(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 759 940**

(51) Int. Cl.:

C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/501 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016 PCT/EP2016/079251**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093300**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016 E 16802102 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3383871**

(54) Título: **Compuestos de 1,3,4-tiadiazol y su uso para tratar el cáncer**

(30) Prioridad:

30.11.2015 US 201562260787 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

(73) Titular/es:

ASTRAZENECA AB (50.0%)
151 85 Södertälje, SE

(72) Inventor/es:

FINLAY, MAURICE, RAYMOND, VERSCHOYLE; NISSINK, JOHANNES, WILHELMUS, MARIA; CHARLES, MARK, DAVID y WOOD, JAMES, MATTHEW

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 759 940 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

Compuestos de 1,3,4-tiadiazol y su uso para tratar el cáncer.

Campo técnico

La descripción generalmente se refiere a compuestos de 1,3,4-tiadiazol sustituidos y sales farmacéuticamente aceptables de estos. Estos compuestos actúan sobre la enzima glutaminasa 1 ("GLS1") y por lo tanto la descripción se refiere, además, al uso de tales compuestos y sales de estos para tratar o prevenir la enfermedad mediada por GLS1, incluido el cáncer. La descripción se refiere, además, a composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos y sales; kits que comprenden tales compuestos y sales; métodos de fabricación de tales compuestos y sales; productos intermedios útiles en la fabricación de tales compuestos y sales; y al uso de tales compuestos en métodos para tratar enfermedades mediadas por GLS1, incluido el cáncer.

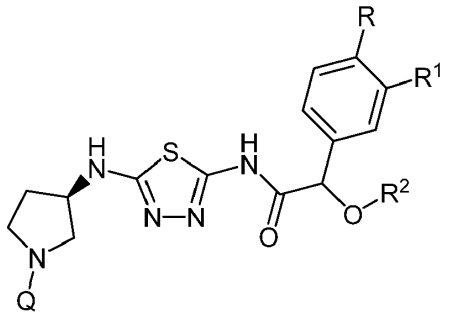
Antecedentes

La glutamina es el aminoácido plasmático más abundante y participa en muchas rutas que promueven el crecimiento. En particular, la glutamina participa en la oxidación en el ciclo TCA y en el mantenimiento del equilibrio redox celular y, además, proporciona nitrógeno para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos (Curi y otros, Front. Biosci.. 2007, 12, 344-57; DeBerardinis y Cheng, Oncogene 2010, 313-324, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad). Muchas células cancerosas dependen del metabolismo de la glutamina como consecuencia de los cambios metabólicos en la célula, incluido el efecto Warburg donde el piruvato glicolítico se convierte en ácido láctico en lugar de usarse para crear acetil CoA (Koppenol y otros, Nature Reviews 2011, 11, 325-337, que se incorpora como referencia en su totalidad). Como consecuencia de esta dependencia del metabolismo de la glutamina, tales células cancerosas son sensibles a los cambios en los niveles de glutamina exógena. Además, la evidencia existente sugiere que la glutaminólisis desempeña una función clave en ciertos tipos de cáncer (Hensley y otros, J. Clin. Invest. 2013, 123, 3678- 3684, que se incorpora como referencia en su totalidad), y se asocia con controladores oncogénicos conocidos tales como Myc (Dang, Cancer Res. 2010, 70, 859- 863, que se incorpora como referencia en su totalidad).

La primera etapa del catabolismo de la glutamina a glutamato es catalizado por la glutaminasa, que existe como dos isoformas, GLS1 y GLS2, originalmente identificadas como expresadas en el riñón y el hígado, respectivamente. Se conoce que la glutaminasa renal (GLS1) se expresa más ubicuamente que la glutaminasa hepática (GLS2), y tiene 2 variantes de corte y empalme, KGA y la isoforma GAC más corta, ambas ubicadas en las mitocondrias. (Elgadi y otros, Physiol. Genomics 1999, 1, 51-62; Cassago y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 2012, 109, 1092-1097, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad). La expresión de GLS1 se asocia con el crecimiento tumoral y la malignidad en varios tipos de enfermedades (Wang y otros, Cancer Cell 2010, 18, 207-219; van der Heuval y otros, Cancer Bio. Ther. 2012, 13, 1185-1194, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad). Por lo tanto se espera que los inhibidores de GLS1 sean útiles en el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación con otros agentes contra el cáncer. El documento núm. WO 2013/078123 y el documento núm. US 2014/142081 ambos describen derivados de 1,3,4-tiazol como inhibidores de GLS1.

Resumen

En un aspecto, un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es 5-metilpiridazin-3-ilo, 5-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R es hidrógeno, fluoro, o metoxi;
R^1 es hidrógeno, metoxi, difluorometoxi, o trifluorometoxi; y
R^2 es metilo o etilo.

En otro aspecto, una composición farmacéutica incluye el compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, el compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en terapia.

En otro aspecto, el compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para fabricar un medicamento para el tratamiento del cáncer.

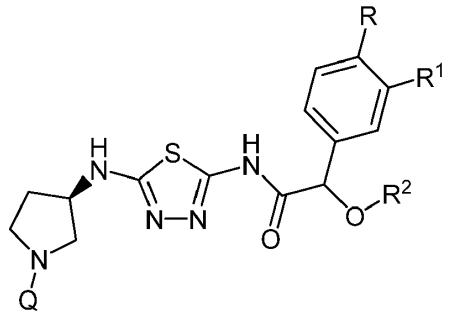
En otro aspecto, un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita de tal tratamiento, incluye administrar al animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Otros aspectos serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones.

Descripción detallada

Muchas modalidades se detallan a lo largo de la descripción y serán evidentes para un lector experto en la técnica. La invención no debe interpretarse como limitada a ninguna(s) modalidad(es) particular(es) de esta.

Se proporciona un compuesto de la Fórmula (I):

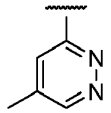


(I)

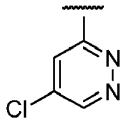
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es 5-metilpiridazin-3-ilo, 5-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R es hidrógeno, fluoro, o metoxi;
R^1 es hidrógeno, metoxi, difluorometoxi, o trifluorometoxi; y
R^2 es metilo o etilo.

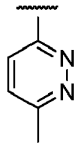
Los anillos de 5-metilpiridazin-3-ilo, 5-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-fluoropiridazin-3-ilo tienen las siguientes estructuras:



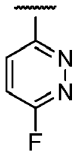
5-metilpiridazin-3-ilo



5-cloropiridazin-3-ilo

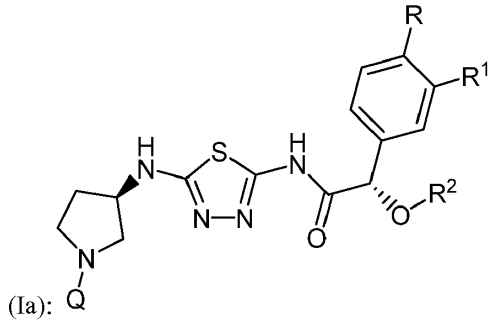


6-metilpiridazin-3-ilo



6-fluoropiridazin-3-ilo

En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) tiene la siguiente Fórmula



(Ia): (Ia

en donde Q, R, R^1, y R^2 son como se definieron anteriormente.

El término "farmacéuticamente aceptable" se usa para especificar que un objeto (por ejemplo una sal, forma de dosificación, diluyente o portador) es adecuado para su uso en pacientes. Puede encontrarse una lista de ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en el Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P. H. Stahl y C. G. Wermuth, editores, Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA, 2002, que se incorporan como referencia en su totalidad. Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de la Fórmula (I) es, por ejemplo, una sal de adición de ácido. Puede formarse una sal de adición de ácido de un compuesto de la Fórmula (I) al poner en contacto el compuesto con un ácido inorgánico u orgánico adecuado bajo condiciones conocidas por el experto. Puede formarse una sal de adición de ácido mediante el uso de, por ejemplo, un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico. Puede formarse una sal de adición de ácido, además, mediante el uso de, por ejemplo, un ácido orgánico tal como ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, o ácido bencenosulfónico.

Por lo tanto, en una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, o ácido bencenosulfónico.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido clorhídrico o de ácido bromhídrico.

Una sal farmacéuticamente aceptable adicional adecuada de un compuesto de la Fórmula (I) es una sal de adición de base. Puede formarse una sal de adición de base de un compuesto de la Fórmula (I) al poner en contacto el compuesto con una base inorgánica u orgánica adecuada bajo condiciones conocidas por el experto. Por ejemplo, puede formarse una sal de adición de base mediante el uso de, por ejemplo, una base inorgánica tal como un hidróxido de metal alcalino (tal como hidróxido de sodio, potasio, o litio) o un hidróxido de metal alcalinotérreo (tal como hidróxido de calcio o hidróxido de magnesio). Puede formarse, además, una sal de adición de base mediante el uso de, por ejemplo, una base orgánica tal como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina, o *tris*-(2-hidroxietil)amina.

Por lo tanto, en una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina, o *tris*-(2-hidroxietil)amina.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina, o *tris*-(2-hidroxietil)amina.

Una modalidad adicional proporciona cualquiera de las modalidades definidas en la presente descripción (por ejemplo, la modalidad de la reivindicación 1) con la condición de que uno o más ejemplos específicos (por ejemplo, uno, dos o tres ejemplos específicos, o alternativamente un ejemplo específico) seleccionados del grupo que consiste de los Ejemplos 1(a), 1(b), 2, 3, 4(a), 4(b), 5(a), 5(b), 6(a), 6(b), 7(a), 7(b), 8(a), 8(b), 9(a), 9(b), 10(a), 10(b), 11(a), 11(b), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33(a) y 33(b) se desreivindique individualmente.

Algunos valores de grupos variables en la Fórmula (I) son los siguientes. Tales valores pueden usarse en combinación con cualquiera de las definiciones, reivindicaciones (por ejemplo, reivindicación 1) o modalidades definidas en la presente descripción para proporcionar modalidades adicionales.

Q puede ser 6-metilpiridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo.

Q puede ser 5-metilpiridazin-3-ilo o 5-cloropiridazin-3-ilo.

Q puede ser 5-metilpiridazin-3-ilo.

Q puede ser 5-cloropiridazin-3-ilo.

Q puede ser 6-metilpiridazin-3-ilo.

Q puede ser o 6-fluoropiridazin-3-ilo.

R puede ser hidrógeno o fluoro.

R puede ser hidrógeno.

R^1 puede ser metoxi, difluorometoxi, o trifluorometoxi.

R^2 puede ser metilo.

En otra modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es 6-metilpiridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo; y
R^1 es metoxi o trifluorometoxi.

En otra modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es 6-metilpiridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R es hidrógeno; y
R^1 es metoxi o trifluorometoxi.

En otra modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es 6-metilpiridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R es hidrógeno;
R^1 es metoxi o trifluorometoxi; y
R^2 es metilo.

En otra modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es 6-metilpiridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo; y
R es fluoro.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

(2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida;
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetamida;
(2*S*)-2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
N-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida;
(2*S*)-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida; y
(2*S*)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

(2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetamida;
(2*S*)-2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3R)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida; y
(2*S*)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida.

Los compuestos y sales descritos en esta descripción pueden existir en formas solvatadas y formas no solvatadas. Por ejemplo, una forma solvatada puede ser una forma hidratada, tal como un hemihidrato, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato o una cantidad alternativa de estos. La presente invención abarca todas estas formas solvatadas y no solvatadas de los compuestos de Fórmula (I).

Los átomos de los compuestos y sales descritos en esta descripción pueden existir en diferentes formas isotópicas. La presente invención abarca todas las formas isotópicas de los compuestos de Fórmula (I) que incluyen un carbono ^{11}C o ^{13}C e hidrógeno ^{1}H, ^{2}H (deuterio) o ^{3}H (tritio).

Los compuestos y sales descritos en esta descripción pueden existir como una mezcla de tautómeros. Los "tautómeros" son isómeros estructurales que existen en equilibrio como resultado de la migración de un átomo de hidrógeno. La presente invención incluye todos los tautómeros de los compuestos de Fórmula (I).

Los compuestos de Fórmula (I) pueden prepararse en diferentes formas diastereoméricas. La presente invención incluye todas las formas diastereoméricas de los compuestos de Fórmula (I).

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que es un diastereómero único que está en un exceso diastereomérico (% de) de ≥ 95 %, ≥ 98 % o ≥ 99 %. En una modalidad, el diastereómero único está presente en un exceso diastereomérico (% de) de ≥ 99 %.

Los compuestos que se cree que inhiben GLS1, es decir, los compuestos de Fórmula (I), y sales farmacéuticamente aceptables de estos se espera que sean útiles en la terapia, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades o afecciones médicas mediadas al menos en parte por GLS1, incluido el cáncer.

Cuando se menciona "cáncer", esto incluye cáncer no metastásico y, además, cáncer metastásico, tal que el tratamiento del cáncer implica el tratamiento de tanto tumores primarios como también de metástasis tumorales.

En una modalidad el cáncer es cáncer metastásico.

En una modalidad el cáncer es cáncer no metastásico.

"Actividad inhibitoria de GLS1" se refiere a una disminución en la actividad de GLS1 como respuesta directa o indirecta a la presencia de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en relación con la actividad de GLS1 en ausencia del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Tal disminución en la actividad puede deberse a la interacción directa del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este con GLS1, o debido a la interacción del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este con uno o más factores que a su vez afectan la actividad de GLS1. Por ejemplo, el compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede disminuir GLS1 mediante su unión directa a GLS1; al causar (directa o indirectamente) que otro factor disminuya la actividad de GLS1; o mediante (directa o indirectamente) la disminución de la cantidad de GLS1 presente en la célula u organismo.

El término "terapia" pretende tener el significado normal de tratar una enfermedad o corregir o compensar la patología subyacente. El término "terapia" incluye, además, "profilaxis" a menos que existan indicaciones específicas de lo contrario. Los términos "terapéutico" y "terapéuticamente" deben interpretarse de la manera correspondiente.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto de la Fórmula (I) como se describe en cualquiera de las modalidades en la presente descripción que es efectiva para proporcionar la terapia en un sujeto. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva puede causar cualquiera de los cambios observables o medibles en un sujeto como se describe en la definición de "terapia", "tratamiento" y "profilaxis" anteriormente. Por ejemplo, la cantidad efectiva puede reducir el número de células cancerosas o tumorales; reducir el tamaño total del tumor; inhibir o detener la infiltración de células tumorales en órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, los tejidos blandos y huesos; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. Una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para disminuir los síntomas de una enfermedad que responde a la inhibición de la actividad de GLS1. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, mediante la evaluación de la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta, y/o la calidad de vida. Como reconocen los expertos en la técnica, las cantidades efectivas pueden variar en dependencia de la ruta de administración, uso de excipientes, y el uso conjunto con otros agentes. Por ejemplo, cuando se usa una terapia de combinación, la cantidad del compuesto de la Fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable descrita en esta descripción y la cantidad del(de los) otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) son, cuando se combinan, conjuntamente eficaces para tratar un trastorno diana en el paciente animal. En este contexto, las cantidades combinadas están en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si son, cuando se combinan, suficientes para disminuir los síntomas de una enfermedad que responde a la inhibición de la actividad de GLS1 como se describió anteriormente. Típicamente, tales cantidades pueden determinarse por un experto en la técnica, por ejemplo, al iniciar con el intervalo de dosificación descrito en esta descripción para el compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un(unos) intervalo(s) de dosificación aprobado(s) o publicado(s) de los otros compuestos farmacéuticamente activos.

El término "profilaxis" pretende tener su significado normal e incluye la profilaxis primaria para prevenir el desarrollo de la enfermedad y la profilaxis secundaria en la cual la enfermedad ya se desarrolló y el paciente está protegido temporal o permanentemente contra la exacerbación o empeoramiento de la enfermedad.

El término "tratamiento" se usa como sinónimo de "terapia". Similarmente el término "tratar" puede considerarse como una aplicación de terapia donde "terapia" es como se define en la presente descripción.

En una modalidad se proporciona una composición farmacéutica que incluye el compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la composición farmacéutica incluye un compuesto de la Fórmula (I) como una base libre. En otra modalidad, la composición farmacéutica incluye una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la Fórmula (I).

En una modalidad se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en la terapia.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una modalidad se proporciona el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por GLS1. En una modalidad, la enfermedad mediada por GLS1 es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer puede ser cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer pancreático, cáncer renal, o cáncer hepatocelular.

El "cáncer de mama triple negativo" es cualquier cáncer de mama que no expresa, o subexpresa, los genes para el receptor de estrógeno, receptor de progesterona y Her2/neu.

En una modalidad se proporciona el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por GLS1. En una modalidad, la enfermedad mediada por GLS1 es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer puede ser cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer pancreático, cáncer renal, o cáncer hepatocelular.

En una modalidad se proporciona el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En una modalidad se proporcionan compuestos para su uso en un método de inhibición de GLS1 que incluye administrar un compuesto de la Fórmula (I).

En una modalidad se proporcionan compuestos para su uso en un método para tratar una enfermedad en la que la inhibición de GLS1 es beneficiosa en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, que incluye administrar al animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Los "animales de sangre caliente" incluyen, por ejemplo, humanos.

En una modalidad se proporcionan compuestos para su uso en un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, que incluye administrar al animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, el cáncer puede ser cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer pancreático, cáncer renal, o cáncer hepatocelular.

El tratamiento para el cáncer descrito en esta descripción puede aplicarse como una terapia única, o puede implicar, en adición a la administración del compuesto de la Fórmula (I), cirugía convencional, radioterapia, o quimioterapia; o una combinación de tales terapias adicionales. Tal cirugía convencional, radioterapia, o quimioterapia pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente, o por separado al tratamiento con el compuesto de la Fórmula (I).

Por lo tanto, en una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos una sustancia antitumoral adicional, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos una sustancia antitumoral adicional para su uso en el tratamiento simultáneo, separado o secuencial del cáncer.

En una modalidad se proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento del cáncer, donde el compuesto de la Fórmula (I) se administra simultáneamente, separadamente, o secuencialmente con al menos una sustancia antitumoral adicional.

En una modalidad se proporcionan compuestos para su uso en un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, que incluye administrar al animal de sangre caliente un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este y al menos una sustancia antitumoral adicional, en donde las cantidades del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y la sustancia antitumoral adicional son conjuntamente efectivas para producir un efecto contra el cáncer.

En una modalidad se proporcionan compuestos para su uso en un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, que incluye administrar al animal de sangre caliente un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y simultáneamente, separadamente o secuencialmente administrar al menos una sustancia antitumoral adicional al animal de sangre caliente, en donde las cantidades del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y la sustancia antitumoral adicional son conjuntamente efectivas para producir un efecto contra el cáncer.

En cualquier modalidad la sustancia antitumoral adicional es un taxano. En una modalidad el taxano es paclitaxel. En una modalidad el taxano es docetaxel.

En cualquier modalidad la sustancia antitumoral adicional es una terapia con platino. En una modalidad la terapia con platino es cisplatino, oxaliplatino, o carboplatino.

De acuerdo con una modalidad adicional se proporciona un kit que comprende:

a) Un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en una primera forma de dosificación unitaria;
b) Una segunda sustancia antitumoral en una segunda forma de dosificación unitaria;
c) Un recipiente para contener las formas de dosificación unitarias primera y segunda; y, opcionalmente,
d) Instrucciones de uso.

Los compuestos de Fórmula (I), y las sales farmacéuticamente aceptables de estos, pueden administrarse como composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables. En consecuencia, en una modalidad se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones pueden estar en una forma adecuada para uso oral (por ejemplo, como tabletas, pastillas, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones, polvos o gránulos dispersables, jarabes o elixires), para uso tópico (por ejemplo, como cremas, ungüentos, geles, o soluciones o suspensiones acuosas u oleosas), para administración por inhalación (por ejemplo, como un polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para administración por insuflación (por ejemplo, como un polvo finamente dividido) o para administración parenteral (por ejemplo, como una solución acuosa u oleosa estéril para la dosificación intravenosa, subcutánea, intramuscular), o como un supositorio. Las composiciones pueden obtenerse por procedimientos convencionales mediante el uso de excipientes farmacéuticos convencionales. Por lo tanto, las composiciones que pretenden tener uso oral pueden contener, por ejemplo, uno o más agentes colorantes, edulcorantes, saborizantes, y/o conservantes.

En una modalidad se incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en la terapia.

En una modalidad se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades el cáncer puede ser cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer pancreático, cáncer renal, o cáncer hepatocelular.

El compuesto de la Fórmula (I) normalmente se administrará a un animal de sangre caliente en una dosis unitaria dentro del intervalo de 5-5.000 mg/m^2 de área corporal del animal, es decir, aproximadamente 0,1-100 mg/kg, y esto normalmente proporciona una dosis terapéuticamente efectiva. Una forma de dosis unitaria tal como una tableta o cápsula usualmente contendrá, por ejemplo, 1-250 mg de ingrediente activo. La dosis diaria necesariamente variará en dependencia del huésped tratado, la ruta particular de administración, cualquier terapia que se administre conjuntamente, y la gravedad de la enfermedad que se trate. En consecuencia, el profesional que trata a un paciente en particular puede determinar la dosis óptima.

EJEMPLOS

Las diversas modalidades se ilustran mediante los siguientes ejemplos. La invención no debe interpretarse como limitada a los Ejemplos.

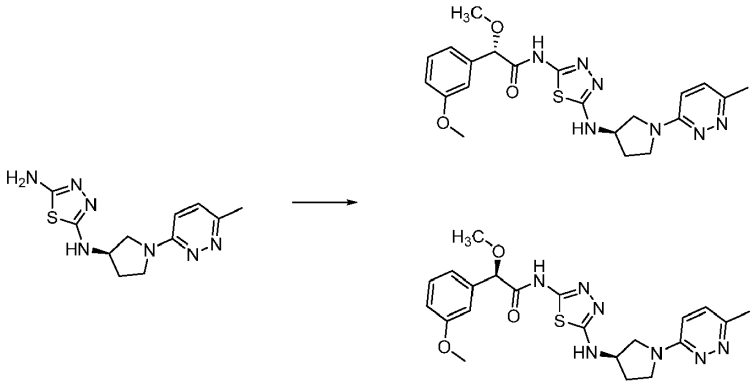
Durante la preparación de los ejemplos, generalmente:

a) Las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, *es decir* en el intervalo de aproximadamente 17 a 30 °C y bajo una atmósfera de un gas inerte tal como nitrógeno a menos que se indique lo contrario;
b) Las evaporaciones se llevaron a cabo mediante evaporación rotativa o mediante el uso de un equipo Genevac al vacío y los procedimientos de tratamiento se llevaron a cabo después de la eliminación de los sólidos residuales por filtración;
c) Las purificaciones por cromatografía instantánea se realizaron en un Isco Combiflash Companion automatizado mediante el uso de columnas de sílice preempaquetadas Grace Resolve, e Isco Combiflash Rf (instantánea de fase inversa) mediante el uso de columnas RediSep Gold C18;
d) Los rendimientos, cuando están presentes, no son necesariamente los máximos alcanzables;
e) Las estructuras de los productos finales de Fórmula (I) se confirmaron por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), con valores de desplazamiento químico de NMR medidos en la escala delta. Los espectros de resonancia magnética de protones se determinaron mediante el uso de un instrumento Bruker Avance 700 (700MHz), Bruker Avance 500 (500 MHz), Bruker 400 (400 MHz) o Bruker 300 (300 MHz); ^{19}F NMR se determinaron a 282 MHz o 376 MHz; ^{13}C NMR se determinaron a 75 MHz o 100 MHz; las mediciones se tomaron a aproximadamente 20 - 30 °C a menos que se especifique lo contrario; se usaron las siguientes abreviaturas: s, singulete; d, doblete; t, triplete; q, cuatriplete; m, multiplete; dd, doblete de dobletes; ddd, doblete de doblete de doblete; dt, doblete de tripletes; bs, señal amplia;
f) Los productos finales de Fórmula (I) se caracterizaron, además, por espectroscopía de masas después de cromatografía líquida (LCMS), mediante el uso de un sistema HPLC basado en un sistema de LC Waters 2790/95 con un 2996 PDA y un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple ZQ 2000 amu. Los solventes usados fueron A= agua, B= acetonitrilo, C= 50:50 acetonitrilo:agua 0,1 % de ácido fórmico y D= 50:50 acetonitrilo:agua 0,1 % de hidróxido de amonio. A una tasa de flujo de 1,1 ml/min se inyectaron 5 µL de muestra en una columna Phenomenex Gemini NX de 50 x 2,1 51 µm. El gradiente varió de 95 % de A a 95 % de B durante 4,0 minutos con una infusión de 5 % de C constante (para el análisis de ácido, D se usa para el análisis de base). El flujo se mantuvo al 95 % de B por 0,5 minutos antes de volver a las condiciones de inicio. Los datos se adquirieron de 150 a 850 amu tanto en modo positivo como negativo en el espectrómetro de masas y a 220 -320 nm en el PDA. La LCMS también se realizó en un sistema UPLC mediante el uso de una bomba Waters Acquity Binary con administrador de muestras, Acquity PDA y un espectrómetro de masas SQD. Los solventes usados fueron A1 = 0,1 % de ácido fórmico (ac), B1 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo, A2 = 0,1 % de hidróxido de amonio (ac) y B2 0,1 % de hidróxido de amonio en acetonitrilo. A una tasa de flujo de 1 ml/min se inyectó 1 µL de muestra en una columna Waters BEH de 50 x 2,1 1,7um (a 40 °C). El gradiente se extendió de 97 % de A1 a 97 % de B1 durante 1,30 minutos antes de mantenerse por 0,2 minutos y volver a las condiciones de inicio (sustituir A1 y B1 por A2 y B2 para el análisis de base). Los datos se obtuvieron de 150 - 1.000 amu en modo de iones positivos y negativos en el espectrómetro de masas y a 245 -320 amu en el PDA;
g) Generalmente los productos intermedios no se caracterizaron por completo y la pureza se evaluó mediante análisis cromatográfico de capa fina, espectral de masas, HPLC y/o NMR;
h) Las siguientes abreviaturas se usaron: h = hora(s); r.t. = temperatura ambiente (~17-30 °C); conc. = concentrado; FCC = cromatografía en columna instantánea mediante el uso de sílice; AIBN = azo*bis*isobutironitrilo; DCM = diclorometano; DIPEA = *di*-isopropil etilamina; DMA = *N,N*-dimetilacetamida; DMF = *N,N*-dimetilformamida; DMSO = dimetilsulfóxido; EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; Et_2O = éter dietílico; EtOAc = acetato de etilo; EtOH = etanol; HATU = 1-[*bis*(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato; HOBT = hidroxibenzotriazol; K_2CO_3 = carbonato de potasio; MeOH = metanol; MeCN = acetonitrilo; $MgSO_4$ = sulfato de magnesio anhidro; Na_2SO_4 = sulfato de sodio anhidro; NBS = *N*-bromo succinimida; TFA = ácido trifluoroacético; THF = tetrahidrofurano; sat. = solución acuosa saturada.

En varios de los ejemplos a continuación, se describe un par de compuestos diastereoméricos. Por ejemplo, los compuestos del Ejemplo 1(a) y del Ejemplo 1(b) representan un par de compuestos diastereoméricos, formados como una mezcla en el producto de una reacción única y posteriormente separados. En tales ejemplos, cualquier asignación de estereoquímica no es absoluta. A modo de ilustración, los Ejemplos 1(a) y 1(b) se refieren a los diastereómeros (2*S*,3*R*) y 2*R*,3*R*) del compuesto nombrado; sin embargo, no se pretende transmitir que el Ejemplo 1(a) se asigne definitivamente como el diastereómero (2*S*3*R*) y el Ejemplo 1(b) como el diastereómero (2*R,*3*R*).

Ejemplo 1(a) y 1(b)

(2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

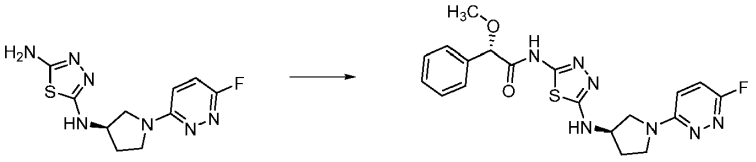


Se adicionó HATU (329 mg, 0,87 mmol) al ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético (Producto intermedio 14, 141 mg, 0,72 mmol), *N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 200 mg, 0,72 mmol) y DIPEA (0,25 ml, 1,44 mmol) en DMF (6 ml) a 21 °C bajo nitrógeno. La solución resultante se agitó a 21 °C por 2 horas. La mezcla bruta se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH_3 1 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar un producto bruto que se purificó adicionalmente por FCC (SiO_2, 0 a 12 % de MeOH en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar la mezcla de diastereoisómeros como una goma de color amarillo pálido (95 mg). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Lux C2, 20 µm, 50 mm x 250 mm, 100 % de MeOH a 200 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 1(a) 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (58 mg, 18 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 2,05 (1H, td), 2,21 - 2,35 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,40 - 3,47 (1H, m), 3,55 (2H, ddd), 3,69 - 3,75 (4H, m), 4,31 - 4,46 (1H, m), 4,93 (1H, s), 6,82 (1H, d), 6,87 - 6,94 (1H, m), 6,99 - 7,07 (2H, m), 7,22 (1H, d), 7,29 (1H, t), 7,61 (1H, d), 12,13 (1H, s). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 456.
Segundo isómero eluido Ejemplo 1(b) 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (55 mg, 17 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 2,05 (1H, td), 2,21 - 2,35 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,4 - 3,47 (1H, m), 3,55 (2H, ddd), 3,69 - 3,75 (4H, m), 4,31 - 4,46 (1H, m), 4,93 (1H, s), 6,82 (1H, d), 6,87 - 6,94 (1H, m), 6,99 - 7,07 (2H, m), 7,22 (1H, d), 7,29 (1H, t), 7,61 (1H, d), 12,13 (1H, s). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 456.

Ejemplo 2

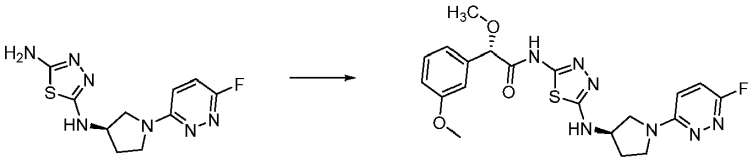
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida



Se adicionó HOBT (120 mg, 0,78 mmol) a *N*2-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 4, 220 mg, 0,78 mmol), ácido (2*S*)-2-metoxi-2-fenil-acético (130 mg, 0,78 mmol) y EDC (300 mg, 1,56 mmol) en DMF (3 ml) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C por 3 horas. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna XBridge C18 OBD, 5 µm, 50 mm x 150 mm). Se usaron decrecientemente mezclas polares de agua (que contenían ácido fórmico al 0,05 %) y MeCN como fase móvil. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar el Ejemplo 2 (2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida (95 mg, 27,8 %) como un sólido blanco. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD, 22 °C) δ 2,16 - 2,23 (m, 1H), 2,36-2,44 (m, 1H), 3,44 (s, 3H), 3,55 - 3,69 (m, 3H), 3,82 - 3,86 (m, 1H), 4,46 - 4,51 (m, 1H), 4,93 (s, 1H), 7,15 - 7,19 (m, 1H), 7,24 -7,27 (m, 1H), 7,35 - 7,43 (m, 3H), 7,47 - 7,49 (m, 2H). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 430.

Ejemplo 3

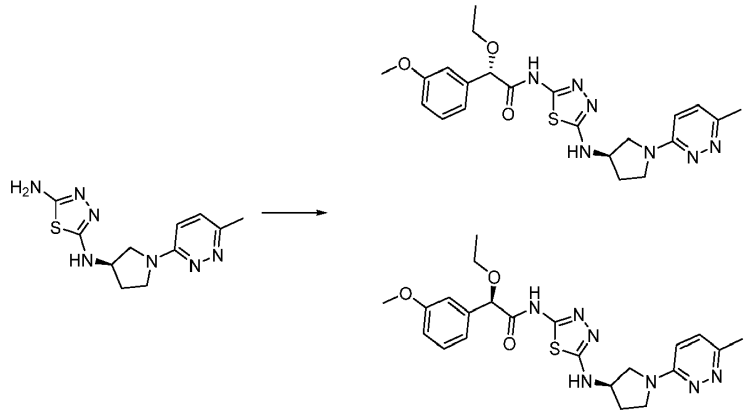
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetamida



Se adicionó HATU (405 mg, 1,07 mmol) al ácido (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético (Producto intermedio 12, 174 mg, 0,89 mmol), *N*2-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 4, 250 mg, 0,89 mmol) y DIPEA (0,155 ml, 0,89 mmol) en DMF (8 ml) a 21 °C bajo N_2. La solución resultante se agitó a 0 °C por 45 minutos. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH_3 1 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar una goma. El producto bruto se purificó por FCC (SiO_2, 0 a 9 % de MeOH en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad, se trituraron con éter/DCM y se filtraron para proporcionar el Ejemplo 3 (2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetamida (185 mg, 45 %) como un sólido crema. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 2,12 (1H, td), 2,3 - 2,46 (1H, m), 3,37 (3H, s), 3,52 (1H, dd), 3,59 - 3,67 (2H, m), 3,81 (4H, m), 4,34 - 4,56 (1H, m), 5,00 (1H, s), 6,97 (1H, ddd), 7,03 - 7,14 (2H, m), 7,22 (1H, dd), 7,32 - 7,51 (2H, m), 7,73 (1H, d), 12,20 (1H, s). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 486.

Ejemplos 4(a) y 4(b)

(2*S*)-2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

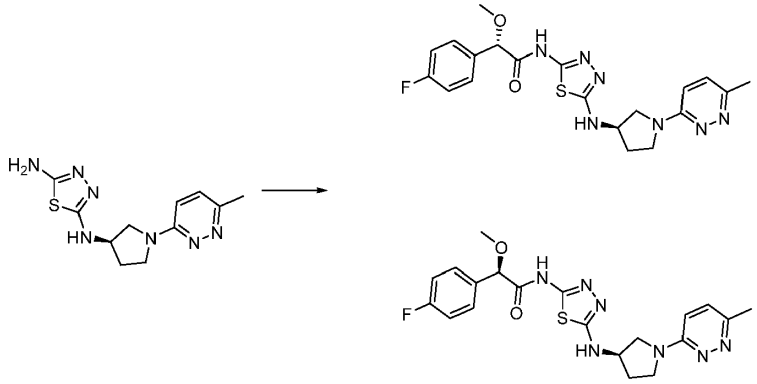


Se pesaron ácido 2-etoxi-2-(3-metoxifenil)acético (Producto intermedio 15, 0,11 g, 0,54 mmol) y *N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 0,15 g, 0,54 mmol) en un matraz de fondo redondo seguido de DIPEA (0,1 ml, 0,54 mmol) y DMF (5 ml). La solución resultante se trató después con HATU (0,21 g, 0,54 mmol) y se dejó agitar a r.t. bajo N_2 por 24 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida y la goma residual se disolvió en DCM, se adsorbió sobre sílice y se purificó por FCC (SiO_2 0-10 % de MeOH en DCM). La evaporación de las fracciones puras bajo presión reducida produjo el compuesto del título como una espuma de color amarillo claro. La espuma se disolvió en metanol y se adicionó a una columna de intercambio iónico SCX que se lavó con DCM, después metanol y después se eluyó con NH_3 2M en MeOH. El solvente se eliminó bajo presión reducida y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, tasa de flujo de 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar el producto como una mezcla de diastereoisómeros como un sólido blanco (67 mg). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Phenomenex Lux C4, 20 µm, 50 mm x 250 mm, MeOH a 120 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido ejemplo 4(a) 2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (25 mg, 37 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 1,17 (3H, t), 1,99 - 2,09 (1H, m), 2,22 - 2,32 (1H, m), 2,40 (3H, s), 3,40 - 3,56 (5H, m), 3,69 - 3,73 (1H, m), 3,74 (3H, s), 4,32 - 4,40 (1H, m), 5,04 (1H, s), 6,83 (1H, d), 6,89 (1H, dd), 7,00 - 7,05 (2H, m), 7,22 (1H, d), 7,28 (1H, t), 7,65 (1H, d), 12,10 (1H, s). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 470.
Segundo isómero eluido ejemplo 4(b) 2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (25 mg, 37 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 1,17 (3H, t), 1,97 - 2,09 (1H, m), 2,21 - 2,31 (1H, m), 2,40 (3H, s), 3,39 - 3,56 (5H, m), 3,70 - 3,73 (1H, m), 3,74 (3H, s), 4,33 - 4,40 (1H, m), 5,04 (1H, s), 6,84 (1H, d), 6,87 - 6,92 (1H, m), 7,01 - 7,05 (2H, m), 7,23 (1H, d), 7,28 (1H, t), 7,65 (1H, d), 12,11 (1H, s). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 470.

Ejemplos 5(a) y 5(b)

(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1- (6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

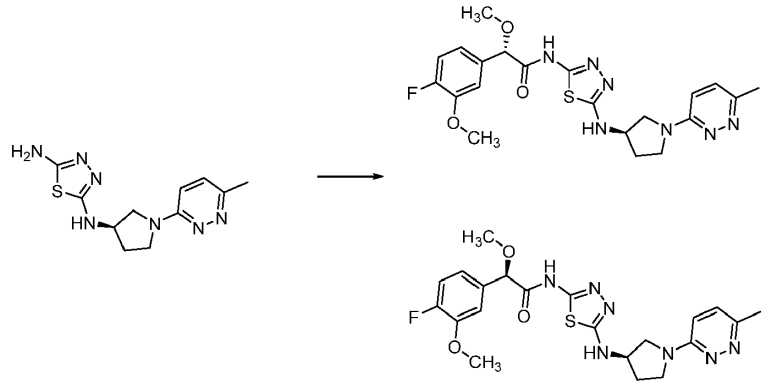


*N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 0,15 g, 0,541 mmol) y ácido 2-(4-fluorofenil)-2-metoxiacético (Producto intermedio 16, 0,1 g, 0,541 mmol) se disolvieron en DMF (2 ml) a r.t bajo N_2. La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de la adición de DIPEA (0,34 ml, 1,943 mmol) y HATU (0,21 g, 0,541 mmol), después a r.t. por 2 horas. La mezcla bruta se pasó después a través de una columna SCX de 5 g se lavó con MeOH después se eluyó con NH_3 2N en MeOH. La fracción básica se evaporó bajo presión reducida para producir una goma naranja que se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, tasa de flujo 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron bajo presión reducida y se pasaron a través de una columna SCX de 2 g se lavaron con MeOH y después se eluyeron con NH_3 2N en MeOH. La fracción básica se evaporó hasta la sequedad para proporcionar la mezcla de diastereoisómeros como una espuma blanquecina. Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Amy-C, 5 µm, 20 mm x 250 mm, 2:3 heptano:EtOH que contiene 0,1 % v/v de modificador NH_3 a 21 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 5(a) 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (55,3 mg, 23,0 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 21 °C) δ 2,04 (1H, dq), 2,26 (1H, dt), 2,41 (3H, s), 3,30 (3H, s), 3,57 - 3,41 (3H, m), 3,72 (1H, dd), 4,36 (1H, q), 4,98 (1H, s), 6,83 (1H, d), 7,22 (3H, ddd), 7,55 - 7,44 (2H, m), 7,66 (1H, d), 12,28 (s, 1H). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 444.
Segundo isómero eluido, Ejemplo 5(b) 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (59,2 mg, 24,7 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 21 °C) δ 2,04 (1H, dq), 2,31 - 2,23 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,30 (3H, s), 3,44 (1H, dd), 3,59 - 3,49 (2H, m), 3,71 (1H, dd), 4,36 (1H, q), 4,97 (1H, s), 6,82 (1H, d), 7,22 (3H, ddd), 7,53 - 7,46 (2H, m), 7,64 (1H, d), 12,28 (1H, s). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 444.

Ejemplos 6(a) y 6(b)

(2*S*)-2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



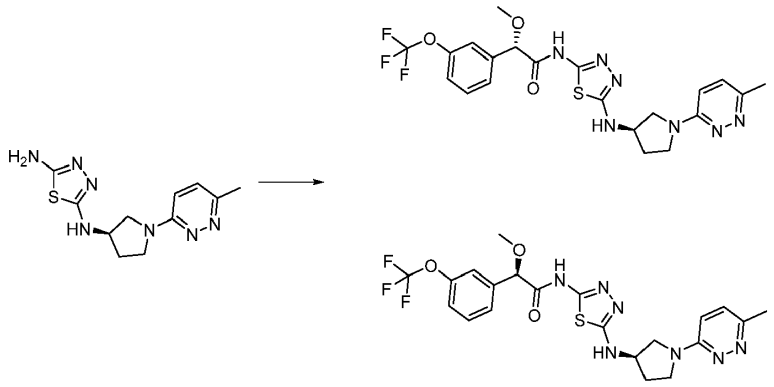
*N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 200 mg, 0,72 mmol) y ácido 2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-acético (Producto intermedio 18, 150 mg, 0,72 mmol) se disolvieron en DMF (2 ml) a r.t. bajo nitrógeno. La mezcla se agitó por 5 minutos antes de la adición de DIPEA (0,34 ml, 1,94 mmol) y HATU (0,27 g, 0,72 mmol) y después se agitó a r.t. durante la noche. La mezcla cruda se pasó a través de una columna SCX de 5 g se lavó con MeOH y después se eluyó con NH_3 2M en MeOH. La fracción básica se evaporó para producir el producto bruto como una goma naranja que se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, tasa de flujo 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron y se pasaron a través de una columna SCX de 2 g se lavaron con MeOH y después se eluyeron con NH_3 2M en MeOH. La fracción básica se evaporó para producir la mezcla

de diastereoisómeros como un sólido blanquecino. Los diastereoisómeros se separaron después por SFC (columna Lux C3, 5 µm, 21,2 mm x 250 mm, MeOH/CO_2 35 % que contiene modificador NH_3, 50 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 6(a) 2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (34 mg, 10 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 21 °C) δ 1,98 - 2,12 (1H, m), 2,21 - 2,33 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,32 (3H, s), 3,40 - 3,58 (3H, m), 3,69 - 3,79 (1H, m), 3,84 (3H, s), 4,32 - 4,41 (1H, m), 4,95 (s, 1H), 6,83 (1H, d), 6,98 - 7,05 (1H, m), 7,19 - 7,28 (3H, m), 7,68 (1H, d). *m*/*z*: $ES^+[M+H]^+$ 474.
Segundo isómero eluido Ejemplo 6(b) 2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (44 mg, 13 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 21 °C) δ 1,99 - 2,10 (1H, m), 2,23 - 2,34 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,31 (3H, s), 3,41 - 3,48 (1H, m), 3,50 - 3,56 (2H, m), 3,67 - 3,78 (1H, m), 3,84 (3H, s), 4,32 - 4,39 (1H, m), 4,94 (1H, s), 6,82 (1H, d), 6,98 - 7,04 (1H, m), 7,17 - 7,30 (3H, m), 7,65 (1H, d). *m*/*z*: $ES^+[M+H]^+$ 474.

Ejemplos 7(a) y 7(b)

(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida y (2*R*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2- [3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida

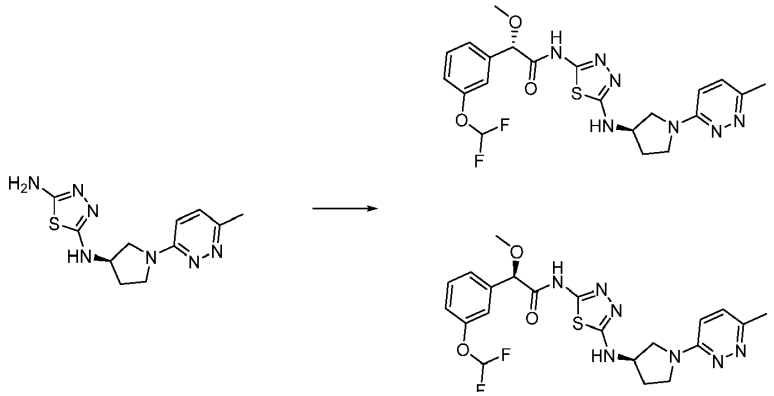


DIPEA (0,14 ml, 0,81 mmol), HATU (247 mg, 0,65 mmol) y ácido 2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 19, 160 mg, 0,65 mmol) se adicionaron a una solución de *N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 150 mg, 0,54 mmol) en DMF (4 ml). La mezcla se agitó a r.t. por 18 h. Después esta se diluyó con agua (5 ml) y después se extrajo en DCM (10 ml), se evaporó y purificó por HPLC preparativa (columna XBridge OBD C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, tasa de flujo de 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contienen 0,3 ml/L de NH_4OH como una fase móvil. Las fracciones puras se evaporaron después para producir una mezcla de diastereoisómeros. Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Amy-C, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, heptano/EtOH 7/3 que contiene modificador NH_3, 21 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 7(a) 2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida (50 mg, 18 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 21 °C) δ 1,96 - 2,11 (1H, m), 2,20 - 2,37 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,34 (3H, s), 3,42 - 3,60 (3H, m), 3,66 - 3,78 (1H, m), 4,37 (1H, q), 5,07 (1H, s), 6,84 (1H, d), 7,23 (1H, d), 7,37 (1H, d), 7,41 - 7,58 (3H, m), 7,72 (1H, d), 12,37 (1H, s). *m*/*z*: $ES^+[M+H]^+$ 510.
Segundo isómero eluido Ejemplo 7(b) 2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida (34 mg, 12 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 21 °C) δ 1,97 - 2,13 (1H, m), 2,20 - 2,34 (1H, m), 2,41 (3H, s), 3,34 (3H, s), 3,39 - 3,60 (3H, m), 3,66-3,77 (1H, m), 4,36 (1H, d), 5,07 (1H, s), 6,83 (1H, d), 7,23 (1H, d), 7,37 (1H, d), 7,43 - 7,60 (3H, m), 7,72 (1H, d), 12,36 (1H, s). *m*/*z*: $ES^+[M+H]^+$ 510.

Ejemplos 8(a) y 8(b)

(2*S*)-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3R)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

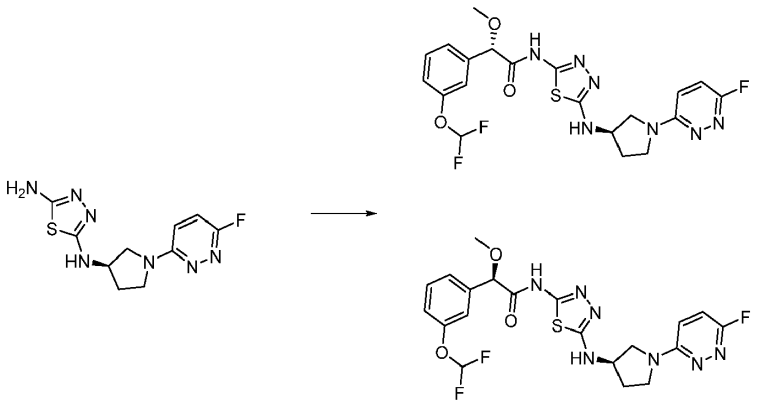


Se pesaron ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-acético (Producto intermedio 20, 0,11 g, 0,469 mmol) y *N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 0,13 g, 0,469 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se adicionaron DMF (3 ml) y DIPEA (0,15 g, 1,172 mmol) seguido de HATU (0,18 g, 0,469 mmol) y la solución resultante se dejó agitar a r.t. bajo nitrógeno por 15 h. El solvente se eliminó bajo presión reducida y la goma residual se disolvió en DCM, se absorbió sobre sílice y se purificó por FCC (SiO_2, 1-10 % de MeOH que contiene 0,1 % de NH_3 en DCM). La evaporación de las fracciones puras bajo presión reducida dio una goma de color amarillo pálido que se separó por SFC quiral preparativa (columna Lux C3, 5 µm, 21,2 mm x 250 mm, tasa de flujo de 50 ml/min a una longitud de onda de 210 nm con 40:60 MeOH:CO_2 + 0,1 % de NH_3 como eluyente) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 8(a) [3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (48 mg, 20 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 2,07 - 2,00 (1H, m), 2,31 - 2,22 (1H, m), 2,40 (3H, s), 3,34 (3H, s), 3,58 - 3,41 (3H, m), 3,71 (1H, dd), 4,38 - 4,34 (1H, m), 5,01 (1H, s), 6,83 (1H, d), 7,49 - 7,04 (6H, m), 7,71 (1H, d), 12,31 (1H, s). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 492.
Segundo isómero eluido Ejemplo 8(b) [3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (45 mg, 19 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 2,08 - 2,00 (1H, m), 2,34 - 2,21 (1H, m), 2,40 (3H, s), 3,32 (3H, s), 3,57 - 3,42 (3H, m), 3,71 (1H, dd), 4,36 (1H, m), 5,01 (1H, s), 6,82 (1H, d), 7,49 - 7,04 (6H, m), 7,69 (1H, d), 12,26 (1H, s). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 492.

Ejemplos 9(a) y 9(b)

(2*S*)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4- tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida y (2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida

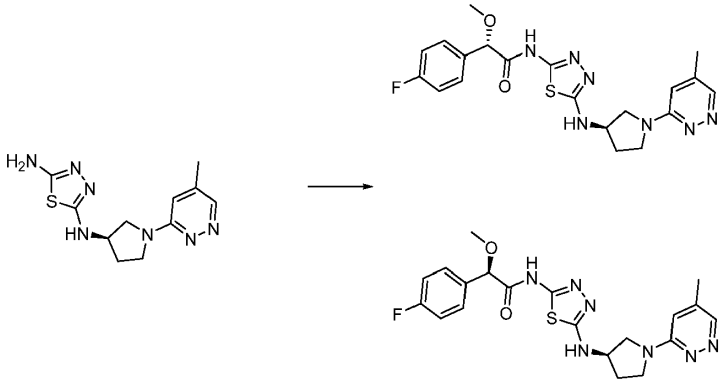


Se adicionó HATU (811 mg, 2,13 mmol) al ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-acético (Producto intermedio 20, 454 mg, 1,96 mmol), *N*2-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 4, 500 mg, 1,78 mmol) y DIPEA (0,31 ml, 1,78 mmol) en DMF (12 ml) a 21 °C bajo N_2. La solución resultante se agitó a 21 °C por 45 minutos. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH_3 1 M en MeOH y las fracciones se evaporaron hasta una goma. El producto bruto se purificó por FCC (SiO_2, 0 - 8 % de MeOH en DCM). Las fracciones se evaporaron hasta la sequedad para producir un sólido gomoso. El producto bruto se purificó adicionalmente por FCC (SiO_2, 0 - 9 % de MeOH en EtOAc). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad, se trituraron con DCM/éter y se filtraron para proporcionar la mezcla de diastereoisómeros como un sólido amarillo (210 mg). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Phenomenex Lux C2, 20 µm, 50 mm x 250 mm mediante el uso de EtOH como eluyente a 120 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 9(a) (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-ilo]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxiacetamida (72 mg, 8 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,02 (1H, dd), 2,25 (1H, dq), 3,29 (3H, s), 3,39 - 3,57 (3H, m), 3,70 (1H, dd), 4,34 (1H, d), 4,98 (1H, s), 6,97 - 7,25 (3H, m), 7,27 - 7,35 (2H, m), 7,38 - 7,48 (1H, m), 7,64 (1H, d), 12,19 (1H, s). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$ 494.
Segundo isómero eluido Ejemplo 9(b) (2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxiacetamida (95 mg, 11 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,02 (1H, dd), 2,25 (1H, dq), 3,29 (3H, s), 3,39 - 3,57 (3H, m), 3,70 (1H, dd), 4,34 (1H, d), 4,98 (1H, s), 6,97 - 7,25 (3H, m), 7,27 - 7,35 (2H, m), 7,38 - 7,48 (1H, m), 7,64 (1H, d), 12,19 (1H, s). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$ 494.

Ejemplos 10(a) y 10(b)

(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il] acetamida

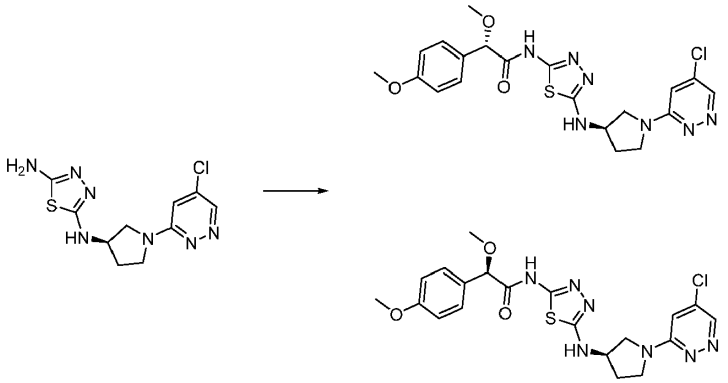


Se disolvieron *N*2-[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 7, 100 mg, 0,36 mmol) y ácido 2-(4-fluorofenil)-2-metoxiacético (Producto intermedio 16, 66 mg, 0,36 mmol) en DMF (2,0 ml) a r.t. bajo N_2. La mezcla se agitó por 5 minutos antes de la adición de DIPEA (0,09 ml, 0,54 mmol) y HATU (165 mg, 0,43 mmol) y después a r.t. durante la noche. La mezcla bruta se pasó a través de una columna SCX de 5 g, se lavó con MeOH, después se eluyó con NH_3 2M en MeOH. La fracción básica se evaporó para producir una goma naranja. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm a 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones que contenían la masa deseada se combinaron, se evaporaron y se pasaron a través de una columna SCX de 5 g se lavaron con MeOH y después se eluyeron con NH_3 2M en MeOH. La fracción básica se evaporó para producir la mezcla de diastereoisómeros como un sólido blanquecino (70 mg). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Lux C4, 20 µm, 50 mm x 250 mm, 100 % de MeOH a 120 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 10(a) 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (25 mg, 16 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 2,01 - 2,11 (1H, m), 2,20 (3H, s), 2,28 (1H, dt), 3,31 (3H, s), 3,48 (1H, dd), 3,52 - 3,61 (2H, m), 3,74 (1H, dd), 4,33 - 4,41 (1H, m), 4,98 (1H, s), 6,69 (1H, s), 7,21 (2H, t), 7,47 - 7,53 (2H, m), 7,63 (1H, d), 8,36 (1H, s), 12,20 (1H, s). *m/z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 444.
Segundo isómero eluido, Ejemplo 10(b) 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (26 mg, 17 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 2,00 - 2,1 (1H, m), 2,21 (3H, s), 2,27 (1H, dt), 3,31 (3H, s), 3,45 - 3,60 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,32 - 4,40 (1H, m), 4,97 (1H, s), 6,69 (1H, d), 7,17 - 7,25 (2H, m), 7,47 - 7,53 (2H, m), 7,59 (1H, d), 8,36 (1H, d). *m/z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 444.

Ejemplos 11(a) y 11(b)

(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida y (2*R*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida

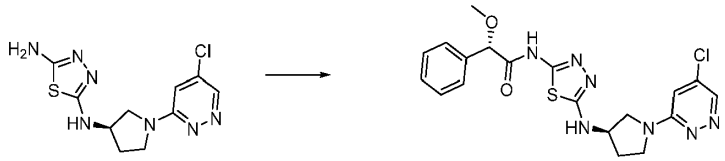


Se disolvieron *N*2-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 9, 100 mg, 0,34 mmol) y ácido 2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acético (Producto intermedio 21, 70 mg, 0,34 mmol) en DMF (2,0 ml) y se trataron con DIPEA (0,15 ml, 0,84 mmol) y HATU (190 mg, 0,50 mmol) después se agitó a r.t. durante la noche. La mezcla bruta se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo en DCM (10 ml). Después se evaporó el DCM y el producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm a 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones que contenían la masa deseada se combinaron, se evaporaron y se pasaron a través de una columna SCX se lavaron con MeOH y después se eluyeron con NH_3 2M en MeOH. La fracción básica se evaporó para producir la mezcla de diastereoisómeros como un sólido blanquecino (35 mg). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC preparativa (columna Lux C4, 20 µm, 50 mm x 250 mm, 100 % de MeOH a 120 ml/min) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 11(a) *N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida (12 mg, 7,5 %) ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 2,03 - 2,13 (1H, m), 2,23 - 2,33 (1H, m), 3,49 - 3,63 (3H, m), 3,75 (3H, s), 3,76 - 3,80 (1H, m), 4,33 - 4,42 (1H, m), 4,89 (1H, s), 6,90 - 6,96 (2H, m), 7,10 (1H, d), 7,34 - 7,41 (2H, m), 7,60 (1H, d), 8,55 (1H, d), 12,10 (1H, s); *metro*/*z*: ES$^+$ [M + H]$^+$ 476. más 3H oscurecido por el pico del agua a 3,3 ppm
Segundo isómero eluido Ejemplo 11(b) *N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida (15 mg, 9,4 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 2,01 - 2,12 (1H, m), 2,22 - 2,31 (1H, m), 3,27 (3H, s), 3,47 - 3,62 (3H, m), 3,75 (3H, s), 3,76 - 3,79 (1H, m), 4,33 - 4,42 (1H, m), 4,86 (1H, s), 6,89 - 6,96 (2H, m), 7,10 (1H, d), 7,34 - 7,41 (2H, m), 7,51 (1H, d), 8,55 (1H, d). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 476.

Ejemplo 12

(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida

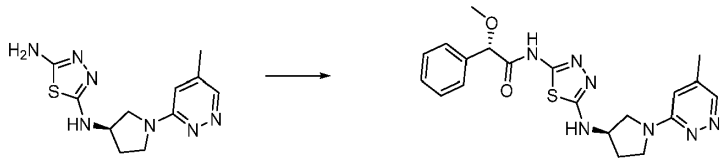


Se adicionaron DIPEA (0,04 ml, 0,20 mmol), *N*2-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 9, 40 mg, 0,13 mmol) y ácido (2*S*)-2-metoxi-2-fenilacético (20 mg, 0,13 mmol) a una solución de HATU (61 mg, 0,16 mmol) en DMF (2 ml). La mezcla se agitó a 25 °C por 18 horas. Después esta se diluyó con agua (5 ml) y después se extrajo en DCM (10 ml) y se evaporó bajo presión reducida. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm a 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Después las fracciones apropiadas se evaporaron y se purificaron nuevamente por cromatografía preparativa básica. Se usó una columna XBridge (5 micras, C18, 50x19 mm). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua que contenía 0,1 % de hidróxido de amonio y acetonitrilo como fase móvil. Después las fracciones puras se evaporaron y se secaron en el horno de vacío para proporcionar:

(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida como un sólido blanco (15 mg, 25 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 25 °C) δ 1,98 - 2,14 (1H, m), 2,17 - 2,36 (1H, m), 3,30 (3H, s), 3,44 - 3,64 (3H, m), 3,69 - 3,81 (1H, m), 4,28 - 4,42 (1H, m), 4,96 (1H, s), 7,11 (1H, d), 7,30 - 7,47 (5H, m), 7,69 (1H, d), 8,55 (1H, d), 12,24 (1H, s). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 446, 448.

Ejemplo 13

(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-fenil-acetamida



Se adicionaron DIPEA (0,09 ml, 0,54 mmol), HATU (164 mg, 0,43 mmol) y ácido (2S)-2-metoxi-2-fenilacético (60 mg, 0,36 mmol) a una solución de *N*2-[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 7, 100 mg, 0,36 mmol) en DMF (2 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. Después esta se diluyó con agua (5 ml), se extrajo en DCM (10 ml) y se evaporó bajo presión reducida. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm a 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenían 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones recolectadas se pasaron después por un cartucho SCX que se lavó con metanol antes de eluir con amoniaco 2 M en metanol. El amoníaco en metanol se evaporó y el residuo se secó en un horno de vacío para proporcionar:

(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-fenil-acetamida como un sólido blanco (28 mg, 18 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 25 °C) δ 2,01 - 2,10 (1H, m), 2,19 (3H, s), 2,22 - 2,34 (1H, m), 3,31 (3H, s), 3,42 - 3,60 (3H, m), 3,70 - 3,74 (1H, m), 4,30 - 4,42 (1H, m), 4,98 (1H, s), 6,70 (1H, s), 7,30 - 7,42 (3H, m), 7,43 - 7,49 (2H, m), 7,70 (1H, d), 8,35 (1H, s), 12,26 (1H, s). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 426

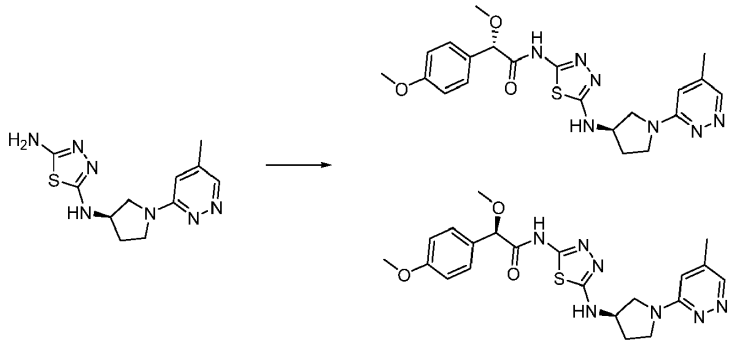
Ejemplos adicionales

Los compuestos de los siguientes ejemplos se prepararon de manera similar a los ejemplos anteriores.

Ejemplo núm.	Nombre	Datos de MS
14	(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-fenil-acetamida	m/z: ES+ [M+H]+ 425
15	2-etoxi-2-(4-metoxifenilo)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z: ES+ [M+H]+ 470
16	2-etoxi-2-(4-metoxifenilo)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z: ES+ [M+H]+ 470
17	*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 514
18	*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 514
19	2-(4-fluorofenilo)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxiacetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 448;
20	2-(4-fluorofenilo)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxiacetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 448
21	*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida	m/z (ES-), [M-H]- = 458
22	*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida	m/z (ES-), [M-H]- = 458
23	2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 478
24	2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 478
25	2-etoxi-2-(4-fluorofenilo)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 462
26	2-etoxi-2-(4-fluorofenilo)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 462
27	2-etoxi-2-(4-fluorofenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 458
28	2-etoxi-2-(4-fluorofenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 458
29	2-metoxi-2-(4-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 456
30	2-metoxi-2-(4-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 456
31	(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-fenil-acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 426
32	(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida	m/z (ES+), [M+H]+ = 446

Ejemplos 33(a) y 33(b)

(2*R*)-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*S*)-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

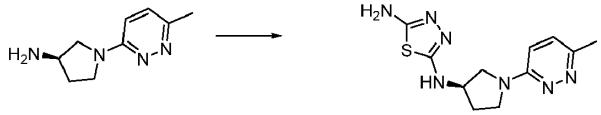


Se disolvieron *N*2-[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 7, 0,05 g, 0,173 mmol) y *N*-[(dimetilamino)(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metiliden]-*N*-metilmetilaminio hexafluorofosfato, HATU (0,08 g, 0,208 mmol) en DMF (2 ml) a r.t. bajo N_2. La mezcla se agitó por 5 minutos antes de la adición de ácido 2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acético (Producto intermedio 21, 0,04 g, 0,173 mmol) y DIPEA (0,05 ml, 0,26 mmol). La reacción se agitó a r.t. durante la noche bajo N_2. La mezcla bruta se pasó a través de una columna SCX de 5 g se lavó con MeOH después se eluyó con NH3 2 M en MeOH. La fracción básica se evaporó bajo presión reducida para producir el producto impuro como una goma naranja. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm a 25 ml/min). Se usaron decrecientemente relaciones polares de agua y MeCN que contenía 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil. Las fracciones que contenían la masa deseada se combinaron, se evaporaron bajo presión reducida y se pasaron a través de una columna SCX de 5 g, se lavaron con MeOH, después se eluyeron con NH3 2 M en MeOH. La fracción básica se evaporó bajo presión reducida para producir la mezcla de diastereoisómeros como un sólido blanquecino. Los diastereoisómeros se separaron mediante SFC quiral preparativa (columna Lux C1, 5 µm, 21,2 mm x 250 mm, tasa de flujo 50 ml/min a una longitud de onda de 210 nm con 40:60 MeOH:CO_2 + 0,1 % de NH_3 como eluyente) para producir:

Primer isómero eluido Ejemplo 33(a) 2-metoxi-2-(4-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il] amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (6,6 mg, 8 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12,18 (1H, s), 8,36 (1H, d), 7,68 (1H, d), 7,41 - 7,34 (2H, m), 6,99 - 6,90 (2H, m), 6,71 (1H, s), 4,90 (1H, s), 4,45 - 4,30 (1H, m), 3,74 (3H, s), 3,64 - 3,37 (4H, m), 3,27 (3H, s), 2,35 - 2,23 (1H, m), 2,20 (3H, s), 2,09 - 1,98 (1H, m). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 456.
Segundo eluido Ejemplo 33(b) 2-metoxi-2-(4-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (5,7 mg, 6 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12,18 (1H, s), 8,35 (1H, d), 7,66 (1H, d), 7,37 (2H, d), 6,94 (2H, d), 6,70 (1H, d), 4,89 (1H, s), 4,43 - 4,29 (1H, m), 3,74 (3H, s), 3,73 - 3,69 (1H, m), 3,60 - 3,45 (3H, m), 3,27 (3H, s), 2,34 - 2,23 (1H, m), 2,20 (3H, s), 2,10 - 2,01 (1H, m). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 456.

Producto intermedio 1

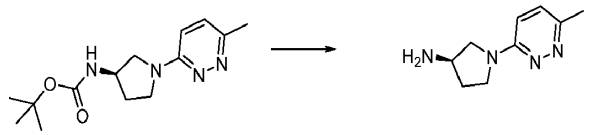
*N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina



Se disolvieron 5-bromo-1,3,4-tiadiazol-2-amina (912 mg, 5,07 mmol), (3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina (Producto intermedio 2, 860 mg, 4,83 mmol) y DIPEA (0,924 ml, 5,31 mmol) en DMF (10 ml). La reacción se calentó hasta 100 °C por 1 h después se dejó a r.t. durante la noche. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH_3 1 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar el producto bruto. Esto se disolvió en DCM/MeOH, se adsorbió sobre sílice y se purificó por FCC (SiO_2, 0 a 20 % de MeOH en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar *N*2-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (350 mg, 26 %) como una goma marrón. *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 278.

Producto intermedio 2

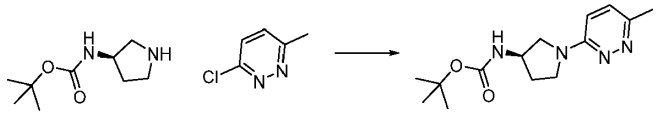
(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina



Se adicionó ácido trifluoroacético (12 ml) a *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato (Producto intermedio 3, 2,1 g, 7,54 mmol), en DCM (60 ml) a 21 °C bajo nitrógeno. La solución resultante se agitó a 21 °C por 2 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH3 7 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar (3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina (1,6 g, 119 %) como un aceite amarillo que se solidificó al reposar. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 27 °C) δ 1,56 - 1,8 (1H, m), 2,04 (1H, m), 2,39 (3H, s), 3,07 (1H, m), 3,37 - 3,43 (1H, m), 3,47 - 3,66 (3H, m), 4,08 (1H, s), 6,73 (1H, d), 7,19 (1H, d). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 179.

Producto intermedio 3

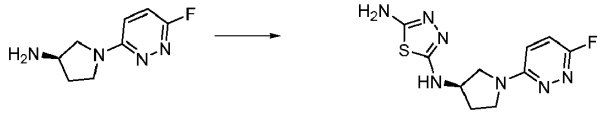
terc-butil *N*-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato



Una mezcla de DIPEA (8,49 ml, 48,62 mmol), *terc*-butil *N*-[(3*R*)-pirrolidin-3-il]carbamato (3,62 g, 19,45 mmol), 3-cloro-6-metilpiridazina (2,5 g, 19,45 mmol) y n-butanol (30 ml) se agitó a 130 °C por 12 h y después se dejó para refrescarse durante el fin de semana. La mezcla de reacción se evaporó y el producto bruto se purificó por FCC (SiO_2, 0 a 10 % de NH_3 1 M en MeOH en EtOAc). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato (2,1 g, 38,8 %) como un sólido amarillo. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 27 °C) δ 1,39 (9H, s), 1,88 (1H, m), 2,14 (1H, m), 2,40 (3H, s), 3,23 (1H, m), 3,37 - 3,45 (1H, m), 3,47 - 3,58 (1H, m), 3,61 (1H, m), 3,99 - 4,2 (1H, m), 6,77 (1H, d), 7,20 (2H, m); *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 279.

Producto intermedio 4

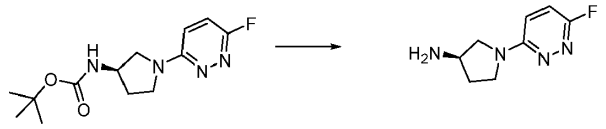
*N*2-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina



Se adicionó DIPEA (3,48 ml, 19,96 mmol) a 5-bromo-1,3,4-tiadiazol-2-amina (1,797 g, 9,98 mmol) y (3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina (Producto intermedio 5, 2 g, 10,98 mmol) en DMF anhidro (40 ml) a r.t. La solución resultante se agitó a 80 °C por 4 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH3 1 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar *N*2-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (2,9 g, 103 %) como un sólido marrón. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 1,90 - 2,12 (1H, m), 2,23 (1H, dtd), 3,42 (1H, dd), 3,47 - 3,61 (2H, m), 3,69 (1H, dd), 4,25 (1H, dq), 6,25 (2H, s), 7,04 (1H, d), 7,14 (1H, dd), 7,33 (1H, dd). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 282.

Producto intermedio 5

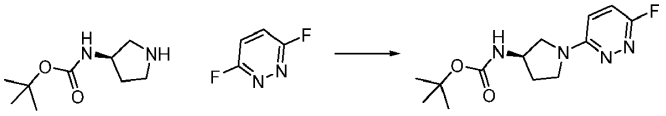
(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina



Se adicionó *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato (Producto intermedio 6, 6 g, 21,25 mmol) a DCM (70 ml) y TFA (14,00 ml) a 25 °C. La solución resultante se agitó a 25 °C por 4 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH_3 1 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar (3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina (2,0 g, 52 %) como un sólido gomoso amarillo pálido. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 1,55 - 1,83 (1H, m), 1,98 - 2,13 (1H, m), 2,89 - 3,14 (1H, m), 3,29 - 3,43 (1H, m), 3,54 (3H, ddt), 7,06 (1H, dd), 7,30 (1H, dd). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 183.

Producto intermedio 6

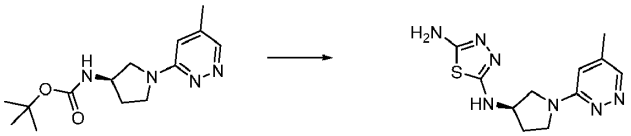
terc-butil *N*-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato



Una mezcla de 3,6-difluoropiridazina (6,06 g, 52,21 mmol) *terc*-butil N-[(3*R*)-pirrolidin-3-il]carbamato (9,72 g, 52,21 mmol), DIPEA (22,80 ml, 130,53 mmol) y n-butanol (140 ml) se agitó a 130 °C por 10 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (750 ml), y se lavó dos veces con agua (150 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó para proporcionar el producto bruto. Este se disolvió después en DCM y el producto bruto se purificó por FCC (SiO_2, 30 - 65 % de EtOAc en heptanos). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato (15 g, 102 %) como un sólido crema. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 30 °C) δ 1,46 (9H, s), 1,91 - 2,13 (1H, m), 2,32 (1H, dq), 3,40 (1H, dd), 3,56 - 3,72 (2H, m), 3,78 (1H, dd), 4,37 (1H, s), 4,70 (1H, s), 6,78 (1H, dd), 6,98 (1H, dd). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 283.

Producto intermedio 7

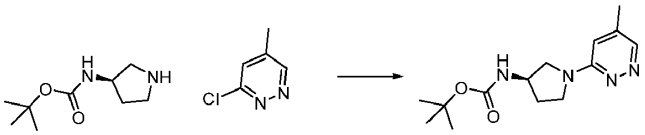
*N*2-[(3*R*)-1-(5-Metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina



Se disolvió *terc-butil*(3*R*)-3-[(5-metilpiridazin-3-il)amino]pirrolidina-1-carboxilato (Producto intermedio 8, 200 mg, 0,72 mmol) en DCM (5 ml) y se trató con TFA (5 ml). Se dejó agitar a temperatura ambiente por 2 horas, después se evaporó hasta la sequedad para producir un aceite amarillo. Después este se disolvió en acetonitrilo (5 ml) y se trató con DIPEA (0,38 ml, 2,15 mmol) seguido de 5-bromo-1,3,4-tiadiazol-2-ilamina (130 mg, 0,72 mmol) y después se calentó hasta 80 °C por 3 h. La mezcla de reacción se evaporó y se purificó por FCC (SiO_2, 0-10 % de NH_3 2M en MeOH en DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para producir *N*2-[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (100 mg, 50 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 25 °C) δ 1,99 - 2,05 (1H, m), 2,18 - 2,31 (4H, m), 3,38 - 3,58 (3H, m), 3,67 - 3,71 (1H, m), 4,19 - 4,30 (1H, m), 6,31 (2H, s), 6,70 (1H, s), 7,09 (1H, d), 8,36 (1H, s). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 278.

Producto intermedio 8

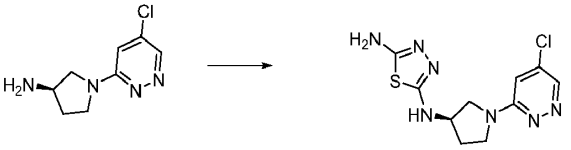
terc-butil (3*R*)-3-[(6-cloropiridazin-3-il)amino]pirrolidina-1-carboxilato



Se disolvió *terc*-butil *N*-[(3*R*)-pirrolidin-3-il]carbamato (250 mg, 1,34 mmol) en 1-butanol (2 ml) y se trató con 3-cloro-5-metilpiridazina (0,25 M en DCM, 2,68 ml, 1,34 mmol) seguido de DIPEA (0,48 ml, 2,68 mmol). La mezcla se calentó hasta 140 °C por 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta r.t. se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo dos veces en DCM (10 ml). El solvente se evaporó y el residuo se purificó por FCC (SiO_2, 0 - 10 % de metanol en DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para producir *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato (200 mg, 53 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 25 °C) δ 1,40 (9H, s), 1,85-1,93 (1H, m), 2,07 - 2,18 (1H, m), 2,20 (3H, s), 3,24 - 3,28 (1H, m), 3,38 - 3,48 (1H, m), 3,48 - 3,59 (1H, m), 3,60 - 3,65 (1H, m), 4,10 - 4,15 (1H, m), 6,67 (1H, s), 7,24 (1H, d), 8,35 (1H, d). *m*/*z*: ES^+ $[M+H]^+$ 279.

Producto intermedio 9

*N*2-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina

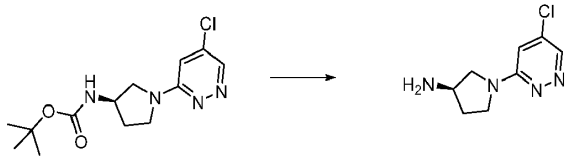


Se disolvió (3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina (Producto intermedio 10, 50 mg, 0,25 mmol) en acetonitrilo (5 ml) y se trató con DIPEA (0,07 ml, 0,38 mmol) seguido de 5-bromo-1,3,4-tiadiazol-2-ilamina (50 mg, 0,25 mmol) y se calentó hasta 80 °C por 3 h. Después la mezcla de reacción se evaporó y se purificó por FCC (SiO_2, 0-10 % de NH_3 2M

en MeOH en DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para producir *N*2-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina que se usó directamente en la siguiente etapa (50 mg, 66 %). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$298, 300.

Producto intermedio 10

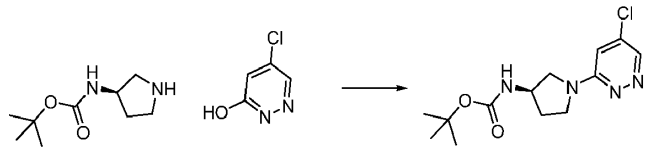
(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina



Se disolvió *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato (Producto intermedio 11, 77 mg, 0,25 mmol) en DCM (1 ml), se trató con TFA (1 ml), y se dejó a agitar a r.t. por 2 h. Después se evaporó hasta la sequedad y se pasó por un cartucho SCX se lavó con metanol y se eluyó con amoniaco metanólico 2M. La fracción básica se evaporó para producir (3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-amina, que se usó directamente en la siguiente etapa (50 mg, 99 %). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 199, 201.

Producto intermedio 11

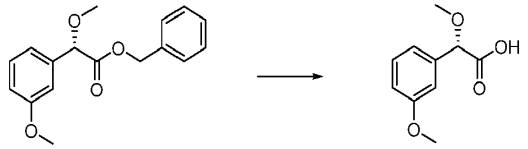
terc-butil *N*-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato



Se disolvió 5-cloropiridazin-3-ol (0,2 g, 1,53 mmol) en DCM (2 ml) y trietilamina (0,47 ml, 3,37 mmol) y se enfrió hasta -20 °C. Después se trató, gota a gota, con anhídrido trifluorometanosulfónico (1 M en DCM, 3,22 ml, 3,22 mmol). Después se permitió que la mezcla de reacción retornara lentamente hasta la temperatura ambiente. Se inactivó mediante la adición de agua (10 ml) y se extrajo en DCM (10 ml). Los orgánicos se lavaron con HCl 1 M (10 ml) se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron para producir (5-cloropiridazin-3-il)trifluorometanosulfonato. Después este se disolvió en DMF (2 ml) y se enfrió a 0 °C antes de tratarse con trietilamina (0,21 ml, 1,53 mmol) y *terc*-butil *N*-[(3*R*)-pirrolidin-3-il]carbamato (290 mg, 1,53 mmol). Después se dejó volver a temperatura ambiente, se diluyó con agua (20 ml) y se extrajo en DCM (20 ml). Los orgánicos se evaporaron y purificaron por FCC (SiO_2, 0 - 10 % de MeOH en DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para producir *terc*-butil *N*-[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]carbamato, (77 mg, 17 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 25 °C) δ 1,40 (9H, s), 1,84 - 1,99 (1H, m), 2,05 - 2,20 (1H, m), 3,32 - 3,34 (1H, m), 3,42 - 3,60 (2H, m), 3,60 - 3,73 (1H, m), 4,00 - 4,28 (1H, m), 7,08 (1H, d), 7,26 (1H, d), 8,55 (1H, d). *m*/*z*: ES$^+$ [M+H]$^+$ 299, 301.

Producto intermedio 12

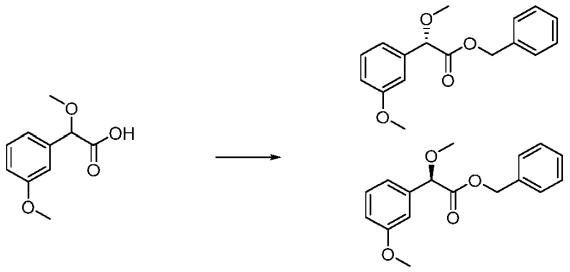
Ácido (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético



Bencil (2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetato (Producto intermedio 13(a), 7,85 g, 27,42 mmol) y 10 % de Pd en C (1 g, 27,42 mmol) en etanol (250 ml) se agitaron bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente por 4 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de celita que se lavó con MeOH. Los orgánicos se evaporaron para producir ácido (2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético como un aceite transparente (6,0 g, 112 %, contiene algo de MeOH). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 3,29 (3H, s), 3,74 (3H, s), 4,72 (1H, s), 6,77 - 7,06 (3H, m), 7,28 (1H, t), 12,77 (1H, s).

Producto intermedio 13(a)

Bencil (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetato



Se adicionó bromuro de bencilo (7,81 ml, 65,75 mmol) gota a gota al ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético (Producto intermedio 14, 10,75 g, 54,79 mmol), carbonato de potasio (11,36 g, 82,19 mmol) en DMF (200 ml) a 21 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 85 ºC durante 4 horas y después se dejó en agitación a temperatura ambiente durante el fin de semana. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (600 ml), y se lavó dos veces con agua (200 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó para proporcionar un producto bruto que se purificó por FCC (SiO_2 10 - 25 % de EtOAc en heptanos). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar un aceite incoloro. (10,5 g).

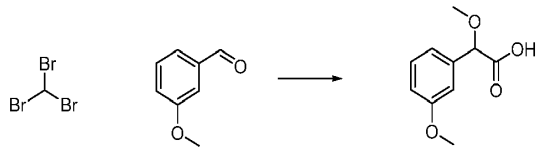
Se adicionó bromuro de bencilo (5,59 ml, 47,09 mmol) gota a gota al ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético (Producto intermedio 14, 7,7 g, 39,25 mmol), carbonato de potasio (8,14 g, 58,87 mmol) en DMF (150 ml) a 21 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 85 ºC por 4 horas, después se dejó en agitación a temperatura ambiente durante el fin de semana.

La reacción se calentó después a 85 °C por 4 horas más antes de enfriarse a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (500 ml), y se lavó dos veces con agua (200 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó por FCC (SiO_2 10 - 25 % de EtOAc en heptanos). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar un aceite amarillo pálido (6 g). El producto de las dos reacciones se combinó y los enantiómeros se separaron por HPLC quiral. (Columna Chiralpak OD, 20 µm, 100 mm x 250 mm, mediante el uso de una mezcla 95/5 de heptano:EtOH como eluyentes a 250 ml/min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar:

Primer isómero eluido Producto intermedio 13(a) bencil (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetato (7,86 g, 39 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 27 °C) δ 3,37 (3H, s), 3,78 (3H, s), 5,02 (1H, s), 5,20 (2H, s), 6,75 - 7,10 (3H, m), 7,20 - 7,52 (6H, m).
Segundo isómero eluido Producto intermedio 13(b) bencil (2*R*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetato (7,9 g, 39 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 27 °C) δ 3,37 (3H, s), 3,78 (3H, s), 5,02 (1H, s), 5,20 (2H, s), 6,75 - 7,10 (3H, m), 7,20 - 7,52 (6H, m).

Producto intermedio 14

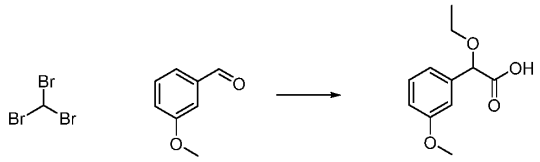
Ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético



Se adicionó una solución de hidróxido de potasio (2,267 g, 40,40 mmol) en MeOH (10 ml) durante 2 h en pequeñas porciones a una mezcla agitada de 3-metoxibenzaldehído (1 g, 7,34 mmol) y bromoformo (0,771 ml, 8,81 mmol) en MeOH (5,00 ml) a 0 °C. La mezcla después se dejó calentar hasta r.t. y se dejó agitar durante la noche. Los sólidos se filtraron bajo presión reducida, y se enjuagaron los sólidos con MeOH (15 ml). El filtrado se evaporó hasta una pasta blanca espesa y después se redisolvió en agua (50 ml). Después esta se lavó con Et_2O (50 ml) y después la porción acuosa se acidificó hasta pH 2 (~5 ml de solución de HCl 2 M). Después se extrajo la fase acuosa con EtOAc (3 x 50 ml). Los orgánicos combinados se secaron sobre $MgSO_4$ y se filtraron después los solventes se evaporaron bajo presión reducida para producir ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético como un aceite amarillo (1,4 g, 97 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, 30 °C) δ 3,18 (3H, s), 3,75 (3H, s), 4,74 (1H, s), 6,82-7,05 (3H, m), 7,29 (1H, m), 12,78 (1H, s).

Producto intermedio 15

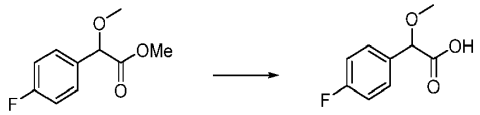
Ácido 2-etoxi-2-(3-metoxifenil)acético



A una mezcla agitada de 3-metoxibenzaldehído (5,0 g, 36,72 mmol) y bromoformo (3,85 ml, 44,06 mmol) en etanol (40 ml) a 0 °C se le adicionó gota a gota durante un período de 1 hora una solución de hidróxido de potasio (11,33 g, 201,98 mmol) en etanol (60 ml). Después de completar la adición la mezcla se dejó agitar a r.t. durante la noche. Se formó un precipitado que se eliminó por filtración, y el filtrado se evaporó para producir una pasta que se recolectó en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Después se acidificó la fase acuosa hasta pH = 2 con HCl 2 M y se extrajo con EtOAc (2 x 100ml). Los orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron para producir un aceite marrón pálido. Esto se absorbió sobre sílice y se purificó por FCC (SiO_2, 5 % de MeOH en DCM) para producir ácido 2-etoxi-2-(3-metoxifenil)acético (3,1 g, 40 %) como un aceite marrón pálido. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 21 °C) δ 1,28 (3H, t), 2,09 (1H, s), 3,64 - 3,52 (2H, m), 3,81 (3H, s) 4,86 (1H, s), 6,89 (1H, ddd), 6,99 (1H, m), 7,03 (1H, m), 7,29 (1H, t). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$ 209.

Producto intermedio 16

Ácido 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-acético

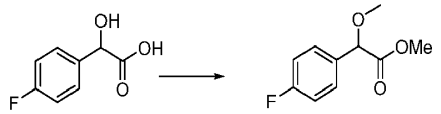


El 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-acetato de metilo (Producto intermedio 17, 1,32 g, 6,66 mmol) se disolvió en metanol (24 ml) y se agitó a r.t. Se adicionó una solución de hidróxido de potasio (0,45 g, 7,992 mmol) en metanol (12 ml), y la mezcla se agitó a r.t. por 5 h.

La mezcla se evaporó hasta la sequedad, se particionó entre agua y EtOAc (70 ml cada uno). El acuoso se lavó con EtOAc (70 ml) después se acidificó con ácido clorhídrico 2 N hasta pH 2. Después se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Los orgánicos se secaron ($MgSO_4$) y se evaporaron para producir ácido 2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-acético como una goma transparente (1,16 g, 94 %). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 3,42 (3H, s) 4,77 (1H, s), 7,10-7,04 (2H, m), 7,44-7,40 (2H, m).

Producto intermedio 17

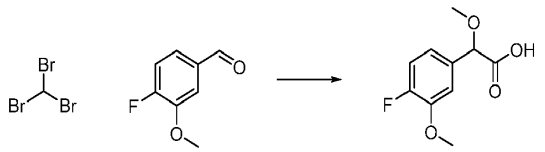
2-(4-fluorofenil)-2-metoxiacetato de metilo



Se disolvió carbonato de cesio (7,64 g, 23,45 mmol) en DMF (20 ml) a r.t. y se adicionó yodometano (2,4 ml, 38,55 mmol), seguido de ácido 2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacético (2,0 g, 11,75 mmol), y la mezcla se agitó por 48 h a r.t. La DMF se evaporó bajo presión reducida y el residuo se particionó entre EtOAc y agua (75 ml cada uno). Los orgánicos se lavaron con agua (75 ml), se secaron ($MgSO_4$), se evaporaron bajo presión reducida y se purificaron por FCC (SiO_2, 3:1 ciclohexano:EtOAc). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar metil 2-(4-fluorofenil)-2-metoxiacetato (1,68 g, 72 %) como un aceite incoloro. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 20 °C) δ 3,40 (3H, s), 3,72 (3H, s), 4,76 (1H, s), 7,09 - 7,03 (2H, m), 7,44 - 7,40 (2H, m).

Producto intermedio 18

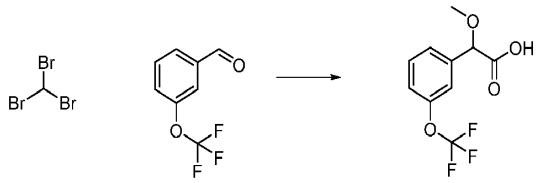
Ácido 2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-acético



A una mezcla agitada de 4-fluoro-3-metoxi-benzaldehído (1,0 g, 6,48 mmol) y bromoformo (0,68 ml, 7,785 mmol) en MeOH (10 ml) a 0 °C se adicionó, gota a gota por 1 h, una solución de hidróxido de potasio (2,0 g, 35,682 mmol) en MeOH (20 ml). Después de la adición la mezcla se agitó y se calentó hasta r.t. durante la noche. El precipitado resultante se eliminó por filtración. El filtrado se evaporó para producir una pasta que se recolectó en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). La fase acuosa se acidificó después hasta pH=2 con HCl 2N. Se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Los orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó adicionalmente por FCC (SiO_2, 0-5 % de MeOH en DCM) para producir ácido 2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-acético (0,66 g, 47 %) como un aceite incoloro. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 30 °C) δ 3,43 (3H, s), 3,90 (3H, s), 4,75 (1H, s), 6,95 - 7,00 (1H, m), 7,10 - 7,04 (2H, m). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$213.

Producto intermedio 19

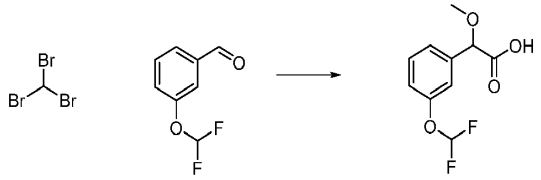
Ácido 2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético



Se adicionó una solución de hidróxido de potasio (1,851 g, 33,00 mmol) en MeOH (10 ml) por 2 h en pequeñas porciones a una mezcla agitada de 3-(trifluorometoxi)benzaldehído (1,141 g, 6 mmol) y bromoformo (0,630 ml, 7,20 mmol) en MeOH (5,00 ml) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar hasta r.t. y se dejó agitar durante la noche. Se formó un precipitado blanco en la mezcla de reacción. Los sólidos se filtraron bajo presión reducida y se enjuagó la torta del filtro con MeOH (15 ml). El filtrado se evaporó hasta una pasta blanca espesa y después se redisolvió en agua (50 ml). Después esta se lavó con Et_2O (50 ml). La fase acuosa se acidificó hasta pH = 2 (~5 ml de solución de HCl 2 M) y después se extrajo en EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida para producir un aceite transparente. El producto bruto se purificó por FCC (SiO_2, 10 - 50 % de EtOAc en heptanos). Las fracciones puras se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar ácido 2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (0,832 g, 55 %) como un aceite incoloro. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 30 °C) δ 3,47 (3H, s), 4,81 (1H, s), 7,20 - 7,24 (1H, m), 7,33 (1H, s), 7,37 - 7,46 (2H, m). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$ 249.4.

Producto intermedio 20

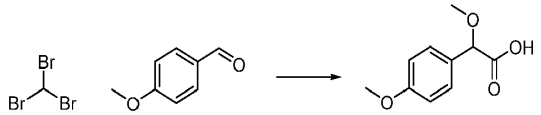
Ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-acético



A una mezcla agitada de 3-(difluorometoxi)benzaldehído (2,0 g, 11,61 mmol) y bromoformo (1,22 ml, 13,94 mmol) en MeOH (40 ml) a 0 °C se adicionó gota a gota por un período de 1 hora una solución de hidróxido de potasio (3,59 g, 63,90 mmol) en MeOH (60 ml). Después de la adición la mezcla se dejó agitar mientras se calentaba hasta temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se eliminó por filtración y el filtrado se evaporó para producir una pasta que se recolectó en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 75 ml). Después la fase acuosa se acidificó hasta pH = 1 con HCl 2M y se extrajo con EtOAc (2 x 75 ml). Los orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtraron, y se evaporaron para producir un aceite marrón pálido. Este se purificó por FCC (SiO_2, 95:5 ciclohexano:EtOAc + 0,1 % de ácido fórmico con aumento a 8:2 EtOAc:ciclohexano + 0,1 % de ácido fórmico). Las fracciones apropiadas se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-acético como un aceite incoloro (1,3 g 48 %). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 21 °C) δ 3,46 (3H, s), 4,80 (1H, s), 6,53 (1H, t), 7,10 - 7,15 (1H, m), 7,22 - 7,23 (1H, m), 7,29 - 7,32 (1H, m), 7,39 (1H, t). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$ 231.

Producto intermedio 21

Ácido 2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acético



A una mezcla agitada de p-anisaldehído (3,58 g, 26,29 mmol) y bromoformo (2,76 ml, 31,55 mmol) en MeOH (30 ml) a 0 °C se adicionó, gota a gota por 30 minutos, una solución de hidróxido de potasio (8,12 g, 144,65 mmol) en MeOH (60 ml). Después de la adición la mezcla se dejó agitar mientras se calentaba hasta r.t. durante la noche. A la mañana siguiente el precipitado se eliminó por filtración. El filtrado se evaporó para producir una pasta que se recolectó en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml) para eliminar cualquier aldehído de partida sin reaccionar restante. Después la fase acuosa se acidificó hasta pH = 2 con HCl 2N. Se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Los orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron para producir ácido 2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acético como una goma naranja (3,1 g, 60 %). ^{1}H NMR (400mHz, DMSO, 30 °C) 3,27 (3H, s), 3,75 (3H, s), 4,69 (1H, s), 6,93 (2H, d), 7,30 (2H, d), 12,45 (1H, brs). *m/z*: ES$^-$ [M-H]$^-$ 195.

Ensayos biológicos

Los siguientes ensayos se usaron para medir los efectos de los compuestos descritos en la presente descripción: a) ensayo de potencia enzimática de GLS; b) ensayo de potencia celular de GLS; c) Ensayo de proliferación celular con GLS. Durante la descripción de los ensayos, generalmente:

i. Las siguientes abreviaturas se usaron: CO_2 = dióxido de carbono; DMEM = medio águila modificada de Dulbecco; DMSO = dimetil sulfóxido; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético; EGTA = ácido etilenglicol tetraacético; FCS = suero fetal de ternera; h = hora(s); NBS = superficie no unidora; SDS = dodecil sulfato de sodio; TRIS = Tris(hidroximetil)aminometano.
ii. Los valores de IC_{50} se calcularon mediante el uso de un modelo de ajuste inteligente en Genedata. El valor de IC_{50} fue la concentración del compuesto de prueba que inhibió el 50 % de la actividad biológica.

Ensayo a): Ensayo de potencia enzimática de GLS

Se usó un ensayo acoplado Glutamato Oxidasa/AmplexRed para medir la capacidad de los compuestos para unirse e inhibir la actividad de GLS1 *in vitro.* La proteína GLS marcada con 6His (aminoácidos 63-669) expresada en E. Coli se purificó y se almacenó a -80 °C en alícuotas. La GLS1 se diluyó hasta la concentración de trabajo 2 x y se incubó a temperatura ambiente para permitir que las formas tetraméricas/diméricas alcanzaran el estado estacionario. Las mediciones del ensayo se realizaron en un tampón que comprende TRIS 50 mM pH 7,8, $NaPO_4$ 100 mM, pH 7,8, 0,001 % v/v de Tween20. La proteína GLS1 recombinante purificada se diluyó en tampón de ensayo hasta 12 nM y se incubó previamente a temperatura ambiente por 30 minutos. Los compuestos de prueba se prepararon por dilución en 100 % de DMSO para producir el intervalo de dosis correcto para una respuesta de concentración de 12 puntos y se dispensó un volumen apropiado (2,5-60 nl) en placas de microensayo de 384 pocillos (código de producto Greiner 784900) mediante el uso de un dispensador acústico Labcyte Echo 555. La concentración de DMSO se mantuvo al 2 % mediante el rellenado de nuevo con solución de DMSO. Después se dispensaron 3 µL de proteína GLS1 diluida (12 nM) en cada pocillo mediante el uso de un dispensador automático BioRaptr (Beckman-Coulter) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionaron 3 µl de glutamina 100 mM diluida en tampón de ensayo y la reacción se incubó a temperatura ambiente por 60 minutos. Después se detuvo la reacción mediante la adición de 6-(2-bromoetinil)-2,3-dimetil-quinazolin-4-ona 45 µM, rojo Amplex 75 µM, 0,375 unidades/ml de peroxidasa de rábano picante, 0,12 unidades/ml de glutamato oxidasa en TRIS pH 7,5 100 mM. Después de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, las placas se leyeron en un Perkin Elmer EnVision mediante el uso de filtros ópticos de 535/590nm y los datos sin procesar se analizaron mediante el uso de Genedata para generar los valores de IC_{50}. Una versión artefacto del ensayo donde la proteína GLS marcada con 6His y la glutamina se reemplazaron con tampón de ensayo se usó, además, para descartar efectos no específicos sobre los componentes del ensayo.

Ensayo b): Ensayo de potencia celular de GLS

Se evaluó el potencial de los compuestos para inhibir la actividad celular de GLS mediante el uso de un ensayo acoplado con PC3 que mide el agotamiento de glutamato celular. Los compuestos de prueba se prepararon por dilución en 100 % de DMSO para producir el intervalo de dosis correcto para una respuesta de concentración de 12 puntos y se dispensó un volumen apropiado (5-120 nl) en placas de microensayo de 384 pocillos (código de producto Corning 3712) mediante el uso de un dispensador acústico Labcyte Echo 555. La concentración de DMSO se mantuvo al 0,3 % mediante el rellenado de nuevo con solución de DMSO. Las células PC3 se cultivaron en DMEM libre de fenol, 10 % de FCS dializado, glutamina 2 mM y después de la dispersión por tripsinización se colocaron en placas a 5,6 x 10^3 células por pocillo en 40 µl de medio de crecimiento directamente en las placas de ensayo de 384 pocillos que contienen el compuesto dispensado. Después de la incubación por 6 h a 37 °C, 5 % de CO_2 se aspiró el medio de crecimiento y las células se lisaron en 15 µl de tampón que contenía TRIS 10 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, $Na_4P_2O_7$ 20 mM, Na_3VO_4 2 mM, 1 % de Tritón X-100, 10 % de glicerol, 0,1 % de SDS y 0,5 % de desoxicolato. Después se transfirieron 4 µl de lisado celular a una placa NBS de 384 pocillos (código de producto Corning 3575) y se adicionaron 35 µl de Amplex Red 27,5 µM, 0,1375 U/ml de peroxidasa de rábano picante, 0,044 U/ml de glutamato oxidasa, TRIS pH 7,5 100 mM. Después de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, las placas se leyeron en un Perkin Elmer EnVision mediante el uso de filtros ópticos de 535/590nm y los datos brutos se analizaron mediante el uso de un software patentado para generar los valores de IC_{50}.

Ensayo c): Ensayo de proliferación celular con GLS

La capacidad de los compuestos para inhibir el crecimiento celular se midió mediante el uso de un ensayo de proliferación celular NCI-H1703 en placa de 384 pocillos. Las células NCI-H1703 se cultivaron en RPMI1640 libre de rojo fenol, 10 % de FCS y glutamina 2 mM y se sembraron a una densidad de 750 células por pocillo en 40 µl de medio de crecimiento en placas de ensayo de 384 pocillos de fondo transparente (código de producto Corning 3712) y se incubaron por 24 h a 37 °C, 5 % de CO_2. Los compuestos de prueba se prepararon por dilución en 100 % de DMSO para producir el intervalo de dosis correcto para una respuesta de concentración de 12 puntos y se dispensó un volumen apropiado (5-120 nl) directamente en las placas de ensayo que contenían células en placa. La concentración de DMSO se mantuvo al 0,3 % mediante el rellenado de nuevo con solución de DMSO. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C, 5 % de CO_2, se adicionaron Sytox Green y Saponin a una concentración final de 2 µM y 0,25 % respectivamente y se incubaron por 6 h antes del análisis. Las placas se leyeron en un Acumen eX3 (TTP Labtech) mediante el uso de excitación de 488 nm y un conjunto de filtros FITC (500-530 nm) para la emisión. Los valores de IC_{50} se calcularon mediante el ajuste de la curva a la inhibición máxima del crecimiento del día cero mediante el uso del análisis en el software GeneData.

Los resultados de los ensayos a) - c) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos del ensayo

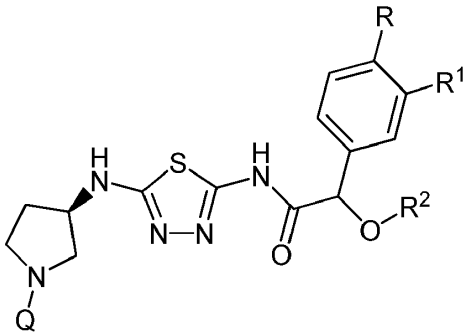
	Ensayo a)	Ensayo b)	Ensayo c)
Ejemplo	IC_{50} de enz. (µM)	IC_{50} media de MOA para actividad celular de GLS (µM)	IC_{50} de proliferación (µM)
1(a)	0,0554	0,000566	0,00459
1(b)	0,406	0,137	0,454
2	0,0303	0,000965	0,0167
3	0,0388	0,000384	0,00362
4(a)	0,0792	0,000457	0,00664
4(b)	0,29	0,0431	0,389
5(a)	0,155	0,00278	0,0441
5(b)	0,975	-	1,02
6(a)	0,0827	-	0,0209
6(b)	2,53	0,0736	0,926
7(a)	0,0952	0,000556	0,00308
7(b)	0,334	0,0127	0,0256
8(a)	0,0994	0,0013	0,00548
8(b)	0,643	0,0221	0,117
9(a)	0,0227	0,00056	0,00309
9(b)	0,0989	0,0185	0,469
10(a)	0,0311	0,00105	1,21
10(b)	0,241	0,0179	0,204
11(a)	0,0159	-	0,0544
11(b)	0,0848	0,0105	0,129
12	0,0353	0,000451	0,00307
13	0,0592	0,000658	0,00848
14	0,0443	0,00104	0,0227
15	0,277	0,0348	0,567
16	0,0809	0,00274	0,055
17	0,0243	0,000251	0,00174
18	0,0653	0,00491	0,0168
19	0,0557	0,0047	0,0719
20	0,323	0,0795	1,27
21	0,223	0,0537	0,93

(continuación)

Ejemplo	Ensayo a) IC_{50} de enz. (μM)	Ensayo b) IC_{50} media de MOA para actividad celular de GLS (μM)	Ensayo c) IC_{50} de proliferación (μM)
22	0,0189	0,00245	0,0369
23	0,265	0,197	0,106
24	0,0713	0,00101	0,0116
25	1,09	0,0632	0,686
26	0,0948	0,00212	0,0219
27	2,38	0,0722	1,22
28	0,096	0,00357	0,0732
29	1,28	-	0,586
30	0,119	0,00529	0,0437
31	0,0592	0,000658	0,00848
32	0,0353	0,000451	0,00307
33(a)	0,148	0,0192	0,0189
33(b)	0,0799	0,00235	0,0379

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:
Q es 5-metilpiridazin-3-ilo, 5-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R es hidrógeno, fluoro, o metoxi;
R^1 es hidrógeno, metoxi, difluorometoxi, o trifluorometoxi; y
R^2 es metilo o etilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde Q es 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-fluoropiridazin-3-ilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R es hidrógeno o fluoro.

4. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R es hidrógeno.

5. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^1 es metoxi, difluorometoxi, o trifluorometoxi.

6. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^2 es metilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:
(2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-fenil-acetamida;
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetamida;
(2*S*)-2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2S)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
N-[5-[[(3*R*)-1-(5-cloropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(4-metoxifenil)acetamida;
(2*S*)-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida; y
(2*S*)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida.

8. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:
(2*S*)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acetamida;
(2*S*)-2-etoxi-2-(3-metoxifenil)-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2*S*)-2-(4-fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
(2*S*)-2-(4-fluorofenil)-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(5-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
(2*S*)-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[5-[[(3*R*)-1-(6-metilpiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida; y
(2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-metoxi-acetamida.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación de la 1 a la 8, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

10. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación de la 1 a la 8, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en terapia.

11. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 para el tratamiento del cáncer.

12. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer renal, o cáncer hepatocelular.