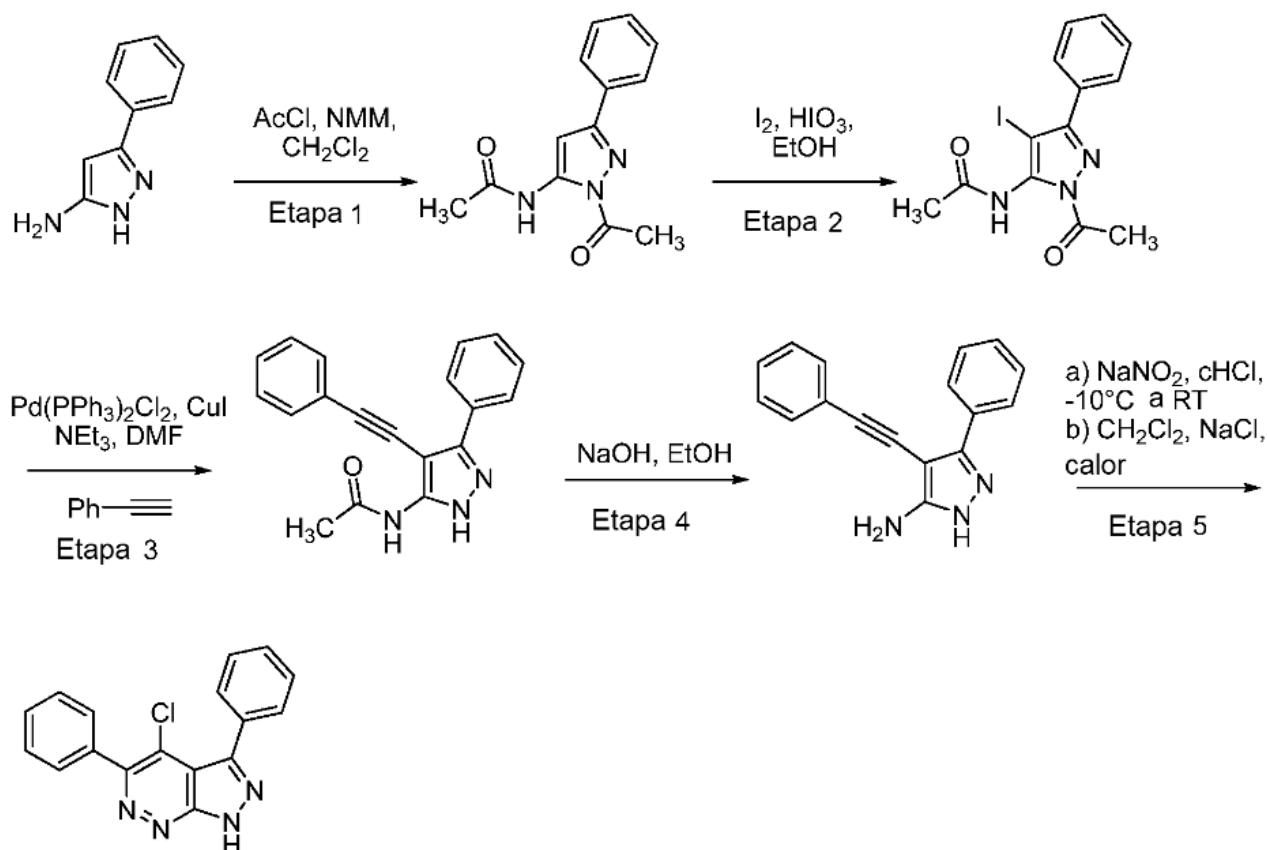
Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 32 mg, 1.75 mmol) a una solución de 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo [3,4 -c] piridazina (400 mg, 1.12 mmol) y 2-cloro-1- (pirrolidin-1-il) etanona (54 mg, 1.8 mmol) en DMF seco (7.5 ml) a temperatura ambiente. Después de 1.5 h a temperatura ambiente, se añadió más hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 27 mg) y la suspensión se agitó durante 2 h. Se añadieron solución de LiCl ac. 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 al vacío. El residuo fue parcialmente purificado por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 1:0 a 0:1). El sólido resultante se disolvió en CH₂Cl₂ mínimo y se añadió dietil éter 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) etanona (246 mg).

El compuesto 6 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, pero utilizando ácido 2-fluorofenilborónico en lugar de ácido 4-fluorofenilborónico y 2- (4-cloro-3-yodo-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazin-1 -il) -1- (pirrolidin-1-il) etanona en lugar de 2- (4-cloro-3-yodo-5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il) -1 - [(3R)-3-fluoropirrolidin-1-il] etanona en la Etapa 8.

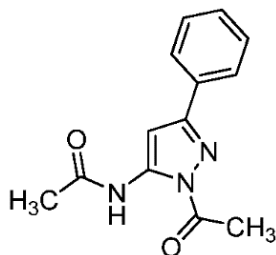
¹H RMN δ (ppm) (CHCl₃-d): 7.77-7.74 (2 H, m), 7.66-7.61 (1 H, m), 7.53-7.45 (4 H, m), 5.58 (2 H, s) , 3.66 (2 H, t), 3.54 (2 H, t), 2.11-2.05 (2 H, m), 1.96- 1.90 (2 H, m).

LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 10.62 min; m/z 436 [M + H] pureza del 95.36%.

Ejemplo 7: Esquema de síntesis para 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina:

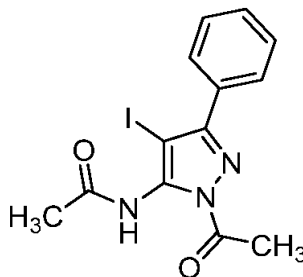


Etapa 1: N- (2-acetil-5-fenil-pirazol-3-il)acetamida



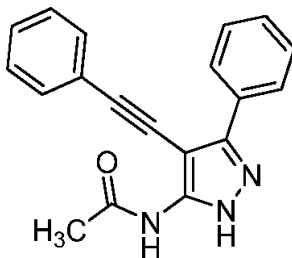
- 5 A una solución de 5-fenil-1H-pirazol-3-amina (18.6 g, 0.117 mol) y N-metilmorfolina (30.8 mL, 0.281 mol) en CH₂Cl₂ (250 ml) se añadieron cloruro de acetilo (20 ml, 0.281 mol) gota a gota a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina, se secó (cartucho separador de fase) y se concentró al vacío. Se añadió dietil éter al residuo y el sólido se recogió por filtración, produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (25.1 g).

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



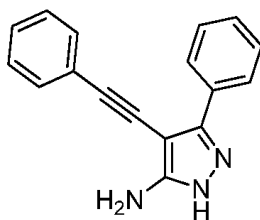
- 15 Una suspensión de N- (2- acetil-5-fenil-pirazol-3-il) acetamida (25.1 g, 0.103 mol), ácido yódico (4.5 g, 0.026 mol) y yodo (15.7 g, 0.062 mol) en etanol (250 ml) se calentó a 50 °C durante 3 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se repartió entre CH₂Cl₂ y solución ac. de Na₂S₂O₃ 2 M. Las capas se separaron y el orgánico se lavó con solución salina, se secó (cartucho separador de fase) y se concentró al vacío para proporcionar una mezcla del compuesto del título y el material de partida (2.2:1, 30.3 g). La mezcla se puso en reacción nuevamente utilizando ácido yódico (1.6 g, 9.6 mmol) y yodo (9.7 g, 38 mmol) en etanol (250 ml) en las mismas condiciones, para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (31.9 g).

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



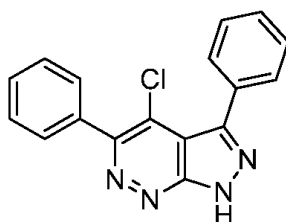
- 25 Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de N- (2-acetil-1,4-yodo-5-fenil-pirazol-3-il) acetamida (31.87 g, 86.4 mmol), fenil acetileno (17.6 g, 173 mmol), trietilamina (200 ml) y DMF (100 ml) durante 15 min. Se añadieron dicloruro de yoduro de cobre (1.64 g, 8.6 mmol) y bis (trifenilfosfina) 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 solución salina, 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 del título en forma de un sólido (12.5 g).

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



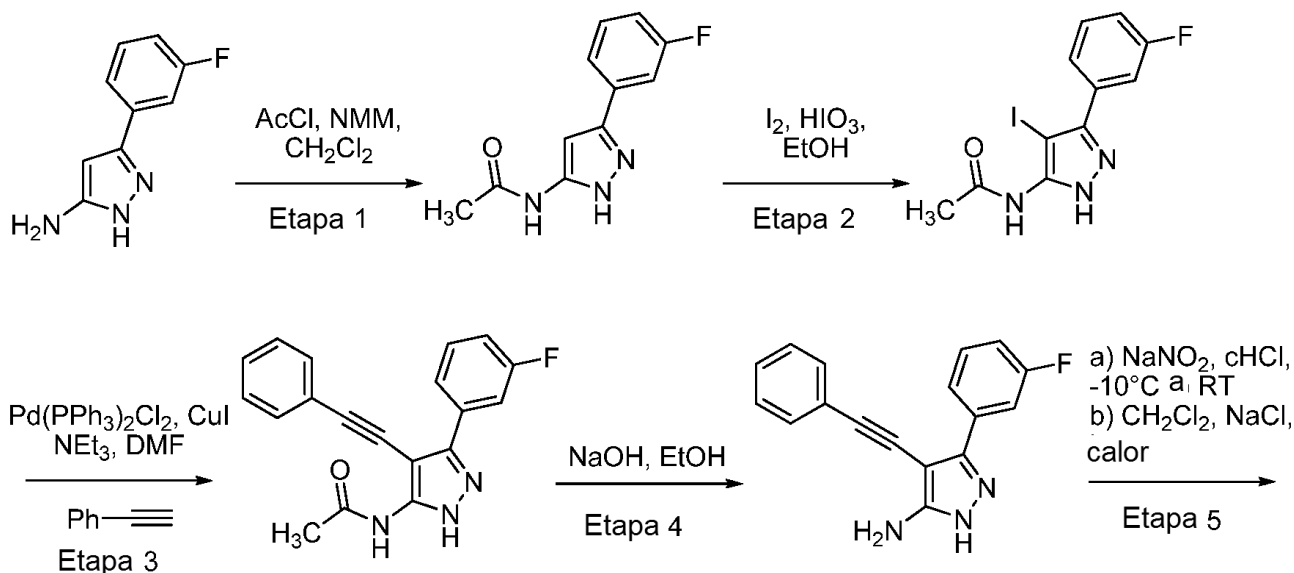
Una mezcla de N-[3-fenil-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-il] acetamida (12.5 g, 42 mmol), etanol (100 ml) y solución de NaOH ac. al 25% (100 ml) se agitó y se calentó a 90 °C durante 1 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se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

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

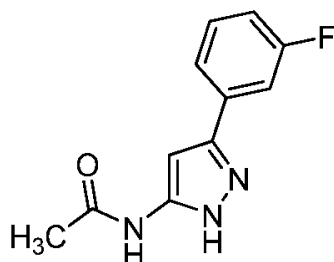


Se añadió nitrito de sodio (2.88 g, 42 mmol) en porciones a cHCl (314 ml) a aproximadamente 15 °C y se agitó durante 15 min. Se añadió 3-fenil-4-(2-feniletinil)-1H-pirazol-5-amina (5.4 g, 21 mmol) como un sólido, seguido de la adición de CH₂Cl₂ (10 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar y se agitó 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 fase) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, isohexano/acetato de etilo 4:1, luego CH₂Cl₂/acetato de etilo 1:0 a 4:1) produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (3.0 g).

Ejemplo 8: Esquema de síntesis para 4-cloro-3-(3-fluorofenil)-5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina:

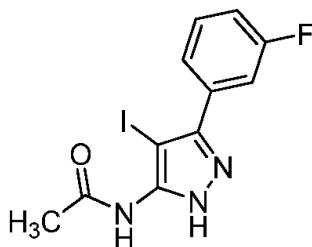


Etapas 1: N-13-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-ilacetamida



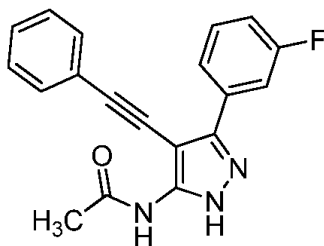
A una solución de 3- (3-fluorofenil) -1H-pirazol-5-amina (6.5 g, 36 mmol) y N-metilmorfolina (9.7 mL, 88 mmol) en CH₂Cl₂ (150 mL) se añadió cloruro de acetilo (6 ml, 85 mmol) gota a gota a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 d. La mezcla 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 (ac. 2.5 M, 42.5 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadió solución de HCl hasta que el pH alcanzó 6. Los disolventes orgánicos se evaporaron al vacío. El sólido de la suspensión acuosa resultante se recogió por filtración, produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (7.6 g).

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



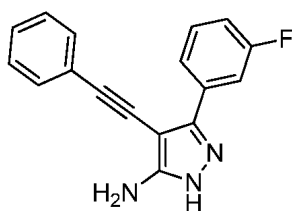
Una suspensión de N- [3- (3-fluorofenil) -1H-pirazol-5-il] acetamida (7.6 g, 34.7 mmol), ácido yódico (1.5 g, 8.5 mmol) y yodo (4.4 g, 17.3 mmol) en etanol (200 ml) se calentó a 60 °C durante 1 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se repartió entre CH₂Cl₂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

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



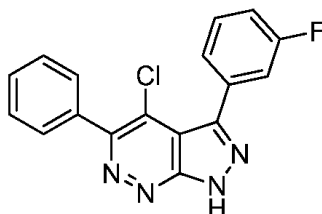
Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de N-[3- (3-fluorofenil) -4-yodo-1H-pirazol-5-il] acetamida (10.8 g, 44 mmol), fenil acetileno (12.5 g, 123 mmol), trietilamina (100 ml) y DMF (40 ml) durante 15 min. Se añadieron dicloruro de yoduro de cobre (840 mg, 4.42 mmol) y bis (trifenilfosfina) paladio (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 solución salina, 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 del título en forma de un sólido (4 g).

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



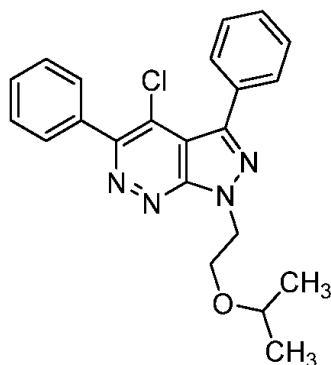
Una mezcla de N- [3- (3-fluorofenil) -4- (2-feniletinil) -1H-pirazol-5-il] acetamida (2 g, 6.2 mmol), etanol (22 ml) y solución de NaOH acuosa al 25 % (22 ml) se agitó y se calentó a 80 °C durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua.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

Etapas 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 CHCl_3 (24 ml) a aproximadamente -15 °C y se agitó durante 15 min. 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 CH_2Cl_2 (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 CH_2Cl_2 (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 fase) 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 del título en forma de un sólido (500 mg).

Ejemplo 9: 4-cloro-1- (2-isopropoxietil) -3,5-difenil-pirazolo [3,4-c] piridazina (Compuesto 7)

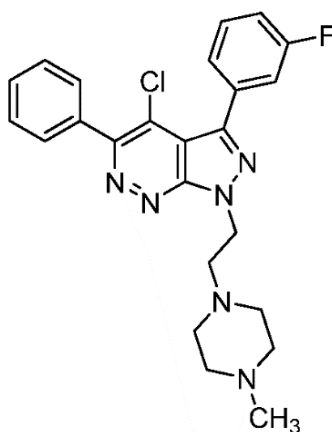


Una mezcla de 4-cloro-3,5-difenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmoles), 2-isopropoxietanol (0.65 mmol), dietil azodicarboxilato (114 mg, 0.65 mmol) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml) se calentó utilizando irradiación de microondas a una temperatura entre 85 y 120 °C durante un periodo 30 de 90 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el Compuesto 7.

^1H RMN δ (ppm) (CHCl_3 -d): 7.79-7.74 (4 H, m), 7.55-7.44 (6 H, m), 4.98 (2 H, t), 4.08 (2 H, t), 3.71 -3.63 (1 H, m), 1.10 (6 H, t).

LCMS (10cm_Formic_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 13,18 min; m/z 393 [M + H] 93,65% de pureza.

Ejemplo 10: 4-cloro-3- (3-fluorofenil) - 1-[2-(4- metilpiperazin-1-il) etil] -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazina (Compuesto 8)

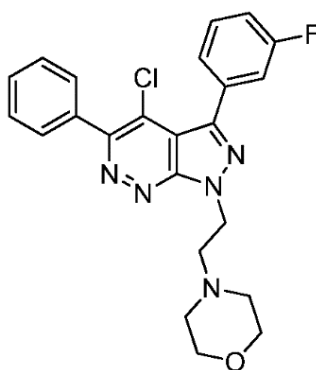


Una mezcla de 4-cloro-3- (3-fluorofenil) 1-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmol), 2- (4-metilpiperazin-1-il) etanol (0.65 mmol), dietil azodicarboxilato (114 mg, 0.65 mmol) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml) se calentó con radiación de microondas a una temperatura entre 85 y 120 °C durante un período de 30 a 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el Compuesto 8.

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.81-7.77 (2 H, m), 7.57-7.44 (6 H, m), 7.20-7.18 (1 H, m), 4.95 (2 H, t), 3.07 (2 H, t), 2.65 (4 H, bs), 2.35 (4 H, bs), 2.25 (3 H, s).

LCMS (10cm_Formic_ACE 3 C18 AR_HPLC_CH3CN) Rt 9,93 min; m/z 451 [M + H] 99.18% de pureza.

Ejemplo 11: 4-[2-[4-cloro-3- (3-fluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin- 1-il]etil]morfolina (Compuesto 9)

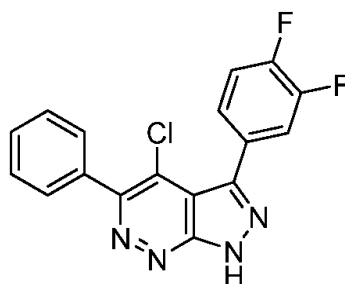


Una mezcla de 4-cloro-3- (3-fluorofenil) -5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmoles), 2-morfolinoetanol (0.65 mmoles), azodicarboxilato de dietilo (114 mg, 0.65 mmoles) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmoles) en 1,4-dioxano (2 ml) se calentó utilizando radiación de microondas a una temperatura 85 y 120 °C por un período de 30 a 90 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el Compuesto 9.

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.80-7.77 (2 H, m), 7.60-7.45 (6 H, m), 7.22-7.16 (1 H, m), 4.95 (2 H, t), 3.62 (4 H, t), 3.06 (2 H, t), 2.61 (4 H, t).

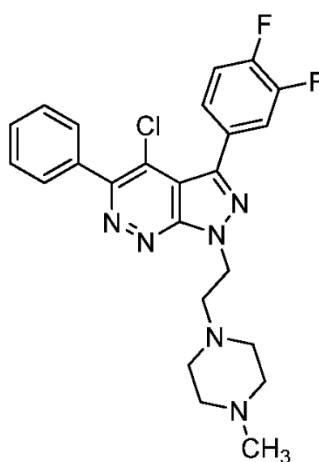
LCMS (15cm_Bicarb_GeminiNX_HPLC_CH3CN) Rt 11,16 min; m/z 438 [M + H] 97.23% de pureza.

Ejemplo 12: 4-cloro-3- (3,4-difluorofenil) -5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina



4-cloro-3- (3,4-difluorofenil) 5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 8, pero se usó 3- (3,4-difluorofenil) -1H-pirazol-5-amina en lugar de 3- (3-fluorofenil) -1H-pirazol-5-amina en la Etapa 1.

Ejemplo 13: 4-cloro-3- (3,4-difluorofenil) -1-[2-(4-metilpiperazin-1-il) etili- 5-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazina (Compuesto 10)

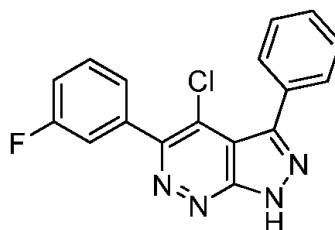


Una mezcla de 4-cloro-3 - (3,4-difluorofenil) -5-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmol), 2- (4-metilpiperazin-1-il) etanol (0.65 mmol), azodicarboxilato de dietilo (114 mg, 0.65 mmol) y trifenilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml) se calentaron utilizando radiación de microondas a una temperatura entre 85 y 120 °C durante un período de 30 a 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el Compuesto 10.

¹H RMN δ (ppm) (CHCl₃-d): 7.78-7.75 (2 H, m), 7.65-7.59 (1 H, m), 7.58-7.51 (4 H, m), 7.33-7.29 (1 H, m), 4.93 (2 H, t), 3.16 (2 H, t), 3.08 (4 H, bs), 1.59 (4 H, bs), 2.67 (3 H, s).

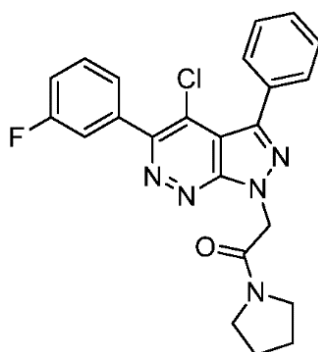
LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 4.27 min; m/z 469 [M + H] 96.02% de pureza.

Ejemplo 14: 4-cloro-5- (3-fluorofenil) -3-fenil-1H-pirazolo [3,4-c]piridazina



4-cloro-5- (3 -fluorofenil) -3-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 7, pero utilizando 3-fluorofenil acetileno en lugar de fenil acetileno en la Etapa 3.

Ejemplo 15: 2-[4-cloro-5- (3-fluorofenil) -3-fenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il] -1-pirrolidin-1-il-etanona (Compuesto 11)



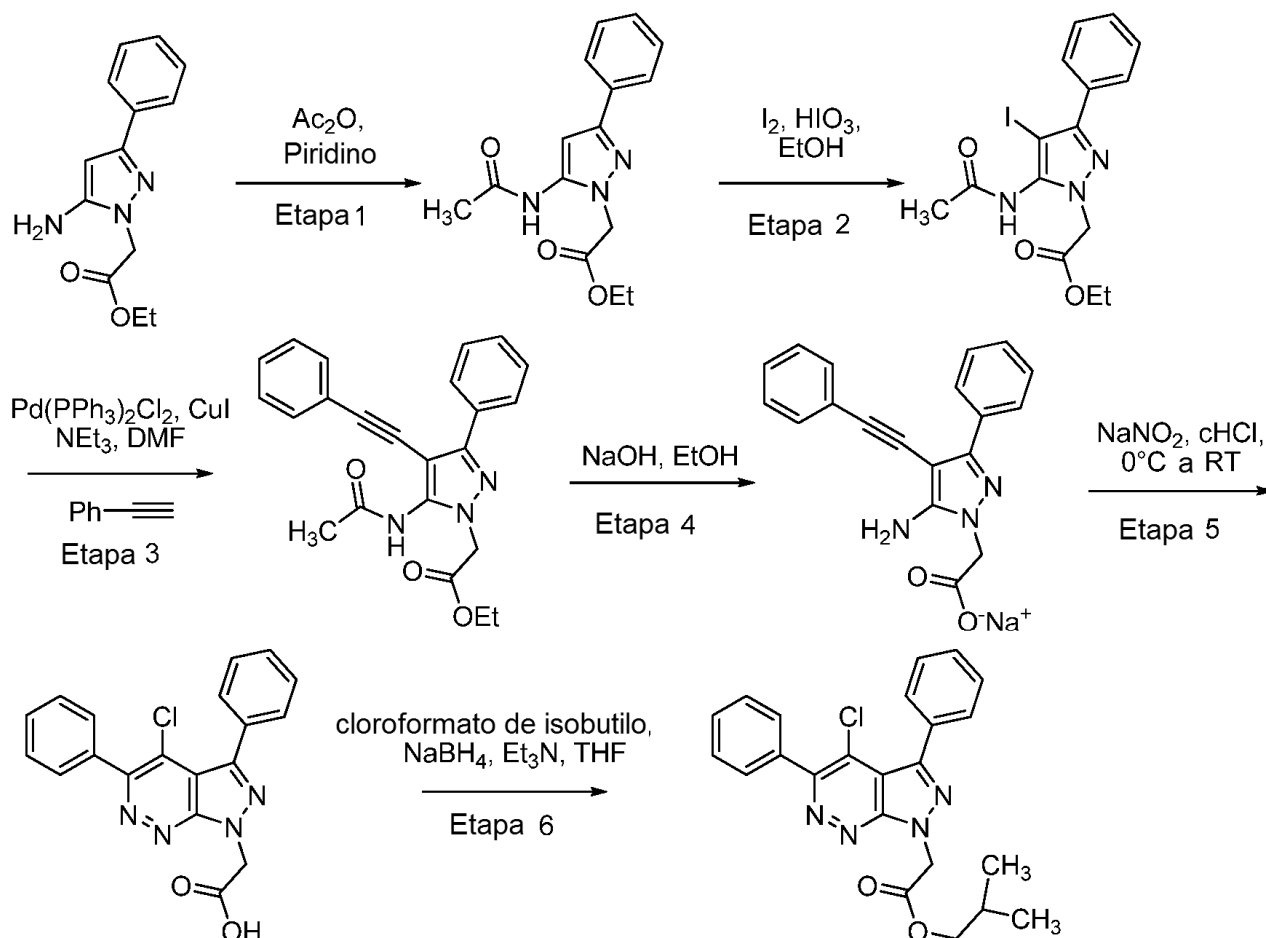
Una mezcla de 4-cloro-5-(3-fluorofenil)-3-fenil-1H-pirazolo [3,4-c] piridazina (0.33 mmoles), 2-hidroxi-1-(pirrolidin-1-il) etanona (0.65 mmoles), azodicarboxilato de dietilo (114 mg, 0.65 mmoles) y trifetilfosfina (171 mg, 0.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml) se calentó utilizando irradiación de microondas a una temperatura entre 85 y 120 °C durante un período de 30 a 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el Compuesto 11.

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.81-7.76 (2 H, m), 7.55-7.45 (6 H, m), 7.23-7.15 (1 H, m), 5.58 (2 H, s), 3.67 (2 H, t), 3.54 (2 H, t), 2.13-2.05 (2 H, m), 1.97-1.89 (2 H, m).

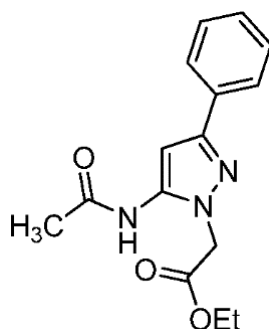
LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 3,69 min; m/z 436 [M + H] 98.67% de pureza.

Ejemplo 16: 2-(4-cloro-3,5-difenil-pirazolo [3,4-c] piridazin-1-il) acetato de isobutilo (Compuesto 12)

Esquema de síntesis para 2-(4-cloro-3,5-difenil-pirazolo [3,4-c]piridazin-1-il)acetato de isobutilo:

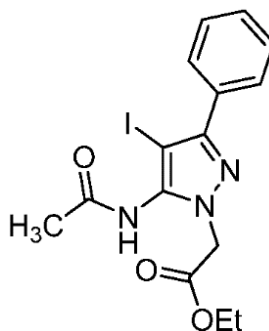


Etapa 1. Etil 2-(5-acetamido-3-fenil-pirazol-1-il)acetato



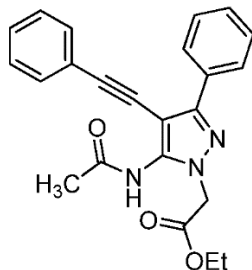
A una solución de 2- (5-amino-3-fenil-pirazol-1-il) acetato de etilo (49 g, 0.17 mol) en piridina (200 ml) se le añadió anhídrido acético (17.4 g, 0.17 mol) gota a gota a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. Se añadió CH₂Cl₂ al residuo y el sólido se recogió por filtración, produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (22 g). Los licores madre se concentraron al vacío y se lavaron con CH₂Cl₂ frío para producir un segundo lote de 15 g.

Etapla 2: 2- (5-acetamido-4-yodo-3-fenil-pirazol-1-acetato de etilo



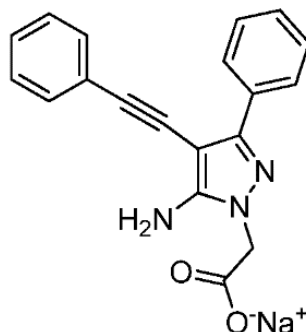
Una suspensión de 2- (5-acetamido-3-fenil-pirazol-1-il) acetato de etilo (37 g, 129 mmol), ácido yódico (5.6 g, 32 mmol) y yodo (19.7 g, 77 mmol) en etanol (400 ml) se calentó a 50 °C durante 2 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se eluyó a través de una capa de gel de sílice con CH₂Cl₂/éter dietílico (1:0 a 97:3). El residuo se repartió entre CH₂Cl₂ y solución ac. Na₂S₂O₃ 2 M. Las capas se separaron y el lavado orgánico se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para proporcionar un residuo que se purificó parcialmente mediante cromatografía (gel de sílice, CH₂Cl₂/isohexano 1:1 a 1:0, luego CH₂Cl₂/éter dietílico 9:1 a 8:2), luego se tritura con dietil éter para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (43 g).

Etapla 3: acetato de etilo 2-[5-acetamido-3-fenil-4- (2-feniletinil) pirazol-1-ilo]



Se burbujeó nitrógeno a través de una mezcla de etilo 2- (5-acetamido-4-yodo-3-fenil-pirazol-1-il) acetato (18.6 g, 45 mmol), fenil acetileno (9.2 g, 90 mmol), yoduro de cobre (860 mg, 4.5 mmol), trietilamina (200 ml) y DMF (75 ml) durante 15 min. Se añadió dicloruro de bis (trifenilfosfina) paladio (II) (1.6 g, 2.25 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C bajo nitrógeno durante 4.5 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 solución salina, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, CH₂Cl₂, luego isohexano/etilo acetato 1:1 seguido de CH₂Cl₂/acetato de etilo 9:1 a 8:2), luego se tritura con dietil éter para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (13 g).

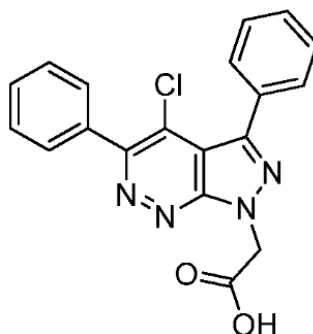
Etapla 4: 2-[5-amino-3-fenil-4- (2-feniletinil) pirazol-1-il]acetato de sodio



- 5 Una mezcla de 2-[5-acetamido- 3-fenil-4- (2-feniletinil) pirazol-1-il] acetato de etilo (13 g, 34 mmol), etanol (150 ml) y solución de NaOH ac. al 25% (150 ml) se agitó y se calentó a 80 °C durante 8 h y se enfrió a temperatura ambiente. Al enfriar, se formó un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó con una mezcla enfriada de acetato de etilo/agua (1:1). El sólido se trituró adicionalmente con éter dietílico, se filtró y se secó para proporcionar 9.8 g del compuesto del título.

10

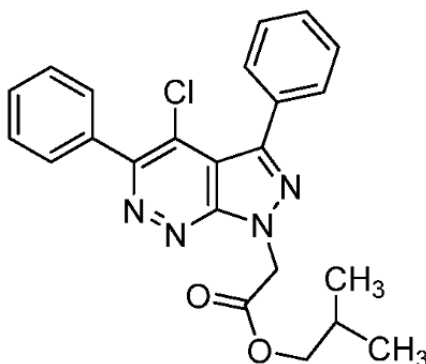
Etapla 5: ácido 2- (4-cloro-3,5-difenil-1Hpirazolo [3,4-c] piridazin-1-il) acético



- 15 Nitrito de sodio (1.86 mg), 26.9 mmol) se añadió en porciones a CHCl_3 (30 ml) a 0 °C y se agitó durante 15 min. Se añadió 2-[5-amino-3-fenil-4- (2-feniletinil) pirazol-1-il] acetato de sodio (3 g, 8.85 mmol) como un sólido, en porciones. La suspensión se agitó luego a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y solución salina. La capa orgánica se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, éter dietílico/ CH_2Cl_2 1:9), produciendo el compuesto del título en forma de un sólido (1,7 g).

20

Etapla 6: 2- (4-cloro-3,5-difenil-pirazolo [3,4-c]piridazin-1-il) acetato de isobutilo (Compuesto 12)



25

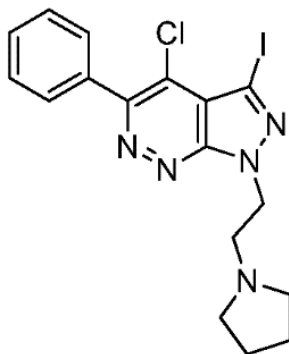
Se añadió trietilamina (535 μl , 3.8 mmol) a ácido 2- (4-cloro-3,5-difenil-1Hpirazolo [3,4-c] piridazin-1- il) acético (700 mg, 1.92 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C, seguido de la adición de cloroformato de isobutilo (342 mg, 2.9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. Luego se añadió borohidruro de sodio (220 mg, 5.8 mmol) en porciones y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con HCl 0.5 M y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y solución salina, se secaron (separador de fase) y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, acetato de etilo/isohexano 0:1 a 1:0), para proporcionar el Compuesto 12 en forma de un sólido (50 mg).

30

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.80-7.73 (4 H, m), 7.56-7.48 (6 H, m), 5.60 (2 H, s), 3.99 (2 H, d), 1.97 -1.90 (1 H, m), 0.90 (6 H, d).

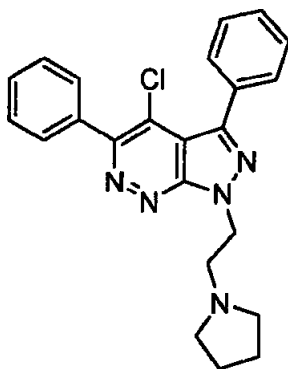
5 LCMS (10cm_ESCI_Bicarb_MeCN) Rt 4.24 min; m/z 421 [M + H] 98.88% de pureza.

Ejemplo 17: 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1- (2-pirrolidin-1-iletíl) pirazolo [3,4-c] piridazina



10 La 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1- (2-pirrolidin-1-iletíl) pirazolo [3,4-c] piridazina se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1 a través de la Etapa 6, pero utilizando 2-pirrolidina 1-iletanol en lugar de 2-cloro-1 - [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona en la Etapa 7 para proporcionar el compuesto del título.

15 Ejemplo 18: 4-Cloro-3,5-difenil-1- (2-pirrolidin-1-iletíl) pirazolo [3,4-c] piridazina (Compuesto 13)



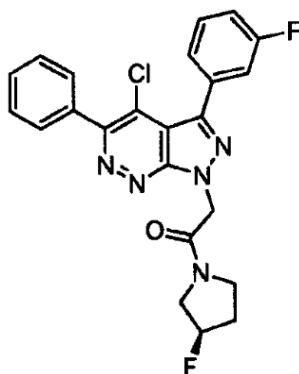
20 El Compuesto 13 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, Etapa 8 utilizando ácido fenilborónico en lugar de ácido 4-fluorofenilborónico y utilizando 4-cloro-3-yodo-5-fenil-1- (2-pirrolidin-1-iletíl) pirazolo [3,4-c] piridazina en lugar de 2- (4-cloro-3-iodo-5-fenil-pirazolo [3, 4-c] piridazin-1-il) -1- [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona.

^1H RMN δ (ppm) ($\text{CHCl}_3\text{-d}$): 7.79-7.76 (4 H, m), 7.55-7.44 (6 H, m), 4.97 (2 H, t), 3.22 (2 H, t), 2.68 (4 H, bs), 1.88-1.65 (4 H, m).

25 LCMS (10cm_Formic_ACE 3 AR_HPLC_CH3CN) Rt 9.98 min; m/z 404 [M + H] 95.91% de pureza.

Ejemplo 19: 2-[4-cloro-3- (3-fluorofenil) -5-fenil-pirazolo [3,4-c]piridazin-1-il-1- [(3R) -3-fluoropirrolidin-1-il] etanona (Compuesto 14)

30 Ejemplo de referencia



El Compuesto 14 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, Etapa 8, utilizando ácido 3-fluorofenilborónico en lugar de ácido 4-fluorofenilborónico.

^1H RMN δ (ppm) (CHCl_3 -d): 7.76-7.74 (2 H, m), 7.61-7.59 (1 H, m), 7.56-7.43 (5 H, m), 7.18 (1 H, m), 5.69-5.54 (2 H, m), 5.36 (1 H, m), 4.00-3.84 (3 H, m), 3.62 (1 H, m), 2.50-2.00 (2 H, m).

LCMS (15cm_Formic_ASCENTIS_HPLC_CH3CN) Rt 10.25 min; m/z 454 [M + H] 96.13% de pureza.

Ejemplo 20: Método de ensayo que muestra la actividad de los compuestos de la invención que restaura la expresión de N48K Clarin-1 (incubación de 24 horas).

Clarin-1 es la proteína codificada por el gen mutado en el síndrome de Usher III (Adato et al., 2002). La mutación más prevalente en Clarin-1 en Norteamérica es N48K, que se informa provoca pérdida de glicosilación y un defecto de tráfico (Tian et al., 2009). Como consecuencia, la proteína N48K no alcanza la membrana plasmática y es degradada por el proteasoma. Por lo tanto, se considera que restaurar el tráfico de Clarin-1 N48K 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 Clarin-1 es la estirpe celular HEK293 -Clarin-1 N48K-HA D9 (Tian et al., 2009). En un experimento típico, estas células se sembraron en placas de 96 pozos recubiertas con colágeno a una densidad celular de 20,000 células por pocillo en el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene un 10% de suero fetal bovino en una incubadora humidificada a 37 °C, CO_2 al 5%. Después de una incubación durante la noche, los compuestos se agregaron durante una incubación de 24 horas en medio DMEM que contiene un 10% de suero bovino fetal en un incubador humidificado a 37 °C, un 5% de CO_2 . Como control negativo, se utilizó DMSO a concentraciones finales de 0.25%. Los compuestos se probaron típicamente en forma triplicada. Después de 24 horas de incubación con compuestos, las células se fijaron mediante la adición de formalina tamponada al 10% a los pozos para lograr una concentración final de formalina al 4%. Después de una fijación de 20 minutos a temperatura ambiente, los pozos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Triton X-100 (0.02 fosfato, 150 mM de NaCl, 0.1% de Triton X-100).

El Clarin-1 N48K etiquetado con HA se detectó con un anticuerpo contra la etiqueta 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 minutos, los pozos se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100, y se añadió un anticuerpo secundario (IgG-Cy3 anti-ratón de cabra (1.5 mg/ml), Jackson IR Europe # 115165003) a los pozos en una dilución de 1:250 en PBS que contiene Triton X-100 durante 45 min. Posteriormente, los pozos se lavaron 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 Clarin-1 y el canal DAPI para los núcleos. Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas utilizando un algoritmo específico. Este algoritmo midió la tinción de HA-Clarin-1 para cada célula en función de la segmentación nuclear adicional de la señal DAPI (Figura 1). Este algoritmo mide la intensidad por celda y, por lo tanto, es menos sensible para la variación en el número de células. Por pozo, se midieron aproximadamente 2,000 células para lograr una densidad promedio por medida de célula.

Ejemplo 21: Un método de ensayo que muestra la actividad de los compuestos de la invención que restaura la expresión de N48K Clarin-1 (incubación de 2 horas).

Clarin-1 es la proteína codificada por el gen mutado en el síndrome de Usher III (Adato et al., 2002). La mutación más prevalente en Clarin-1 en Norteamérica es N48K, que se informa que causa pérdida de glicosilación y un defecto de tráfico (Tian et al., 2009). Como consecuencia, la proteína N48K no alcanza la membrana plasmática y es degradada por el proteasoma. Por lo tanto, se considera que restaurar el tráfico de Clarin-1 N48K 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 Clarin-1 es la estirpe celular HEK293 -Clarin-1 N48K-HA D9 (Tian et al., 2009). En un experimento típico, estas células se sembraron en placas de 96 pozos recubiertas con colágeno a una densidad celular de 20,000 células por pocillo en el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene un 10% de suero fetal bovino en una incubadora humidificada a 37 °C, 5% CO₂. Después de una incubación durante la noche, los compuestos se agregaron durante una incubación de 2 horas en medio DMEM que contiene un 10% de suero bovino fetal en una incubadora humidificada a 37 °C, un 5% de CO₂. Como control negativo, se utilizó DMSO a concentraciones finales de 0.25%. Los compuestos se probaron típicamente en forma triplicada. Después de 2 horas de incubación con compuestos, las células se incubaron en medio fresco durante 22 horas. Las células se fijaron luego mediante la adición de formalina tamponada al 10% a los pozos para lograr una concentración final de formalina al 4%. Después de una fijación de 20 minutos a temperatura ambiente, los pozos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Triton X-100 (0.02 fosfato, 150 mM de NaCl, 0.1% de Triton X-100).
- El Clarin-1 N48K etiquetado con HA se detectó con un anticuerpo contra la etiqueta HA (anticuerpo monoclonal HA.11 Clone 16B12, Covance # MMS-101P) a una dilución de 1:1000 en PBS que contiene Triton X-100. Después de una incubación de 90 minutos, los pozos se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100, y se añadió un anticuerpo secundario (anti-ratón IgG-Cy3 de cabra (1.5 mg/ml), Jackson IR Europe # 115165003) a los pozos en una dilución de 1:250 en PBS que contiene Triton X-100 durante 45 min. Posteriormente, los pozos se lavaron 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 Clarin-1 y el canal DAPI para núcleos. Las imágenes se analizan y cuantifican utilizando un algoritmo específico. Este algoritmo midió la tinción de HA-Clarin-1 para cada célula en función de la segmentación nuclear adicional de la señal DAPI (Figura 1). Este algoritmo mide la intensidad por celda y, por lo tanto, es menos sensible para la variación en el número de celdas. Por pozo, se midieron aproximadamente 2,000 células para lograr una densidad promedio por medida de célula.

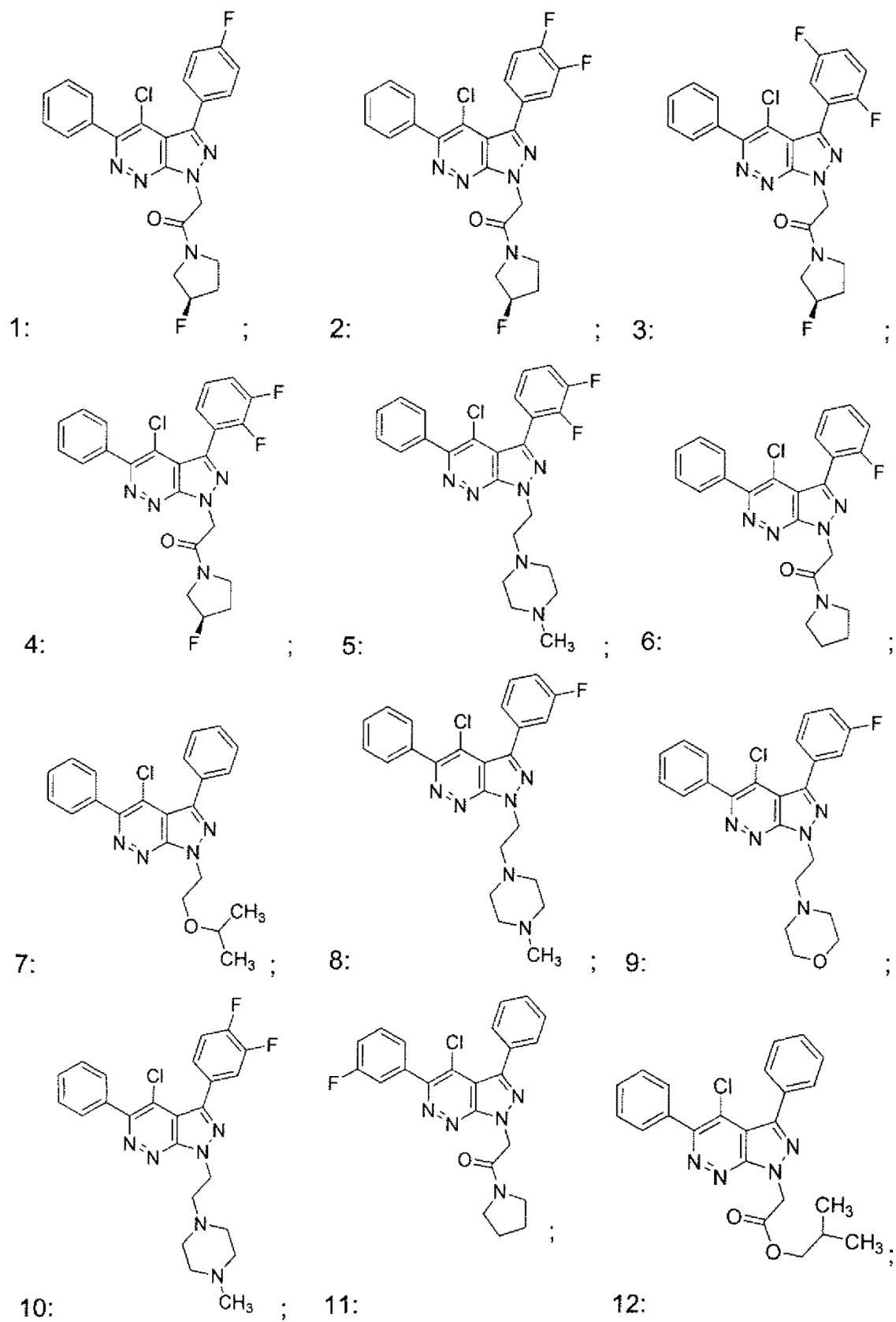
Ejemplo 22: Datos de IC₅₀ para compuestos ilustrativos de la invención

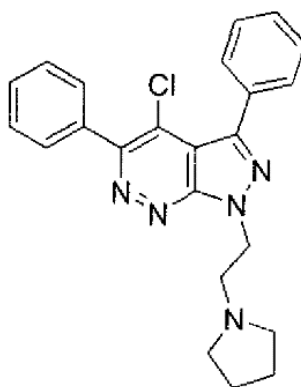
- Los valores de IC₅₀ para los compuestos 5-12 de la invención se obtuvieron de acuerdo con el método de ensayo del Ejemplo 20. Los valores de IC₅₀ obtenidos para los Compuestos 5-12 fueron menores o iguales a 2 micromolar.
- Los valores de IC₅₀ para los Compuestos 1-4, 11, 13 y 14 se obtuvieron de acuerdo con el método de ensayo del Ejemplo 21. Los valores de IC₅₀ obtenidos para los Compuestos 1-4, 11, 13 y 14 fueron menores o iguales a 14 micromolar. Los valores de IC₅₀ obtenidos para los compuestos 1-3, 11, 13 y 14 fueron menores o iguales a 6 micromolar. Los valores de IC₅₀ obtenidos para los compuestos 2, 11 y 13 fueron menores o iguales a 4 micromolar. El valor de IC₅₀ obtenido para el compuesto 13 fue menor o igual a 1 micromolar.
- El valor de IC₅₀ obtenido para el Compuesto 11 ensayado de acuerdo con el método del Ejemplo 20 fue inferior a 2 micromolar. El valor de IC₅₀ obtenido para el Compuesto 11 analizado de acuerdo con el método del Ejemplo 21 fue inferior a 3 micromolar.

Cada referencia descrita en esta solicitud se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:

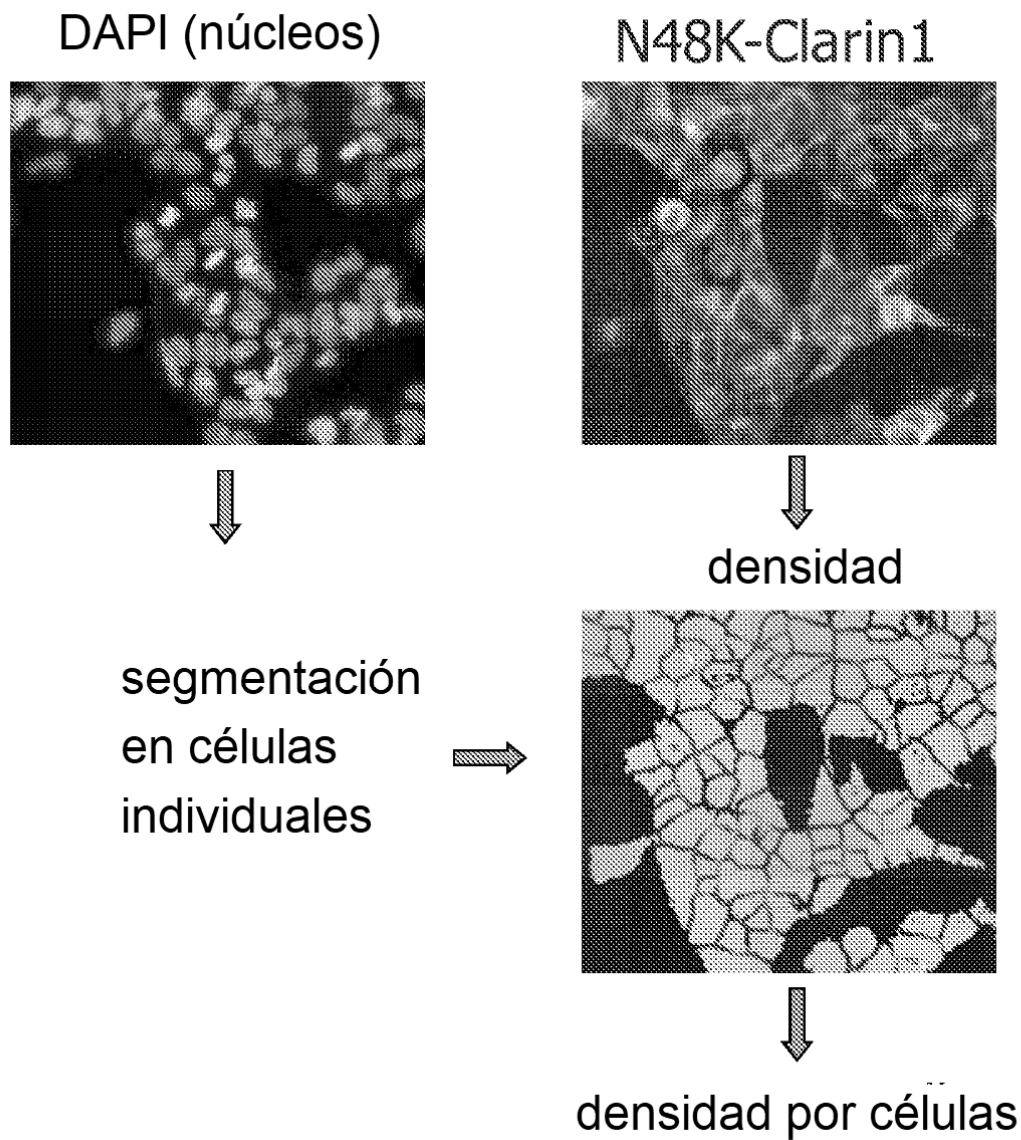




13:

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Un compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la reivindicación 2 para uso en un método para tratar una enfermedad degenerativa de la retina, que comprende
- 10 administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 3, en el que la enfermedad degenerativa de la retina es la retinitis
- 15 pigmentosa, la Amaurosis congénita de Leber, una retina sindrómica degeneración, degeneración macular relacionada con la edad o síndrome de Usher.
5. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 4, en donde la enfermedad degenerativa de la retina es el síndrome
- 20 de Usher.
6. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 5, en donde el síndrome de Usher es el síndrome de Usher I, el síndrome de Usher II o el síndrome de Usher III.
- 25 7. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 6, en donde el síndrome de Usher es el síndrome de Usher III.
8. Un compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición de la
- 30 reivindicación 2 para uso en un método para tratar la pérdida de audición asociada con el síndrome de Usher, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
9. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la
- 35 reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 8, donde el síndrome de Usher es el síndrome de Usher I, el síndrome de Usher II o el síndrome de Usher III.
10. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición de la
- 40 reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 9, en donde el síndrome de Usher es el síndrome de Usher III.



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

Fig. 1