

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 449**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2017 PCT/CN2017/087546**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17215506**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2017 E 17812617 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3470409**

54 Título: **Compuesto de alfa y beta-amida insaturada derivado de benzotriazol usado como inhibidor de TGF-betaRI**

30 Prioridad:

13.06.2016 CN 201610410554

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

16.10.2020

73 Titular/es:

**GENFLEET THERAPEUTICS (SHANGHAI) INC.
(100.0%)
1000 Zhangheng Road, Suite 63
Pudong New Area Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**SUN, FEI;
WU, LIFANG;
DING, CHARLES Z.;
HU, GUOPING;
LI, JIAN;
CHEN, SHUHUI y
LU, JIANYU**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 787 449 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

Compuesto de alfa y beta-amida insaturada derivado de benzotriazol usado como inhibidor de TGF-betaRI

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto de α y β -amida insaturada derivado de benzotriazol usado como inhibidor de TGF- β RI, y se refiere particularmente a un compuesto representado por la fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Técnicas anteriores

10 El factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) es una citocina multifuncional que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante con una amplia gama de actividades biológicas involucradas en el desarrollo embrionario inicial, formación de cartílago y hueso, síntesis de matriz extracelular, inflamación, fibrosis intersticial, regulación de las funciones inmunitaria y endocrina, formación y desarrollo tumoral.

15 La superfamilia TGF- β consiste en una clase de factores de crecimiento de polipéptidos cuya estructura y función están correlacionadas, incluidos los TGF- β (es decir, TGF- β estrechamente definido), activinas, inhibinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMP), a saber, Mullerian, etc., y TGF- β es uno de los eslabones importantes de esta familia. En mamíferos, el TGF- β existe principalmente en tres formas de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, que se encuentran en diferentes cromosomas. Entre ellos, el TGF- β 1 representa la mayor proporción (> 90%) en las células somáticas, y es el más activo, el más versátil y el más ampliamente distribuido. El TGF- β recién sintetizado aparece como un precursor inactivo, que consiste en un péptido señal, un polipéptido asociado latente (LAP) y un TGF- β maduro. Después de la hidrólisis enzimática, forma TGF- β activo y luego se une al receptor para ejercer efectos biológicos.

20 Las señales son transducidas por las moléculas de señal de TGF- β a través de un complejo receptor transmembrana. El receptor de TGF- β es una proteína transmembrana presente en la superficie celular y se divide en receptor de tipo I (TGF- β RI), receptor de tipo II (TGF- β RII) y receptor de tipo III (TGF- β RIII), de los cuales TGF- β RI es conocida también como quinasa 5 pseudo-receptor de activina (ALK5). TGF- β RIII carece de actividad intrínseca, y la falta está relacionada principalmente con el almacenamiento de TGF- β . TGF- β RI y TGF- β RII pertenecen a la familia de serina/treonina cinasa. Los receptores de tipo II se unen a los ligandos de TGF- β con mayor afinidad y forman complejos de receptores heterólogos con receptores de tipo I. La fosforilación de una región rica en glicina y serina (dominio GS) en la membrana proximal de los receptores de tipo I inicia reacciones en cascada de señal intracelular.

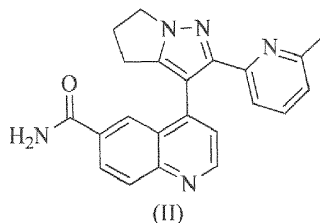
30 Smads es una importante molécula de transducción y regulación de la señal de TGF- β en las células que puede transferir directamente la señal de TGF- β al núcleo desde la membrana celular. Por lo tanto, la vía de señalización de TGF- β /Smads desempeña un papel importante en la aparición y desarrollo de tumores. En la transducción de señales de TGF- β /Smads, el TGF- β activado se une en primer lugar a TGF- β RII en la superficie de la membrana celular para formar un complejo heterodimérico, y TGF- β RI reconoce y se une al complejo binario.

35 TGF- β RII fosforila serina/treonina en el dominio GS del dominio citoplasmático de TGF- β RI para activar TGF- β RI. Luego, el TGF- β RI activado fosforila aún más la proteína R-Smads (Smad2/Smad3), y este último se une a Co-Smad (Smad4) para formar un complejo heterotrimérico que ingresa al núcleo y actúa sinérgicamente con otros coactivadores y co-inhibidores para regular la transcripción de genes diana. Cualquier cambio en la vía de señalización de TGF-beta/Smads puede conducir a anomalías en la vía de transducción de señales.

40 La investigación actual indica que, en las células tumorales, TGF- β puede afectar directamente el crecimiento tumoral (efectos no intrínsecos de la señal de TGF- β), o indirectamente afecta al crecimiento tumoral (efectos intrínsecos de TGF- β) al inducir la transformación epitelial-mesenquimatosa, bloqueando respuestas-inmunitarias antitumorales, aumentando la fibrosis asociada al tumor y la angiogenia mejorada. Al mismo tiempo, el TGF- β tiene una fuerte inducción fibrótica, que es un activador de los fibroblastos asociados a tumores. Estos fibroblastos son una fuente importante de colágeno tipo I y otros factores fibróticos. Los productos de inducción de fibroblastos y otros factores fibróticos pueden continuar desarrollando un microambiente que puede reducir las respuestas inmunitarias, aumenta la resistencia a los medicamentos y potencia la angiogenia tumoral. Además, el TGF- β afecta la angiogenia tanto durante la ontogenia como el crecimiento tumoral. Por ejemplo, los embriones de ratón con deficiencia de TGF- β RI muestran defectos graves de desarrollo vascular, lo que demuestra que la vía de señalización de TGF- β es un regulador clave en el desarrollo del endotelio vascular y las células musculares lisas.

50 En 2013, la FDA reconoció el inhibidor de TGF- β RI de pequeña molécula de Lilly LY2157299 (WO 2002/094833) para el tratamiento del glioma y el cáncer de hígado. LY2157299 es un medicamento sin interés comercial poco estudiado, llamada Galunisertib. Galunisertib inhibe la invasión de las células tumorales y la metástasis al tiempo que inhibe la infiltración de células tumorales en los vasos sanguíneos. En el ensayo clínico en fase 2 de pacientes con cáncer de hígado, aproximadamente el 23% de los pacientes tratados con Galunisertib tuvieron una disminución en la concentración de alfafetoproteína (AFP) en suero de más del 20%. Estos pacientes tuvieron una evolución tumoral más lenta y una supervivencia más larga que los que no tuvieron respuesta a AFP, y también se observó en estos pacientes una mayor expresión de cadherina en las células epiteliales, lo que sugiere que Galunisertib puede regular la EMT al inhibir la vía de señalización de TGF- β , inhibiendo así la evolución de cáncer de hígado.

La estructura de Galunisertib (LY2157299) se muestra como fórmula (II):

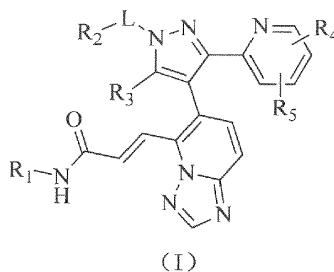


Referencias básicas:

WO 2009/009059; WO 2007/076127; WO 2004/026306; WO 2004/072033; WO 2002/094833.

5 Contenido de la presente invención

La presente invención proporciona un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde,

10 R₁ se selecciona entre hidrógeno, hidroxilo, amino o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₃ y cicloalquilo C₃₋₆, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, cicloalquilo C₃₋₆ y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

R₃ se selecciona entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃ que está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

15 opcionalmente, R₂ y R₃ se unen para formar un anillo de 5-6 eslabones, que está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

cada uno de R₄ y R₅ se selecciona independientemente entre hidrógeno, halógeno o se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₃ y heteroalquilo C₁₋₃, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R';

L se selecciona entre un enlace sencillo, -(CRR)₁₋₃-;

20 R se selecciona entre F, Cl, Br, I, CN, OH, NH₂, COOH o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo de 3 a 6 eslabones, fenilo y heteroarilo de 5 a 6 eslabones, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R';

R' se selecciona entre F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, COOH, Me, Et, CF₃, CHF₂, CH₂F, NHCH₃, N(CH₃)₂;


25 "hetero" se refiere a un heteroátomo o un grupo heteroatómico seleccionado entre el grupo que consiste en -C(=O)N(R)-, -N(R)-, -C(=NR)-, -S(=O)₂N(R)-, -S(=O)N(R)-, -O-, -S-, =O, =S, -O-N-, -C(=O)O-, -C(=O)-, -C(=S)-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -N(R)C(=O)N(R)-;



en cualquiera de los casos anteriores, el número del heteroátomo o el grupo heteroatómico se selecciona independientemente de 1, 2 o 3.

En algunas realizaciones de la presente invención, R se selecciona entre F, Cl, Br, I, CN, OH, o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R'.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, R se selecciona entre el grupo que consiste en F, Cl, Br, I, CN, OH, metilo, CHF₂, etilo, propilo, ciclopropilo y fenilo.

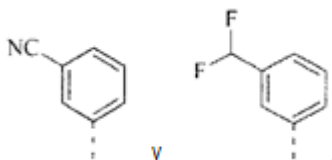
En algunas realizaciones de la presente invención, R₁ se selecciona entre hidrógeno, o entre el grupo

que consiste en metilo, etilo,  y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R (s).

En algunas realizaciones de la presente invención, R₁ se selecciona entre hidrógeno, metilo, etilo,  y .

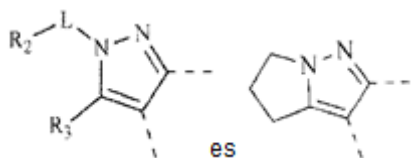
En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo,

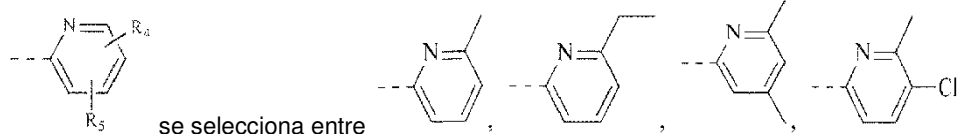


etilo, isopropilo, ciclopentilo

En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ y R₃ se unen, y el resto



10 En algunas realizaciones de la presente invención, cada uno de R₄ y R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, F, Cl, Br, metilo y etilo. En algunas realizaciones de la presente invención, el resto






En algunas realizaciones de la presente invención, L se selecciona entre un enlace sencillo, -(CH₂)₁₋₃-.

En algunas realizaciones de la presente invención, L se selecciona entre un enlace sencillo, -CH₂-, -CH₂CH₂-.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, R se selecciona entre F, Cl, Br, I, CN, OH, o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R', y otras variables se definen como anteriormente.

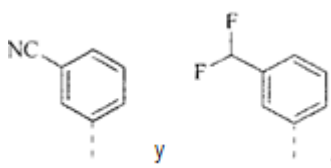
En algunas realizaciones de la presente invención, R se selecciona entre F, Cl, Br, I, CN, OH, metilo, CHF₂, etilo, propilo, ciclopropilo y fenilo, y otras variables se definen como anteriormente.

20 En algunas realizaciones de la presente invención, R₁ se selecciona entre hidrógeno, o entre el grupo que consiste en metilo, etilo,  y el grupo está opcionalmente sustituido por 1, 2 o 3 R, y otras variables se definen como anteriormente.

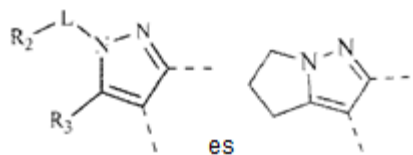
En algunas realizaciones de la presente invención, R₁ se selecciona entre hidrógeno, metilo, etilo,  y , y otras variables se definen como anteriormente.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R, y otras variables se definen como anteriormente.

En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ se selecciona entre el grupo que consiste

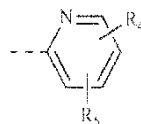


en metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo, anteriormente.



En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ y R₃ se unen, y el resto y otras variables se definen como anteriormente.

- 5 En algunas realizaciones de la presente invención, cada uno de R₄ y R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, F, Cl, Br, metilo y etilo, y otras variables se definen como anteriormente.

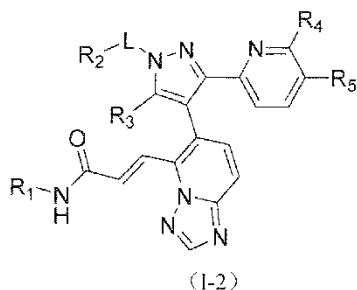
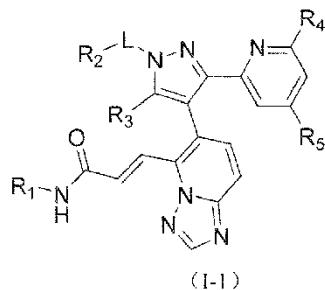


En algunas realizaciones de la presente invención, el resto se selecciona entre y otras variables se definen como anteriormente.

- 10 En algunas realizaciones de la presente invención, L se selecciona entre un enlace sencillo, -(CH₂)₁₋₃, y otras variables se definen como anteriormente.

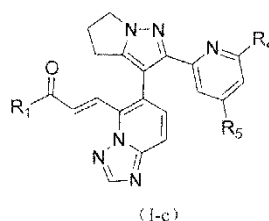
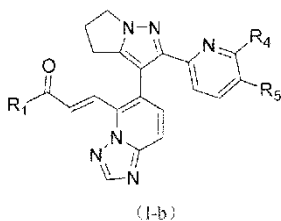
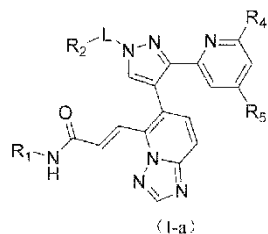
En algunas realizaciones de la presente invención, L se selecciona entre un enlace sencillo, -CH₂-, -CH₂CH₂-, y otras variables se definen como anteriormente.

En algunas realizaciones de la presente invención, el compuesto se selecciona entre



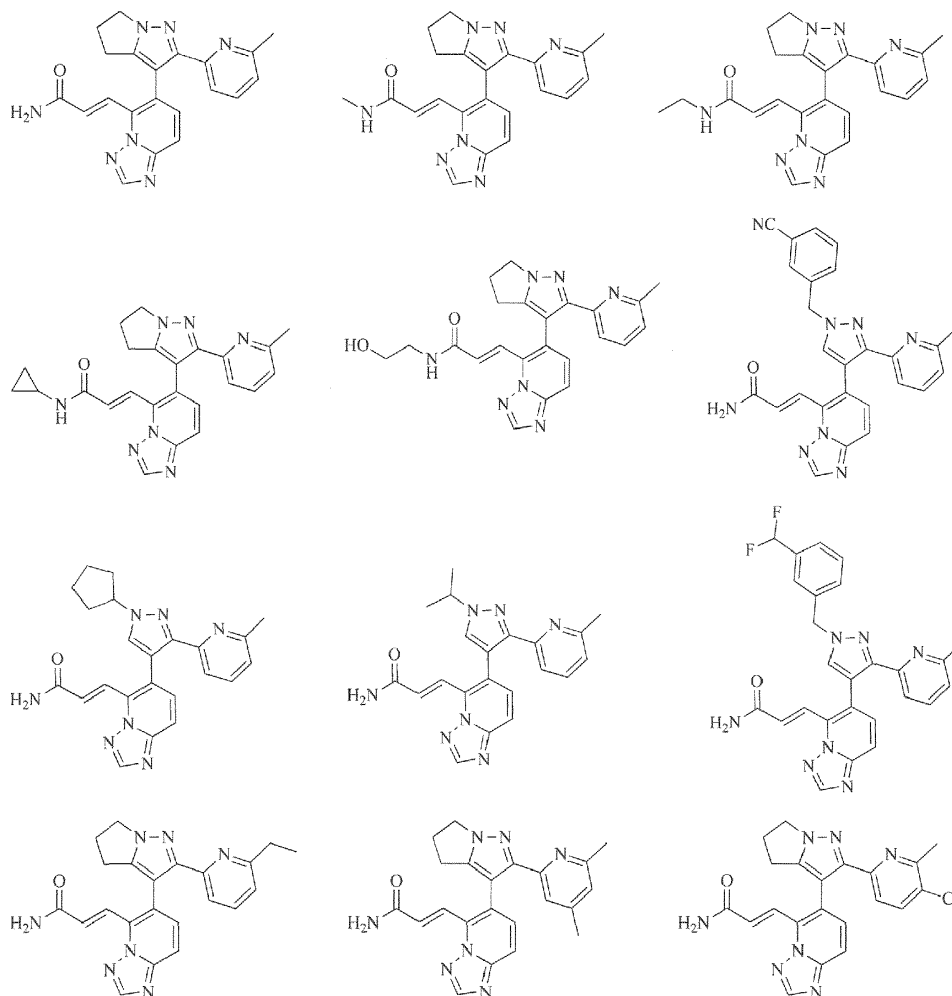
- 15 en donde, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, y L se definen como anteriormente, y R₄ y R₅ no son ambos hidrógeno simultáneamente.

En algunas realizaciones de la presente invención, el compuesto se selecciona entre



en donde, R₁, R₂, R₄, R₅, y L se definen como anteriormente, y R₄ y R₅ no son ambos hidrógeno simultáneamente.

- 20 La presente invención también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se selecciona entre el grupo que consiste en



5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un uso del compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables o la composición farmacéutica en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En algunas realizaciones de la presente invención, el cáncer se refiere al cáncer de mama.

10 Otras realizaciones de la presente invención proceden de la combinación aleatoria de las variables anteriores.

Efecto técnico

El uso del compuesto de la presente invención es principalmente como inhibidor de TGF-beta R1, que bloquea la ruta de señalización aguas abajo de TGF-beta inhibiendo TGF-beta R1, ejerciendo así una acción farmacológica deseada. A diferencia de la técnica anterior, la estructura de benzotriazol del compuesto de la presente invención es un farmacóforo importante que se une a TGF-beta R1. Inesperadamente, la combinación de las estructuras químicas de los compuestos de la presente invención da como resultado una actividad biológica superior a la técnica anterior. A la misma dosis, en el modelo CT-26 Syngeneic de ratones, el efecto de supresión tumoral del compuesto de la presente invención usado solo y en combinación con PDL-1 fueron ambos superiores al de la técnica anterior, poniendo de manifiesto que el compuesto del presente la invención tiene una activación inmunitaria antitumoral superior; en el modelo de cáncer de mama antimetastásico de trasplante ortotópico 4T1 de ratón, el compuesto de la presente invención tiene una capacidad antimetastásica significativamente superior en comparación con la técnica anterior. El compuesto de la presente invención tiene un efecto inhibitor obvio sobre la metástasis y la intensidad de metástasis del tumor en órganos de múltiples tejidos, lo que indica su gran potencial como fármaco terapéutico. El compuesto de la presente invención es muy prometedor como inhibidor de metástasis del cáncer de mama, y desempeña un papel importante en la inhibición de metástasis en el tratamiento combinado del cáncer de mama, y proporciona una nueva estrategia terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer de mama clínico.

Definición y descripción

A menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos y frases utilizados en la presente memoria tienen el siguiente significado. Un término o frase concreta no debe considerarse indefinido o poco claro cuando no se define específicamente, sino que debe entenderse en el sentido ordinario. Cuando aparece un nombre comercial en la presente memoria, se pretende hacer referencia a su artículo correspondiente o al principio activo del mismo. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, correspondientes con una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de los compuestos de la presente invención que se preparan a partir de los compuestos que tienen determinados sustituyentes de la presente invención y ácidos o bases relativamente atóxicos. Cuando los compuestos de la presente invención contienen grupos funcionales relativamente ácidos, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma de neutralidad de dichos compuestos con una cantidad suficiente de una base en solución pura o en un disolvente inerte adecuado. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amoniaco orgánico o magnesio o sales similares. Cuando los compuestos de la presente invención contienen grupos funcionales relativamente básicos, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma de neutralidad de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido en solución pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácido inorgánico incluidos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido carbónico, bicarbonato, ácido fosfórico, fosfato dibásico, fosfato monobásico, ácido sulfúrico, bisulfato, ácido yodhídrico, ácido fosforoso y similares; y sales de ácidos orgánicos incluidos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido maleico, ácido malónico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido subérico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido ftálico, ácido bencensulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido metansulfónico y similares; también incluye sales de aminoácidos (p. ej., arginina, etc.) así como sales de ácidos orgánicos como el ácido glucurónico (véase Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science* 66: 1-19 (1977)). Algunos compuestos específicos de la presente invención contienen grupos funcionales básicos y ácidos de manera que pueden convertirse en cualquier base o sal de adición de ácido.

Preferiblemente, la sal se pone en contacto con una base o ácido de una manera convencional y el compuesto original se aísla, regenerando así la forma de neutralidad del compuesto. La forma original de un compuesto difiere de sus diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, como la solubilidad en disolventes polares.

Como se emplea en la presente memoria, las "sales farmacéuticamente aceptables" pertenecen a derivados de los compuestos de la presente invención, en donde el compuesto original se modifica por la formación de sal con un ácido o por la formación de sal con una base. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros a: sales de ácidos inorgánicos u orgánicos de radicales básicos tales como aminas, sales inorgánicas u orgánicas de radicales ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales atóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original, tales como las sales formadas por ácidos inorgánicos u orgánicos atóxicos. Las sales atóxicas convencionales incluyen, entre otras, sales derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos que se seleccionan entre el grupo que consiste en ácido 2-acetoxibenzoico, ácido 2-hidroxietilsulfónico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido benzosulfónico, ácido benzoico, bicarbonato, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido edético, ácido etandisulfónico, ácido etansulfónico, ácido fumárico, glucoheptonato, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, hidroyoduro, hidroxil, hidroxinaftilo, ácido isetiónico, ácido láctico, lactosa, ácido dodecilsulfónico, ácido maleico, ácido málico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido nítrico, ácido oxálico, ácido pamoico, ácido pantoténico, ácido fenilacético, ácido fosfórico, poligalactanaldehído, ácido propiónico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido acético, ácido succínico, ácido sulfámico, ácido sulfanílico, ácido sulfúrico, taninos, ácido tartárico y ácido p-toluensulfónico.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene radicales ácidos o radicales básicos por métodos químicos convencionales. En general, dichas sales se preparan por reacción de estos compuestos en forma de ácido o base libre con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o un disolvente orgánico o una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

Además de las formas salinas, los compuestos proporcionados en la presente memoria también existen en formas de profármacos. Los profármacos de los compuestos descritos en la presente memoria se alteran químicamente con facilidad en condiciones fisiológicas para convertirse en los compuestos de la invención. Además, los profármacos pueden convertirse en los compuestos de la presente invención por métodos químicos o bioquímicos en el entorno *in vivo*.

Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas o solvatadas, incluidas las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y ambas están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Determinados compuestos de la presente invención pueden tener átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces. Los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

5 La representación gráfica de compuestos puros racémicos, ambiscalémicos y escalémicos o enantioméricos en la presente memoria es de Maehr, J. Chem. Ed. 1985, 62: 114-120. A menos que se especifique lo contrario, la configuración absoluta de un estereocentro está representada por un enlace de cuña y un enlace discontinuo. Cuando los compuestos descritos en la presente memoria contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, incluyen isómeros geométricos *E*, *Z*, a menos que se especifique lo contrario. Asimismo, todas las formas tautoméricas están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

10 Los compuestos de la invención pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas específicas. La presente invención abarca todos estos compuestos, incluidos isómeros *cis* y *trans*, (-) -y (+) -enantiómeros de pares, (*R*) -y (*S*) -enantiómeros, diastereoisómeros, -isómero (*D*), -isómero (*L*), y las mezclas racémicas y otras mezclas de los mismos, tales como mezclas enriquecidas enantioméricas o diastereoméricas, todas las cuales están dentro del alcance de la presente invención. Pueden estar presentes átomos de carbono asimétricos adicionales en los sustituyentes tales como grupos alquilo. Todos estos isómeros y sus mezclas están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

20 Se pueden preparar isómeros (*R*) y (*S*) e isómeros *D* y *L* por síntesis quirál o reactivos quirales u otras técnicas convencionales. Si se desea un enantiómero de un determinado compuesto de la invención, se puede preparar por síntesis asimétrica o modificación con un auxiliar quirál, en donde la mezcla resultante de diastereómeros se separa y los grupos auxiliares se escinden para proporcionar enantiómeros deseados puros. Alternativamente, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico (como un grupo amino) o un grupo funcional ácido (como un grupo carboxilo), se forma una sal diastereomérica con un ácido o base ópticamente activo adecuado, y luego la resolución diastereomérica se realiza por métodos convencionales conocidos en la técnica, y luego se recupera el enantiómero puro. Además, la separación de enantiómeros y diastereómeros se logra generalmente mediante el empleo de cromatografía usando una fase estacionaria quirál y opcionalmente en combinación con modificación química (p. ej., formando carbaminato a partir de aminas).

25 Los compuestos de la presente invención pueden contener proporciones anormales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que comprenden el compuesto. Por ejemplo, los compuestos pueden marcarse con isótopos radiactivos como el tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I) o C-14 (¹⁴C). Las variantes de todas las composiciones isotópicas de los compuestos de la presente invención sean radiactivas o no, están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

30 La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier agente o medio portador capaz de administrar una cantidad eficaz de un agente activo de la presente invención sin interferir con la actividad biológica del agente activo y sin que tenga efectos secundarios tóxicos sobre el anfitrión o el paciente. Ejemplos de portadores incluyen agua, aceite, vegetales y minerales, bases de crema, bases de loción, bases de pomada, etc. Estas bases incluyen agentes de suspensión, agentes adherentes, potenciadores transdérmicos y similares. Sus formulaciones son bien conocidas por los expertos en el sector cosmético o en el sector de la medicina tópica. Para más información sobre portadores, se puede hacer referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2005)*, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia.

35 El término "excipiente" generalmente se refiere al portador, diluyente y/o medio requerido para formular una composición farmacéutica eficaz.

40 Para un fármaco o agente farmacológicamente activo, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de fármaco o agente que no es tóxico, pero puede lograr el efecto deseado. Para una forma farmacéutica oral en la presente invención, una "cantidad eficaz" de un sustancia activa en la composición se refiere a la cantidad necesaria para lograr el efecto deseado cuando se usa en combinación con otra sustancia activa en la composición. La determinación de la cantidad eficaz varía de una persona a otra, dependiendo de la edad y el estado general del receptor, y también de la sustancia activa específica, y un experto en la técnica puede determinar la cantidad eficaz apropiada en cada caso según la experimentación rutinaria.

45 Los términos "principio activo", "agente terapéutico", "sustancia activa" o "agente activo" se refieren a una entidad química que puede tratar eficazmente un trastorno, enfermedad o afección objetivo.

50 "Opcional" u "opcionalmente" significa que un episodio o situación descrita posteriormente puede ocurrir, pero no necesariamente, y la descripción incluye la incidencia del episodio o situación mencionada anteriormente y la ausencia del episodio o situación descrita en la presente memoria.

55 El término "sustituido" significa que uno cualquiera o más átomos de hidrógeno en un átomo particular se reemplazan por sustituyentes, incluidas las variantes de deuterio e hidrógeno, siempre que la valencia de un átomo determinado sea normal y el compuesto sustituido sea estable. Cuando el sustituyente es un grupo ceto (es decir, = O), significa que se sustituyen dos átomos de hidrógeno. La sustitución de cetonas no ocurre en grupos aromáticos. La expresión "opcionalmente sustituido" significa que puede o no sustituirse. A menos que se especifique lo contrario, el tipo y el

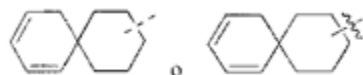
número de sustituyentes pueden ser arbitrarios partiendo de que puedan conseguirse químicamente.

Cuando cualquier variante (p. ej., R) aparece más de una vez en la composición o estructura de un compuesto, su definición en cada caso es independiente. Así, por ejemplo, si un grupo está sustituido por 0-2 R, el grupo puede opcionalmente sustituirse con hasta dos R, y R en cada caso tiene una opción independiente. Además, se permiten combinaciones de sustituyentes y/o variantes de los mismos solamente si dichas combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Cuando el número de un grupo de enlace es 0, como $-(CRR)_0-$, significa que el grupo de enlace es un enlace sencillo.

Cuando una de las variantes se selecciona de un enlace sencillo, significa que los dos grupos que conecta están directamente unidos. Por ejemplo, cuando L representa un enlace sencillo en A-L-Z, la estructura es en realidad A-Z.

- 10 Cuando un sustituyente está vacante, significa que el sustituyente no existe. Por ejemplo, cuando X está vacante en A-X, significa que la estructura es en realidad A. Cuando el enlace de un sustituyente se puede reticular a dos átomos en un anillo, el sustituyente se puede unir a cualquier átomo en el anillo. Cuando los sustituyentes mencionados no indican por qué átomo están unidos a un compuesto incluido en la fórmula general de la estructura química pero no se mencionan específicamente, dichos sustituyentes pueden unirse a través de cualquiera de sus átomos. Las combinaciones de sustituyentes y/o variantes de los mismos están permitidas solo si dichas combinaciones dan como resultado compuestos estables. Por ejemplo, una unidad de estructura



significa que puede estar sustituido en cualquier posición en el ciclohexileno o ciclohexadieno.

- 20 A menos que se especifique lo contrario, el término "hetero" indica un heteroátomo o un grupo con heteroátomo (es decir, un grupo de átomos que contiene heteroátomos), incluidos átomos distintos de carbono (C) e hidrógeno (H), y grupos de átomos que contienen estos heteroátomos, por ejemplo, incluidos oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), silicio (Si), germanio (Ge), aluminio (Al), boro (B), $-O-$, $-S-$, $=O$, $=S$, $-C(=O)O-$, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, y $-C(=O)N(H)-$, $-N(H)-$, $-C(=NH)-$, $-S(=O)_2N(H)-$ o $-S(=O)N(H)-$ opcionalmente sustituidos.

- 25 A menos que se especifique lo contrario, "anillo" se refiere a un cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalquino, arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido. El llamado anillo incluye un solo anillo, un anillo bicíclico, un anillo espiro, un sistema de anillos que tiene dos anillos que comparten un enlace, o un anillo en puente. El número de átomos en el anillo generalmente se define como el número de eslabones del anillo. Por ejemplo, un "anillo de 5-7 eslabones" se refiere a que 5 a 7 átomos están dispuestos en un círculo. A menos que se especifique lo contrario, el anillo contiene opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos. Por lo tanto, un "anillo de 5-7 eslabones" incluye, por ejemplo, fenilo, piridinilo y piperidinilo; en otro aspecto, la expresión "anillo de heterocicloalquilo de 5-7 eslabones" incluye piridinilo y piperidinilo, pero no incluye fenilo. El término "anillo" también incluye sistemas de anillo que contienen al menos un anillo, en el que cada "anillo" cumple independientemente la definición anterior.

- 35 A menos que se especifique lo contrario, el término "heterociclo" o "heterociclilo" significa anillos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos estables que contienen heteroátomos o grupos con heteroátomos, que pueden estar saturados, parcialmente insaturados o insaturados (aromáticos) y contienen átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 átomos heterocíclicos seleccionados independientemente de N, O y S, en donde cualquiera de los heterociclos anteriores puede fusionarse a un anillo de benceno para formar un anillo bicíclico. Los heteroátomos nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente (es decir, NO y $S(O)_p$, p es 1 o 2). El átomo de nitrógeno puede estar sustituido o no sustituido (es decir, N o NR, donde R es H u otros sustituyentes como ya se definieron en la presente memoria). Los heterociclos pueden unirse a los grupos colgantes de cualquier heteroátomo o átomo de carbono para formar una estructura estable. Si el compuesto resultante es estable, los heterociclos descritos en la presente memoria pueden estar sustituidos en la posición de carbono o nitrógeno. El átomo de nitrógeno en el heterociclo está opcionalmente cuaternizado. Una realización preferida es que cuando el número total de átomos de S y O en el heterociclo excede de 1, estos heteroátomos no son adyacentes entre sí. Otra realización preferida es que el número total de átomos de S y O en el heterociclo no excede 1. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "grupo heterocíclico aromático" o "heteroarilo" significa un monocíclico o bicíclico estable de 5, 6 o 7 eslabones o anillo heterociclilo aromático bicíclico de 7, 8, 9 o 10 eslabones, que contiene átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 átomos heterocíclicos seleccionados independientemente entre N, O y S. El átomo de nitrógeno puede estar sustituido o no sustituido (es decir, N o NR, donde R es H u otros sustituyentes como ya se definieron en la presente memoria). Los heteroátomos nitrógeno y azufre pueden estar oxidados opcionalmente (es decir, NO y $S(O)_p$, p es 1 o 2). Vale la pena señalar que el número total de átomos de S y O en el heterociclo aromático no supera 1. Los anillos en puente también se incluyen en la definición de heterociclos. Se forma un anillo en puente cuando dos átomos de carbono o nitrógeno no adyacentes están conectados por uno o más átomos (es decir, C, O, N o S). Un anillo en puente preferido incluye, pero no se limita a, un átomo de carbono, dos átomos de carbono, un átomo de nitrógeno, dos átomos de nitrógeno y un grupo carbono-nitrógeno. Vale la pena señalar que un puente siempre convierte un solo anillo en un anillo de tres. En el anillo en puente, los sustituyentes en el anillo también pueden aparecer en el puente.

Ejemplos de compuestos heterocíclicos incluyen, entre otros, acridinilo, azocinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzosulfidrilfuranilo, benzosulfidrilfenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, 4*H*-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromeno, cinolinildecahidroquinolinilo, 2*H*, 6*H*-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-*b*]tetrahidrofuranilo, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1*H*-indolilo, indolilaquenilo, indolinilo, indolizínilo, indonilo, 3*H*-indolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoindolinilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilendioxfenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, hidroxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazínilo, fenotiazínilo, benzoxantínilo, fenoxazínilo, fenazínilo, piperazínilo, piperidinilo, piperidinona, 4-piperidinona, piperonilo, pteridilo, purínilo, piranilo, pirazínilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazínilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2*H*-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4*H*-quinolizínilo, quinoxalínilo, quinuclidínilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6*H*-1,2,5-tiadiazínilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantienilo, tiazolilo, isotiazoliltiofenilo, tienooxazolilo, tienotiazolilo, tienoimidazolilo, tienilo, triazínilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,5-triazolilo, 1,3,4-triazolilo y xanteno. También se incluyen compuestos con espiro y con anillo fusionado.

A menos que se especifique lo contrario, el término "hidrocarbilo" o su concepto subordinado (como alquilo, alquenilo, alquinilo, fenilo y similares) por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa radicales hidrocarbonados lineales, ramificados o cíclicos, o combinaciones de los mismos, que pueden estar completamente saturados (como alquilo), unitarios o poliinsaturados (como alquenilo, alquinilo, fenilo), pueden estar monosustituidos, disustituidos o polisustituidos, y pueden ser monovalentes (como metilo), divalentes (como metileno) o polivalentes (como la metina), pueden incluir radicales divalentes o polivalentes, y tener un número específico de átomos de carbono (p. ej., C₁-C₁₂ representa de 1 a 12 carbonos, C₁-C₁₂ se seleccionan entre el grupo de C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ y C₁₂; C₃₋₁₂ se seleccionan entre el grupo de C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ y C₁₂). "Hidrocarbilo" incluye, entre otros, hidrocarbilo alifático y aromático, en donde el hidrocarbilo alifático incluye estructuras de cadena y cíclicas, incluidas entre otras alquilo, alquenilo, alquinilo, y el hidrocarbilo aromático incluye pero no se limita a hidrocarbilo aromático de 6-12 eslabones tal como benceno, naftaleno y similares. En algunas realizaciones, el término "hidrocarbilo" se refiere a radicales de cadena lineal o ramificada o combinaciones de los mismos, que pueden estar completamente saturados, unitarios o poliinsaturados, y pueden incluir radicales divalentes y polivalentes. Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, entre otros, metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, terc-butilo, isobutilo, sec-butilo, isobutilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo y homólogos o isómeros de *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo y otros grupos de átomos. El alquilo insaturado tiene uno o más enlaces dobles o triples, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, vinilo, 2-propenilo, butenilo, crotilo, 2-prenil, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1-y 3-propinilo, 3-butinilo y homólogos o isómeros más avanzados.

A menos que se especifique lo contrario, el término "heterohidrocarbilo" o su concepto subordinado (como heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroarilo, etc.) por sí mismo o en combinación con otro término significa radicales hidrocarbonados estables, lineales, ramificados o cíclicos o combinaciones de los mismos, que consisten de un determinado número de átomos de carbono y al menos un heteroátomo. En algunas realizaciones, el término "heteroalquilo" por sí mismo o en combinación con otro término significa radicales hidrocarbonados estables, lineales, ramificados o combinaciones de los mismos, que consisten en un determinado número de átomos de carbono y al menos un heteroátomo. En una realización típica, el heteroátomo se entre el grupo que consiste en B, O, N y S, en el que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados y los heteroátomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. El heteroátomo o grupo de heteroátomos puede estar situado en cualquier posición interna del heterohidrocarbilo (incluida la posición en la que el hidrocarbilo está unido al resto de la molécula). Los ejemplos incluyen entre otros a -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -CH₂-CH=N-OCH₃ y -CH=CH-N (CH₃)-CH₃. Hasta dos heteroátomos pueden estar continuos, como -CH₂-NH-OCH₃.

A menos que se especifique lo contrario, los términos "ciclohidrocarbilo", "heterociclohidrocarbilo" o conceptos subordinados (como arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, cicloalquinilo, heterocicloalquinilo, etc.) por sí mismos o en combinación con otros términos significan "hidrocarbilo", "heterohidrocarbilo" ciclado respectivamente. Además, para heterohidrocarbilo o heterociclohidrocarbilo (como heteroalquilo, heterocicloalquilo), los heteroátomos pueden ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, entre otros, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Ejemplos no restrictivos de grupos heterocíclicos incluyen 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridinilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofuranindol-3-ilo, tetrahidrotiofen-2-ilo, tetrahidrotiofen-3-ilo, 1-piperazínilo y 2-piperazínilo.

A menos que se especifique lo contrario, los términos "alquilo" significan hidrocarbilo saturado lineal o ramificado, que puede estar monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente (como metilo), divalente (como metileno) o polivalente (como metina). Los ejemplos de alquilo incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (como *n*-propilo e isopropilo), butilo (como *n*-butilo, isobutilo, *s*-butilo, *t*-butilo), pentilo (como *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo), etc.

A menos que se especifique lo contrario, los términos "alquenilo" significan un alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono en cualquier posición de la cadena, que puede estar monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente, divalente o polivalente. Los ejemplos de alquenilo incluyen vinilo, propenilo, butenilo, pentenilo,

hexenilo, butadienilo, piperileno, hexadienilo, etc.

A menos que se especifique lo contrario, el término "alquinilo" significa un alquilo que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono en cualquier posición de la cadena, que puede estar monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente, divalente o polivalente. Los ejemplos de alquinilo incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, etc.

5 A menos que se especifique lo contrario, el cicloalquilo incluye cualquier grupo hidrocarbonado cíclico o policíclico estable, y cualquier átomo de carbono está saturado, que puede estar monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente, divalente o polivalente. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, entre otros, ciclopropilo, norbornilo, [2.2.2] biciclooctano, [4.4.0] biciclononano, etc.

10 A menos que se especifique lo contrario, el cicloalqueno incluye cualquier grupo hidrocarbonado cíclico o policíclico estable que contenga uno o más dobles enlaces carbono-carbono insaturados en cualquier posición del anillo, que puede ser monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente, divalente o polivalente. Los ejemplos de cicloalqueno incluyen, entre otros, ciclopentenilo, ciclohexenilo, etc.

15 A menos que se especifique lo contrario, el cicloalquinilo incluye cualquier grupo hidrocarbonado cíclico o policíclico estable que contenga uno o más triples enlaces carbono-carbono insaturados en cualquier posición del anillo, que puede ser monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente, divalente o polivalente.

20 A menos que se especifique lo contrario, el término "halo" o "halógeno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente indica un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, el término "haloalquilo" se entiende que incluye monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, la expresión "halo alquilo (C₁-C₄)" se entiende que incluye, entre otros, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares. A menos que se especifique lo contrario, los ejemplos de haloalquilo incluyen, entre otros, trifluorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo y pentacloroetilo.

25 "Alcoxi" representa el alquilo anterior que tiene un número especificado de átomos de carbono unidos mediante un puente de oxígeno y, a menos que se especifique lo contrario, C₁₋₆ alcoxi incluye alcoxi de C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ y C₆. Los ejemplos de alcoxi incluyen, entre otros, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentiloxi y S-pentiloxi. A menos que se especifique lo contrario, el término "arilo" se refiere a un sustituyente de hidrocarburo aromático poliinsaturado, que puede estar monosustituido o polisustituido, y puede ser monovalente, divalente o polivalente, y pueden existir anillos monocíclicos o policíclicos (como 1 a 3 anillos; al menos uno de los cuales es aromático), que están fusionados o unidos por enlaces covalentes. El término "heteroarilo" se refiere a un grupo arilo (o anillo) que contiene de uno a cuatro heteroátomos. En un ejemplo ilustrativo, el heteroátomo se selecciona entre el grupo que consiste en B, N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente y el átomo de nitrógeno se cuaterniza opcionalmente. Un heteroarilo puede unirse al resto de la molécula mediante un heteroátomo. Ejemplos no restrictivos de grupos arilo o heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftililo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolinilo, 5-isoquinolinilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolinilo y 6-quinolinilo. Los sustituyentes para cualquiera de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo anteriores se seleccionan de los sustituyentes aceptables descritos a continuación.

40 A menos que se especifique lo contrario, los grupos arilo, cuando se usan en combinación con otros términos (p. ej., ariloxi, arilitio, arilalquilo) incluyen anillos arilo y heteroarilo como se definió anteriormente. Por lo tanto, el término "aralquilo" está previsto que incluya aquellos grupos (p. ej., bencilo, fenetilo, piridilmetilo, etc.) donde el grupo arilo está unido al grupo alquilo, e incluidos aquellos grupos alquilo donde el átomo de carbono (p. ej., metileno) ha sido sustituido por un átomo tal como oxígeno, por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetil 3-(1-naftiloxi)propil y similares.

45 El término "grupo saliente" se refiere a un grupo funcional o átomo que puede ser sustituido por otro grupo funcional o átomo mediante una reacción de sustitución (p. ej., una reacción de sustitución por afinidad). Por ejemplo, los grupos salientes representativos incluyen triflato; cloro, bromo, yodo; grupos sulfonato como mesilato, tosilato, *p*-bromobencensulfonato, *p*-toluensulfonatos y similares; aciloxi tal como acetoxi, trifluoroacetoxi y similares.

50 La expresión "grupo protector" incluye entre otros a "grupo protector de amino", "grupo protector de hidroxilo" o "grupo protector de sulfhidrilo". La expresión "grupo protector de amino" se refiere a un grupo protector adecuado para bloquear una reacción secundaria en la posición de nitrógeno de amino. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, entre otros, formilo; acilo, tal como alcanóilo (p. ej., acetilo, tricloroacetilo o trifluoroacetilo); alcoxicarbonilo, tal como terc-butoxicarbonilo (Boc); arilmetoxicarbonilo tal como benciloxicarbonilo (Cbz) y 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc); arilmetilo tal como bencilo (Bn), tritilo (Tr), 1,1-bis-(4'-metoxifenil)metilo; sililo tal como trimetilsililo (TMS) y terc-butildimetilsililo (TBS) y similares. La expresión "grupo protector de hidroxilo" se refiere a un grupo protector que es adecuado para bloquear la reacción secundaria de grupos hidroxilo. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, entre otros, alquilo tal como metilo, etilo y terc-butilo; acilo tal como alcanóilo (tal como acetilo); arilmetilo tal como bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo (PMB), 9-fluorenilmetilo (Fm) y difenilmetilo (benc-hidrilo, DPM); sililo tal como trimetilsililo (TMS) y terc-butil dimetilsililo (TBS) y similares.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de métodos sintéticos bien

conocidos por los expertos en la técnica, incluidas las realizaciones expuestas a continuación, combinaciones de las mismas con otros métodos de síntesis química y alternativas equivalentes bien conocidas por los expertos en la técnica, las realizaciones preferidas incluyen, entre otras, realizaciones de la presente invención.

Los disolventes utilizados en la presente invención están disponibles en el mercado.

- 5 La presente invención usa las siguientes abreviaturas: aq para agua; HATU para hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio; EDC para hidrocloreto de *N*(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida; *m*-CPBA para ácido 3-cloroperoxibenzoico; eq para equivalente, igual; CDI para carbonildiimidazol; DCM para diclorometano; PE para éter de petróleo; DIAD para diisopropil azodicarboxilato; DMF para *N,N*-dimetilformamida; DMSO para dimetilsulfóxido; EtOAc para éster de acetato de etilo; EtOH para etanol; MeOH para metanol; CBz para benziloxycarbonilo, un grupo protector de amina; BOC para *tert*-butoxicarbonilo, un grupo protector de amina; HOAc para ácido acético; NaCNBH₃ para cianoborohidruro de sodio; t.a. para temperatura ambiente; O/N durante la noche; THF para tetrahidrofurano; Boc₂O para *di-tert*-butil dicarbonato ; TFA para ácido trifluoroacético; DIPEA para diisopropiletilamina; SOCl₂ para cloruro de tionilo; CS₂ para disulfuro de carbono; TsOH para ácido *p*-toluensulfónico; NFSI para *N*-fluoro-*N*-(fenilsulfonyl)fenilsulfonyl amida; NCS para 1-cloropirrolidina-2,5-diona; *n*-Bu₄NF para fluoruro de tetrabutilamonio; *i*PrOH para 2-propanol; pf para el punto de fusión; LDA para diisopropilamida de litio, FBS para suero bovino fetal; DPBS para solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; EDTA para ácido etilendiaminotetraacético; DMEM para medio de Eagle modificado de Dulbecco; CellTiter-Glo (CTG) para el método de detección de actividad de fluorescencia de ATP; PO para administración gastrointestinal; IP para administración intraperitoneal.
- 10
- 15
- 20 Los compuestos se nombran a mano o con el programa informático ChemDraw®, y los compuestos disponibles en el mercado se nombran por los nombres de los catálogos de proveedores.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es el efecto de la realización 1, LY2157299 y BioXcell-mPD-L1 sobre el peso corporal del modelo de ratón BALB/c hembra de tumor de xenoinjerto subcutáneo de células CT-26.

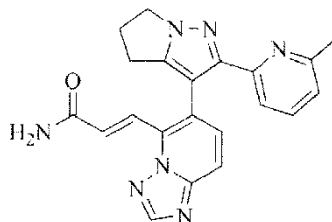
- 25 La Fig. 2 es una curva de crecimiento tumoral de ratones portadores de tumor modelo de xenoinjerto CT-26 después de la administración de la realización 1, LY2157299 y BioXcell-mPD-L1.

La Fig. 3 es el cambio de peso relativo de animales en la ensayo de inhibición de metástasis de células tumorales del modelo de trasplante ortotópico de ratón BALB/c de células 4T1 de cáncer de mama de ratón.

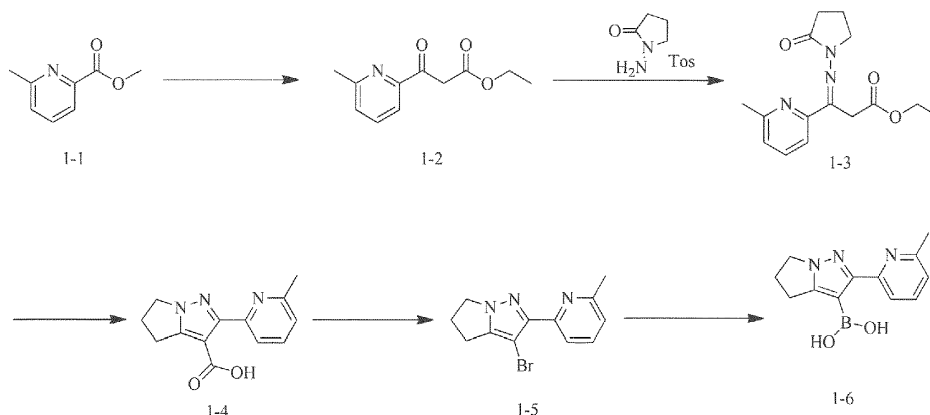
Descripción detallada de la realización preferida

- 30 Los siguientes ejemplos ilustran más la presente invención, pero la presente invención no se limita a los mismos. Si bien la presente invención se ha descrito en detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la misma.

Realización 1



Preparación de los compuestos intermedios 1-6



5 Etapa A: Se disolvió acetato de etilo (291,41 ml, 2,98 mol) en tolueno (750,00 ml), y luego se añadió etóxido de sodio (135,06 g, 1,98 mol) en lotes a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se
 10 añadió 6-metilpiridin-2-carboxilato de metilo (150,00 g, 992,33 mmol) a la solución de reacción anterior a 25°C, luego se calentó a 95°C y se agitó durante 15 h. La mezcla de reacción se enfrió a 30°C, se ajustó a pH 7 con ácido acético, se diluyó con agua (500 ml) y se extrajo con acetato de etilo (500 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 50/1) para dar 3-(6-metilpiridin-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (120,00 g, rendimiento: 58,35%).

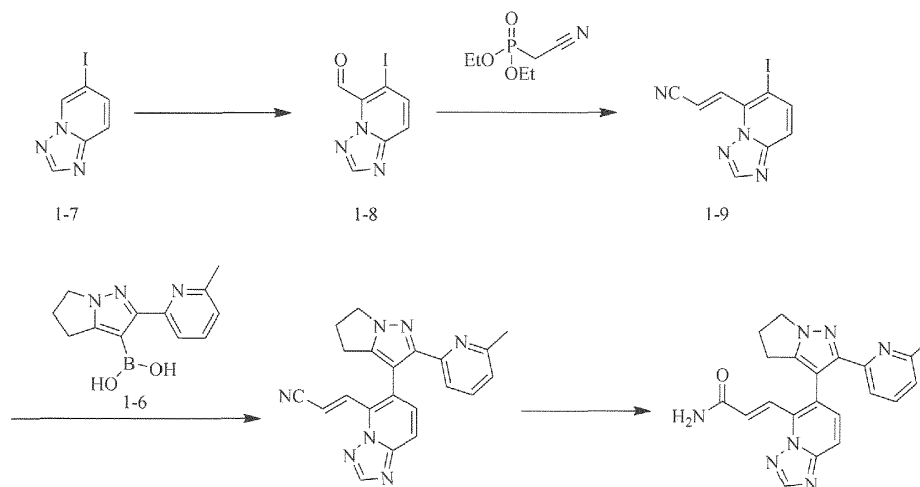
15 Etapa B: Se disolvió 3-(6-metilpiridin-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (120,00 g, 579,07 mmol) en piridina (300 ml), y luego se añadió 1-aminopirrolidin-2-ona p-toluensulfonato (172,01 g, 631,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 16 h y luego se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente. El residuo se diluyó con agua (300 ml) y luego se extrajo con acetato de etilo (300 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar 3-(6-metilpiridin-2-il)-3-((2-oxopirrolidin-1-il)imino)propanoato de etilo (150 g, rendimiento: 90,28%).

20 Etapa C: 3-(6-metilpiridin-2-il)-3-((2-oxopirrolidin-1-il)imino)propanoato de etilo (155,00 g, 535,72 mmol) se disolvió en tolueno, a continuación se añadió etóxido de sodio (72,91 g, 1,07 mol). La mezcla de reacción se calentó a 100°C y se agitó durante 16 h, luego se enfrió a temperatura ambiente. Se diluyó lentamente con agua (1,5 l), se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con diclorometano/alcohol isopropílico (10/1) (1 l x 7). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se trituró con éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 (200 ml), se filtró y se recogió el sólido. Luego, el sólido se secó a presión reducida para dar ácido 2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-carboxílico (52,80 g, rendimiento: 40,52%).

25 Etapa D: Se disolvió ácido 2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-carboxílico (45,00 g, 184,99 mmol) en N,N-dimetilformamida (650,00 ml), y luego se añadió NBS (49,09 g, 258,99 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30-40°C durante 60 h, luego se diluyó con agua (600 ml) y se extrajo con diclorometano/alcohol isopropílico (10/1) (500 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con hidróxido de sodio (0,5 mol/l, 800 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Luego, el sólido resultante
 30 se trituró con éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 (200 ml), se filtró y se recogió el sólido. El sólido se secó a presión reducida para dar 3-bromo-2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (33,00 g, rendimiento: 64,13%).

35 Etapa E: 3-bromo-2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (1,00 g, 3,60 mmol) y borato de triisopropilo (1,79 g, 9,54 mmol) se disolvieron en tetrahidrofurano (20,00 ml). La mezcla de reacción se enfrió a -70°C, luego se añadió gota a gota n-butil litio (2,5 M, 3,74 ml). Después de completar la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1 h, y luego el pH se ajustó a 7 con ácido clorhídrico acuoso (0,5 mol/l), y luego se concentró a presión reducida para eliminar el tetrahidrofurano y se enfrió a 15°C. La mezcla se filtró y la torta del filtro se trituró con éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 (200 ml), se filtró y se recogió el sólido. El sólido se secó a presión reducida para dar (2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il) bórico (750 mg, rendimiento: 85,71%).

Preparación de la realización 1



1-10 realización 1

5 Etapa A: 6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina (16,00 g, 65,30 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (800,00 ml) y se enfrió a -60-70°C, y luego se añadió gota a gota hexametildisilazida de litio (1 mol/l, 130,60 ml, 65,30 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -60-70°C durante 15 minutos y se añadió N,N-dimetilformamida (14,32 g, 195,90 mmol, 15,07 ml). La mezcla de reacción se agitó más a -60-70°C durante 15 minutos y luego se inactivó con cloruro de amonio acuoso saturado (500 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y luego se extrajo con acetato de etilo (500 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (500 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/acetato de etilo = 10/1) para dar 6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina-5-carbaldehído (6,40 g, rendimiento: 35,90%). ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) δ 10,46 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,16 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 9,3 Hz, 1H).

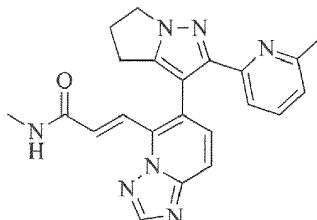
15 Etapa B: 2-dietoxifosforilacetonitrilo (3,83 g, 21,61 mmol, 3,48 ml) y tetrahidrofurano (80 ml) se añadieron a un matraz de tres bocas de 500 ml equipado con un termómetro y un globo de nitrógeno. La mezcla se enfrió a 0°C. Y a continuación se añadió t-butoxido de potasio (2,42 g, 21,61 mmol) en lotes. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 minutos y luego se añadió gota a gota a otra suspensión a través de un embudo de goteo (6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina-5-carbaldehído dispersado en tetrahidrofurano (120 ml) y enfriado a 0°C). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 minutos, luego se inactivó con agua (300 ml), se extrajo con acetato de etilo (200 ml) y diclorometano (200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (300 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyente: diclorometano/acetato de etilo = 200/1 a 10/1) para dar (E)-3-(6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (4,2 g, rendimiento: 65,66%). ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,42 (s, 1H), 8,03 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 7,98-7,91 (m, 1H), 7,85-7,78 (m, 1H), 7,60 (d, J = 9,2 Hz, 1H).

25 Etapa C: Se añadieron (E)-3-(6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (4,50 g, 15,20 mmol), ácido [2-(6-metil-2-piridilo)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il]borónico (4,43 g, 18,24 mmol) de carbonato de sodio (4,83 g, 45,60 mmol), dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (556,07 mg, 759,96 μmol), 2-diciclohexilfosfina-2', 6'-dimetoxibifenilo (311,98 mg, 759,96 μmol) y [2-(2-aminofenil)fenil]-cloro-paladio-ciclohexil-[2-(2,6-dimetoxi)fenil]fosfina (547,64 mg, 759,96 μmol) a un disolvente mixto de dioxano (100 ml) y agua (20 ml). Se cargó con nitrógeno 3 veces y a continuación se calentó a 90-100°C y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua (200 ml) y se extrajo con diclorometano (200 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para dar el producto bruto, y el producto bruto se agitó durante 12 h en un disolvente mixto de éter de petróleo/acetato de etilo = 5/1, se filtró, y el sólido se recogió y se concentró para dar (E)-3-(6-(2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (5,37 g, rendimiento: 96,16%). ¹H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,49 (s, 1H), 7,82-7,74 (m, 2H), 7,59-7,46 (m, 4H), 6,99 (dd, J = 2,6, 6,1 Hz, 1H), 4,39 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 2,90-2,70 (m, 4H), 2,20 (s, 3H).

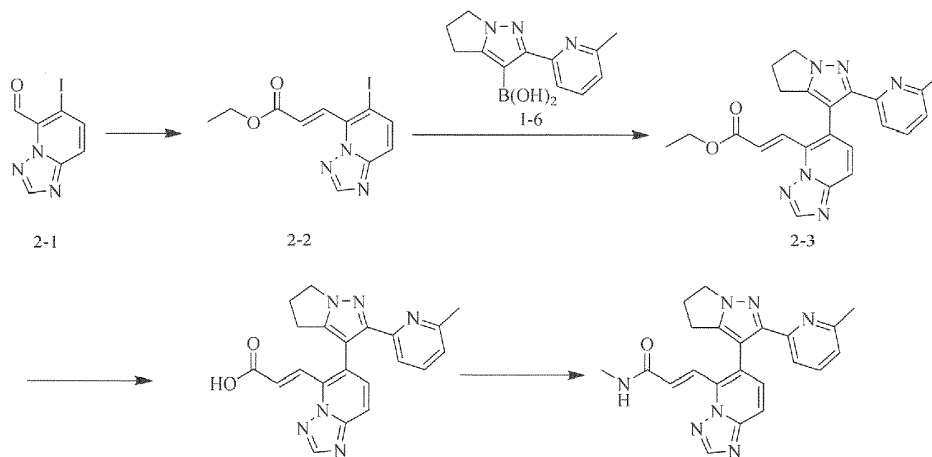
40 Etapa D: (E)-3-(6-(2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (5,37 g, 14,62 mmol) se disolvió en una mezcla disolvente de diclorometano (20 ml), dimetilsulfóxido (70 ml) y agua (20 ml), y luego se añadieron peróxido de hidrógeno (8,29 g, 73,10 mmol, 7,02 ml, 30%) e hidróxido de sodio (2 mol/l, 14,62 ml). La mezcla se agitó a 15-20°C durante 12 h. La mezcla se enfrió vertiéndola en agua (200 ml) y se extrajo con una mezcla de disolvente (200 ml x 1) de diclorometano/alcohol isopropílico (3/1). La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio (200 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró

y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (columna: Phenomenex Gemini C18 250 × 50 mm × 10 μm; fase móvil: [agua (0,05% amoníaco v/v)-acetonitrilo]; gradiente: 5%-32%, 33; 80% min) para dar la realización 1 (3,6 g, rendimiento: 63,82%). ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,45 (s, 1H), 8,09 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,55-7,45 (m, 2H), 7,37 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 5,93-5,65 (m, 2H), 4,35 (br. s., 2H), 2,99-2,64 (m, 4H), 2,33 (s, 3H).

Realización 2



Preparación de la realización 2



2-4 realización 2

Etapa A: Se disolvió acetato de etilo y 2-dietoxifosforilo (295,93 mg, 1,32 mmol, 261,88 μl) en tetrahidrofurano (6 ml) y se enfrió a 0°C, y se añadió hidruro de sodio (52,80 mg, 1,32 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 minutos y luego se añadió gota a gota a otra suspensión (6-yodo-[1,2,4] triazolo[1,5-a]piridina-5-carbaldehído (300 mg, 1,10 mmol)) dispersado en tetrahidrofurano (6 ml) y enfriado a -10-15°C). La mezcla de reacción se agitó a -10-15°C durante 15 minutos, se inactivó vertiéndola en una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (20 ml) y a continuación se extrajo con diclorometano (20 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/acetato de etilo = 10/1) para dar (E)-3-(6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (330 mg, rendimiento: 87,43%).

Etapa B: (E)-3-(6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (330 mg, 961,76 μmol), [2-(6-metil-2-piridil)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il]bórico (268,84 mg, 1,11 mmol), carbonato de sodio (305,81 mg, 2,89 mmol), dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio.diclorometano (39,27 mg, 48,09 μmol), diciclohexilfosfina-2',6'-dimetoxibifenilo (19,74 mg, 48,09 μmol) y [2-(2-aminofenil)fenil]-cloro-paladio; ciclohexil-[2-(2,6-dimetoxifenil)fenil]fosfina (34,65 mg, 48,09 μmol) se añadieron a un disolvente mixto de dioxano (10 ml) y agua (2 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 90-100°C y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió vertiéndola en agua (20 ml) y se extrajo con diclorometano (200 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa de gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 10/1) para dar (E)-3-(6-(2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (359 mg, rendimiento: 81,57%).

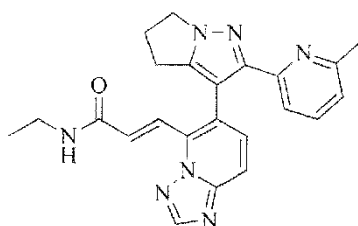
Etapa C: (E)-3-(6-(2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (359,00 mg, 866,19 μmol) se disolvió en una mezcla disolvente de tetrahidrofurano (6 ml) y agua (2 ml), luego se añadió hidróxido de litio monohidratado (109,04 mg, 2,6 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, luego se diluyó con agua (15 ml) y se ajustó el pH a 5-6 con ácido clorhídrico diluido (1 mol/l), y luego se extrajo con diclorometano (20 ml x 1). La fase orgánica se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato

de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar ácido (E)-3-(6-(2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrílico (330 mg, rendimiento: 98,59%).

- 5 Etapa D: Ácido (E)-3-(6-(2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b] pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a] piridin-5-il)acrílico (65 mg, 168,22 μmol), hidrocloreto de metilamina 22,72 mg, 336,44 μmol), HATU (127,92 mg, 336,44 μmol) y trietilamina (68,09 mg, 672,88 μmol , 93,27 μl) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, se diluyó directamente con metanol (2 ml) y se purificó por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (columna: Phenomenex Gemini 150 \times 25 mm \times 10 μm ; fase móvil: [agua (0,05)% de agua amoniacal v/v]-acetonitrilo]; gradiente: 21%-51%, 15 min) para dar la realización 2 (27,79 mg, rendimiento: 41,36%). ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,67 (s, 1H), 8,43 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 7,93-7,80 (m, 2H), 7,68-7,61 (m, 2H), 7,60-7,49 (m, 2H), 7,02 (dd, $J = 1,6, 6,8$ Hz, 1H), 4,29 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 2,84-2,72 (m, 2H), 2,69-2,57 (m, 5H), 1,99 (s, 3H).

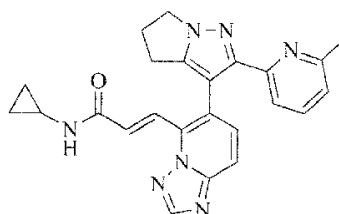
Las realizaciones 3 a 5 se pueden preparar según el proceso de preparación de la realización 2.

Realización 3



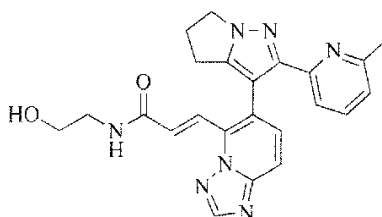
- 15 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,67 (s, 1H), 8,48 (br t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 7,95-7,78 (m, 2H), 7,69-7,46 (m, 4H), 7,02 (dd, $J = 1,6, 6,7$ Hz, 1H), 4,29 (br d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,26-3,08 (m, 2H), 2,81-2,58 (m, 4H), 1,99 (s, 3H), 1,04 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

Realización 4



- 20 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,66 (s, 1H), 8,53 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,89-7,81 (m, 2H), 7,69-7,61 (m, 2H), 7,60-7,48 (m, 2H), 7,06-7,00 (m, 1H), 4,30 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 2,83-2,73 (m, 3H), 2,66-2,60 (m, 2H), 1,99 (s, 3H), 0,65 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 0,46 (d, $J = 2,8$ Hz, 2H).

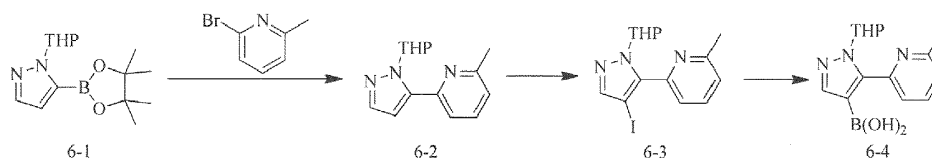
Realización 5



- 25 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,67 (s, 1H), 8,50 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 7,83 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,69-7,61 (m, 2H), 7,59-7,49 (m, 2H), 7,02 (dd, $J = 1,8, 6,7$ Hz, 1H), 4,69 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,34-4,24 (m, 2H), 3,43 (q, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,21 (d, $J = 3,1$ Hz, 2H), 2,83-2,73 (m, 2H), 2,62 (quin, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,99 (s, 3H).

Realización 6

Preparación del producto intermedio 6-4

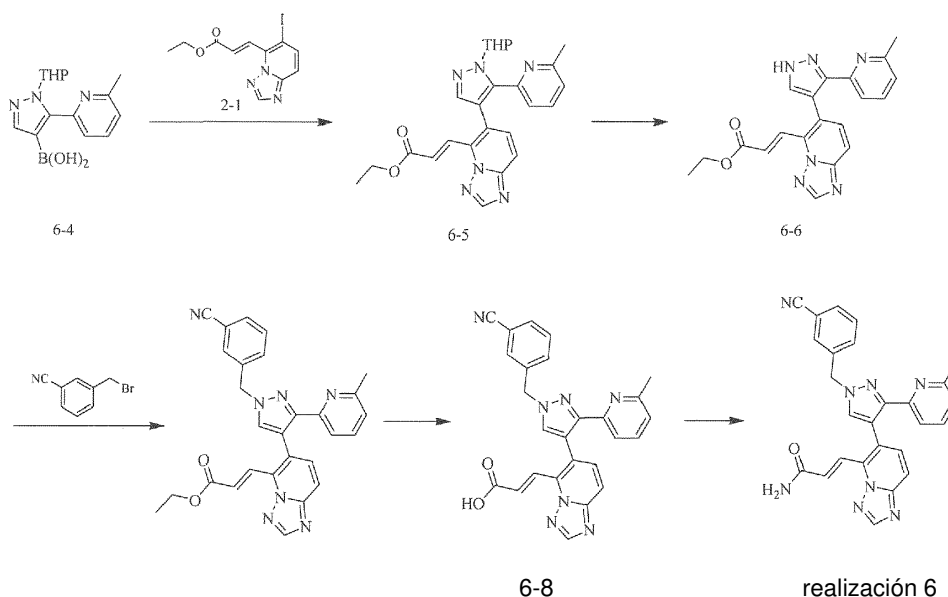


Etapa A: Se añadieron 1-tetrahidropiran-2-il-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirazol (10,96 g, 39,41 mmol), 2-bromo-6-metil-piridina (6,00 g, 34,88 mmol, 3,97 ml), dicloruro de [1,1'-bis (difenilfosfino)ferroceno]paladio (1,28 g, 1,74 mmol) y carbonato de sodio (11,09 g, 104,64 mmol) a un disolvente mixto de dioxano (200,00 ml) y agua (40,00 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 80-90°C y se agitó durante 3 h, a continuación se inactivó vertiéndola en agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (180 ml x 2). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1-5/1) para dar 2-metil-6-(1-(tetrahidro-2H-piran-2-ilo)-1H-pirazol-5-il)piridina (4,10 g, en bruto). El producto fue identificado en bruto por magnetismo nuclear.

Etapa B: 2-metil-6-(1-(tetrahidro-2H-piran-2-ilo)-1H-pirazol-5-il)piridina (2,10 g, en bruto) se disolvió en ácido acético (20,00 ml), luego se añadió NIS (2,04 g, 9,06 mmol) en una porción. La mezcla se calentó a 70-80°C y se agitó durante 1 h, luego se inactivó vertiéndola en una solución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) y a continuación se extrajo con acetato de etilo (50 ml x 3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1) para dar 2-(4-yodo-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-pirazol-5-il)-6-metilpiridina (1,60 g, rendimiento: 50,22%).

Etapa C: 2-(4-yodo-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-pirazol-5-il)-6-metilpiridina (500,00 mg, 1,35 mmol) y borato de trisopropilo (672,82 mg, 3,58 mmol, 820,51 µl) se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml). La mezcla de reacción se enfrió a -78°C, se añadió gota a gota n-butil litio (2,5 M, 1,40 ml) y se agitó a -78-60°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió vertiéndola en una solución saturada de cloruro de amonio, se agitó durante 10 minutos y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 2). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1) para dar ácido (5-(6-metilpiridin-2-il)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-ilo)-1H-pirazol-4-il)bórico (200,00 mg, rendimiento: 51,60%).

Preparación de la realización 6



Etapa A: ácido [5-(6-metil-2-piridil)-1-tetrahidropiran-2-il-pirazol-4-il]bórico (200,00 mg, 696,57 µmol), (E)-3-(6-yodo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (239,01 mg, 696,57 µmol), carbonato de sodio (221,49 mg, 2,09 mmol), dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (50,97 mg, 69,66 µmol), dicitclohexilfosfina-2',6'-dimetoxifenilo (28,60 mg, 69,66 µmol) y [2-(2-aminofenil)fenil]-cloro-paladio; ciclohexil-[2-(2,6-dimetoxifenil)fenil] fosfina (50,20 mg, 69,66 µmol) se añadieron a un disolvente mixto de dioxano (3 ml) y agua (1 ml). Se cargó con nitrógeno 3 veces, luego se calentó a 80-90°C y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió vertiéndola en agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 2). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa de gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para dar (E)-3-(6-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-ilo)-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (250,00 mg, rendimiento: 78,27%).

Etapa B: (E)-3-(6-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-ilo)-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (250,00 mg, 545,24 µmol) se disolvió en etanol (3 ml), a continuación se añadió hidrocioruro de dioxano (4 M, 5,01 ml). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, se evaporó para eliminar el disolvente, y a continuación se ajustó a un pH de 8-9 con solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y se extrajo con diclorometano (20 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato

de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar (E)-3-(6-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il) acrilato de etilo (230,00 mg, en bruto).

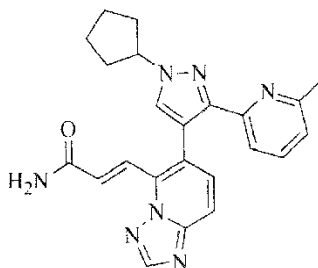
5 Etapa C: (E)-3-(6-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il) acrilato de etilo se disolvió en THF (5 ml). La mezcla de reacción se enfrió a -20°C y luego se añadió hidruro de sodio (27,03 mg, 675,75 μmol) y se agitó a -20°C durante 30 minutos. A continuación se añadió bromuro de 3-cianobencilo (132,47 mg, 675,75 μmol). La mezcla de reacción se calentó a 15-20°C y se continuó agitando durante 4 h, a continuación se inactivó vertiéndola en agua (20 ml), se ajustó a pH de 5-6 con ácido clorhídrico acuoso diluido (1 M) y se extrajo con etilo acetato (20 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa de gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para dar (E)-3-(6-(1-(3-cianobencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de etilo (150,00 mg, rendimiento: 46,67%).

15 Etapa D: (E)-3-(6-(1-(3-cianobencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il) acrilato de etilo (150,00 mg, 306,42 μmol) se disolvió en tetrahidrofurano (3 ml), luego se añadió en una porción hidróxido de litio monohidratado (38,57 mg, 919,26 μmol). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, luego se inactivó vertiéndola en agua (10 ml) y se ajustó a un pH de 5-6 con ácido clorhídrico acuoso diluido (1 M), a continuación se extrajo con diclorometano (20 ml × 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar ácido (E)-3-(6-(1-(3-cianobencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrílico (130,00 mg, rendimiento: 91,94%).

20 Etapa E: Ácido (E)-3-(6-(1-(3-cianobencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrílico (130,00 mg, 281,71 μmol), HATU (214,23 mg, 563,42 μmol) y trietilamina (57,01 mg, 563,42 μmol, 78,10 μl) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (2 ml). Después de agitar la mezcla de reacción a 15-20°C durante 1 h, se añadió una solución de 3 ml de amoniaco en tetrahidrofurano (saturado a 0°C). La mezcla de reacción se continuó agitando a 15-20°C durante 30 minutos, se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente y luego se diluyó con metanol (2 ml). El residuo se purificó por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (columna: Phenomenex Synergi C18 150 × 30 mm × 4 μm; fase móvil: [agua (ácido fórmico al 0,225%)-acetonitrilo]; gradiente: 15%-45%, 12 min) para dar la realización 6 (53,00 mg, rendimiento: 40,32%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,69 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,93-7,81 (m, 5H), 7,67-7,52 (m, 6H), 7,24 (br. s., 1H), 7,04 (dd, *J* = 2,0, 6,2 Hz, 1H), 5,61 (s, 2H), 1,98 (s, 3H).

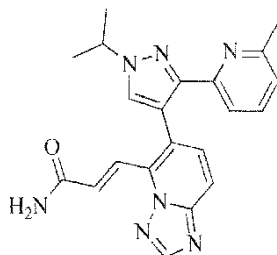
La realización 7 se puede preparar según el proceso de preparación de la realización 6.

30 Realización 7

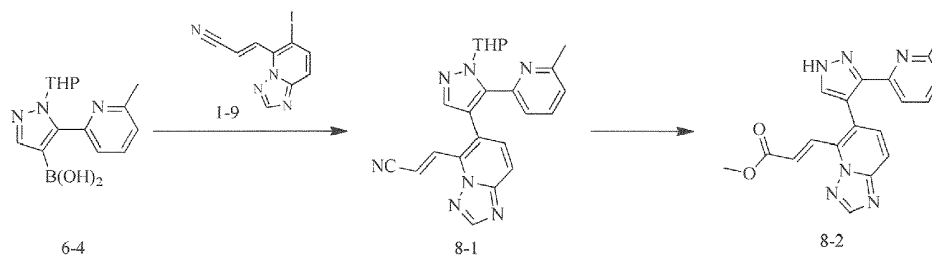


¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,67 (s, 1H), 8,41-8,36 (m, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,89-7,78 (m, 3H), 7,69-7,58 (m, 3H), 7,51 (re, *J* = 15,7 Hz, 1H), 7,16 (br s, 1H), 7,02 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 4,86 (quin, *J* = 6,9 Hz, 1H), 2,22-2,16 (m, 2H), 2,14-2,04 (m, 2H), 1,97 (s, 3H), 1,92-1,83 (m, 2H), 1,76-1,66 (m, 2H).

35 Realización 8



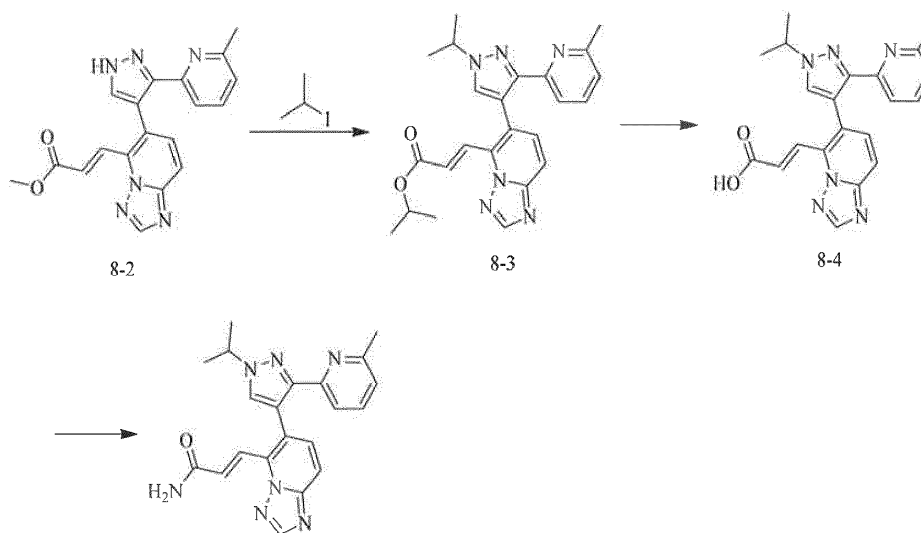
Preparación del producto intermedio 8-2



Etapa A: ácido [5-(6-metil-2-piridil)-1-tetrahidropiran-2-il-pirazol-4-il]bórico (470,00 mg, 1,64 mmol), (*E*)-3-(6-yodo-
 5 [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (485,55 mg, 1,64 mmol), carbonato de sodio (521,47 mg, 4,92 mmol),
 10 dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (36,00 mg, 49,20 μ mol), biciclohexilfosfino-2'6'-dimetoxibifenilo
 (6,73 mg, 16,40 μ mol) y [2-(2-aminofenil)fenil]-cloro-paladio ciclohexil-[2-(2,6-dimetoxifenil)fenil]fosfina (11,82 mg,
 16,40 μ mol) se añadieron a un disolvente mixto de dioxano (20 ml) y agua (5 ml). La mezcla de reacción se cargó con
 nitrógeno 3 veces, luego se calentó a 80-90°C y se agitó durante 12 h, luego se enfrió vertiéndola en agua (30 ml) y
 se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro,
 se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto obtenido se agitó durante 30 minutos en un
 20 disolvente mixto de éter de petróleo (12 ml) y acetato de etilo (4 ml) y se filtró. El sólido se recogió y se concentró a
 presión reducida para dar (*E*)-3-(6-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[1,5-
 a] piridin-5-il)acrilonitrilo (554,00 mg, rendimiento: 82,32%).

Etapa B: (*E*)-3-(6-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[1,5-a]piridin-5-
 15 il)acrilonitrilo (554,00 mg, 1,35 mmol) se disolvió en metanol (5 ml), luego se añadió hidrócloro de dioxano (4 mol/l,
 5 ml). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, se concentró a presión reducida para eliminar el
 disolvente y se ajustó a un pH de 8-9, a continuación se extrajo con diclorometano (20 ml x 2). Las fases orgánicas
 combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron
 a presión reducida para dar (*E*)-3-(6-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[1,5-a] piridin-5-il)acrilato de
 20 metilo (500,00 mg, en bruto).

Preparación de la realización 8



realización 8

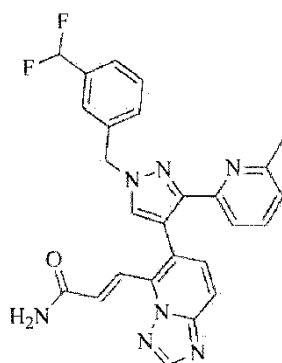
Etapa A: (*E*)-3-(6-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il) acrilato de metilo (260,00 mg,
 25 en bruto) se disolvió en tetrahidrofurano (4 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C, se añadió hidruro de sodio
 (31,75 mg, 793,63 μ mol) en una porción, y luego se agitó a 0°C durante 30 minutos, a continuación se añadió
 yodoisopropano (134,91 mg, 793,63 μ mol). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h. El seguimiento
 por LCMS demostró que (*E*)-3-(6-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilato de
 30 metilo se consumió por completo, pero el producto objetivo no se formó (MS (ESI) *m/z*: 347 [M + H⁺]). La mezcla se
 concentró a presión reducida para eliminar el tetrahidrofurano, y el residuo se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (3 ml),
 luego se agregaron 2-yodoisopropano (613,22 mg, 3,61 mmol, 360,72 μ l) y potasio (498,58 mg, 3,61 mmol). La mezcla
 de reacción se agitó durante otras 12 h a 15-20°C. El seguimiento por LCMS indicó la finalización de la reacción. La
 mezcla se enfrió vertiéndola en agua (20 ml) y a continuación se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 3). Las fases
 orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (60 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se

concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa en gel de sílice (eluyente: cloruro de metileno/metanol = 30/1) para dar (*E*)-3-(6-(1-isopropil-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il) acrilato de isopropilo (100,00 mg, en bruto).

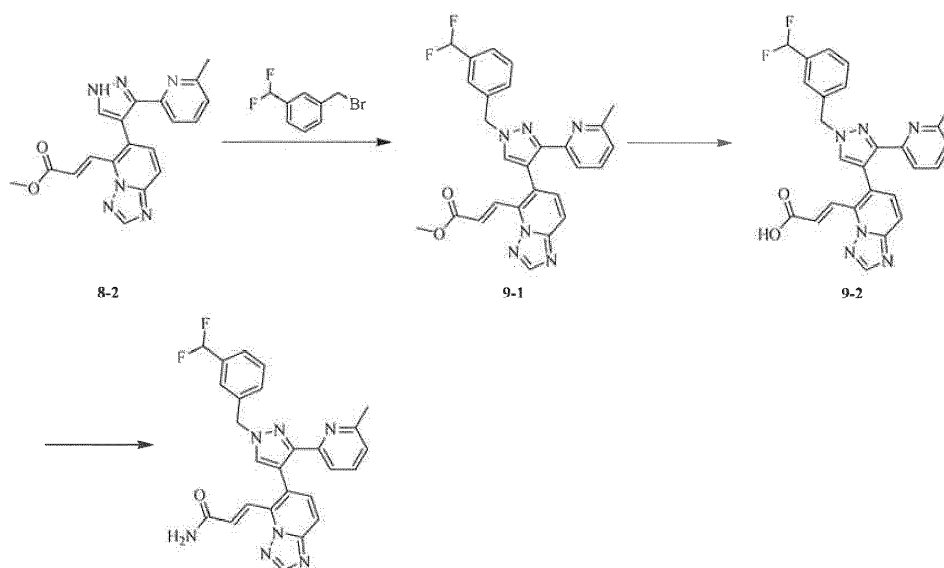
5 Etapa B: (*E*)-3-(6-(1-isopropil-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilato de isopropilo (100,00 mg, en bruto) se disolvió en un disolvente mixto de tetrahidrofurano (1 ml), metanol (1 ml) y agua (1 ml), luego se añadió hidróxido de litio monohidratado (29,24 mg, 696,87 μ mol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 3 h, luego se ajustó a un pH de 5-6 con ácido clorhídrico diluido (5%) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar ácido (*E*)-3-(6-(1-isopropil-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrílico (100,00 mg, en bruto).

15 Etapa C: Ácido (*E*)-3-(6-(1-isopropil-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4] triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrílico (100,00 mg, bruto) se disolvió en tetrahidrofurano (3 ml), a-c se añadieron HATU (195,78 mg, 514,90 μ mol) y trietilamina (52,10 mg, 514,90 μ mol, 71,37 μ l) en una porción respectivamente. Después de agitar la mezcla de reacción a 15-20°C durante 1 h, se añadió una solución de 3 ml de amoniaco en tetrahidrofurano (saturado a 0°C). La mezcla de reacción se continuó agitando a 15-20°C durante 12 h. El disolvente se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente y se diluyó con metanol (3 ml), y luego se purificó por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (columna: Phenomenex Synergi C18 150 x 30 mm x 4 μ m; fase móvil: [agua (0,225 % de ácido fórmico)-acetonitrilo], gradiente: 10%-40%, 12 min) realización 8 (30,50 mg, rendimiento: 30,08%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,68 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,89-7,81 (m, 3H), 7,68-7,59 (m, 3H), 7,51 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H), 7,18 (br s, 1H), 7,02 (dd, *J* = 1,2, 7,1 Hz, 1H), 4,67 (quin, *J* = 6,7 Hz, 1H), 1,97 (s, 3H), 1,55 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H).

Realización 9



Preparación de la realización 9



25

realización 9

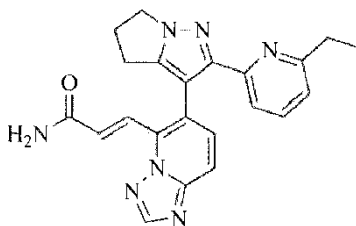
Etapa A: (*E*)-3-(6-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilato de metilo (200,00 mg, en bruto) se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml). Después de enfriar a 0°C, se añadió hidruro de sodio (24,42 mg, 610,49 μ mol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 30 minutos, a continuación se añadió 1-

(bromometil)-3-(difluorometil)benceno (13494 mg, 61049 μmol), luego la mezcla de reacción se calentó a 15-20°C y se continuó agitando durante 5 h. La mezcla de reacción se inactivó vertiéndola en agua (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar (*E*)-3-(6-(1-(3-(difluorometil) bencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilato de metilo (150,00 mg, en bruto).

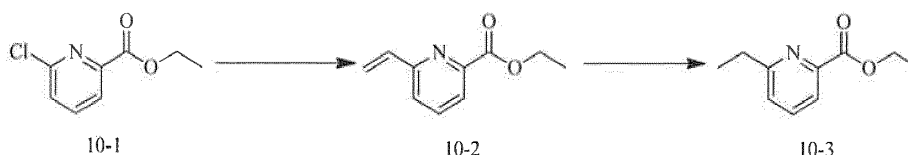
Etapa B: (*E*)-3-(6-(1-(3-(difluorometil)bencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilato de metilo (150,00 mg, en bruto) se disolvió en una mezcla de disolventes de tetrahidrofurano (1 ml), metanol (1 ml) y agua (1 ml), luego se añadió de hidróxido de litio monohidratado (37,73 mg, 899,10 μmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 10 minutos y se ajustó a un pH de 5-6 con ácido clorhídrico diluido (0,5 M), momento en el que precipitaron los sólidos. El sólido se filtró y se recogió para dar ácido (*E*)-3-(6-(1-(3-(difluorometil)bencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilico (120,00 mg, rendimiento: 60,34%).

Etapa C: Ácido (*E*)-3-(6-(1-(3-(difluorometil)bencil)-3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilico (120,00 mg, 180,83 μmol), HATU (187,59 mg, 493,36 μmol) y trietilamina (49,92 mg, 493,36 μmol , 68,38 μl) se disolvieron en tetrahidrofurano (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 1 h, luego se añadieron 3 ml de una solución de amoniaco en tetrahidrofurano (saturado a 0°C). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, a continuación se inactivó vertiéndola en agua y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (columna: Phenomenex Synergi C18 150 x 30 mm x 4 μm ; fase móvil: [agua (0,225% de ácido fórmico)-acetonitrilo]; gradiente 15%-45%, 12 min) realización 9 (47,85 mg, rendimiento: 39,81%). ^1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,70 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,95-7,83 (m, 3H), 7,67-7,51 (m, 8H), 7,28 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 7,07-6,96 (m, 1H), 7,12 (s, 1H), 5,61 (s, 2H), 1,97 (s, 3H).

Realización 10



Preparación del intermedio 10-3



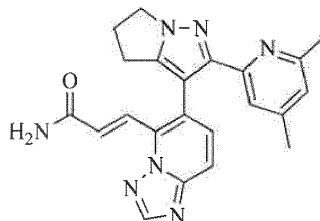
Etapa A: 6-cloropiridina-2-carboxilato de etilo (500,00 mg, 2,69 mmol), vinil tributilestaño (887,12 mg, 2,80 mmol, 813,87 μl) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (155,42 mg, 134,50 μmol) se disolvieron en tolueno (10 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 110-120°C y se agitó durante 3 h. Después de enfriar, se vertió en una solución saturada de fluoruro de potasio (30 ml) y se agitó durante 30 minutos. La mezcla se filtró y la torta del filtro se lavó con acetato de etilo (10 ml x 3). El filtrado se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1) para dar 6-vinilpiridin-2-carboxilato de etilo (364,00 mg, rendimiento: 76,21%). ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) 8,00(dd, J = 0,8, 7,8 Hz, 1H), 7,81 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,61 (dd, J = 0,9, 7,9 Hz, 1H), 6,96 (dd, J = 10,9, 17,6 Hz, 1H), 6,25 (dd, J = 0,6, 17,6 Hz, 1H), 5,67-5,56 (m, 1H), 4,50 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 1,46 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa B: Se disolvió 6-vinilpiridin-2-carboxilato de etilo (364,00 mg, 2,05 mmol) en etanol (4 ml) y luego se añadió paladio carbono (40,00 mg, 10%) en una porción. La mezcla de reacción se cargó con hidrógeno tres veces y a continuación se agitó a 15-20°C durante 3 h bajo una presión de hidrógeno de 103,4 kPa (15 psi). Posteriormente, el paladio carbono se eliminó por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar 6-etilpiridina-2-carboxilato de etilo (320,00 mg, rendimiento: 87,10%). ^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-*d*) 7,95(re, J = 7,7 Hz, 1H), 7,75 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,49 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 2,96 (q, J = 7,7 Hz, 2H), 1,44 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,34 (t, J = 7,7 Hz, 3H).

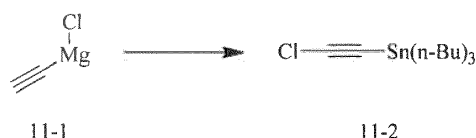
La realización 10 se puede preparar según el procedimiento de preparación de la realización 1.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,66 (s, 1H), 7,81-7,91 (m, 3H), 7,61-7,72 (m, 2H), 7,57 (d, $J = 9,03$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 15,69$ Hz, 1H), 7,21 (br s, 1H), 6,96-7,03 (m, 1H), 4,21-4,37 (m, 2H), 2,70-2,92 (m, 2H), 2,62 (q, $J = 7,18$ Hz, 2H), 2,27 (q, $J = 7,53$ Hz, 2H), 0,48 (t, $J = 7,53$ Hz, 3H).

5 Realización 11

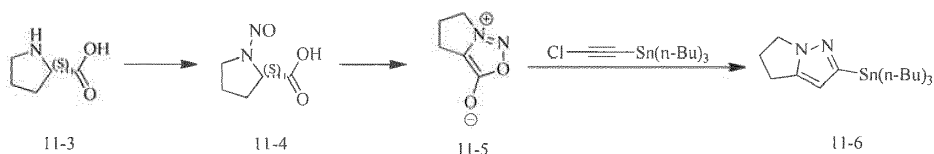


Preparación del intermedio 11-2



10 Etapa A: se añadió gota a gota cloruro de tri-*n*-butilestano (72,09 ml, 268,00 mmol) (no menos de 30 minutos) a una solución de cloruro de etinilmagnesio en tetrahidrofurano (0,5 mol/l, 800,00 ml) mientras se agitaba a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante 0,5 h, luego se calentó a 35°C y se agitó durante 1 h. Después de eso, se enfrió a 0°C, y luego se inactivó con cloruro de amonio acuoso (800 ml), luego se extrajo con éter de petróleo (800 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (400 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar tributil(cloroetinil)estannano (84,00 g, rendimiento: 60,08%). ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ : 1,54-1,67 (m, 6H), 1,32-1,35 (m, 6H), 0,88-1,04 (m, 15H).

Preparación del intermedio 11-6

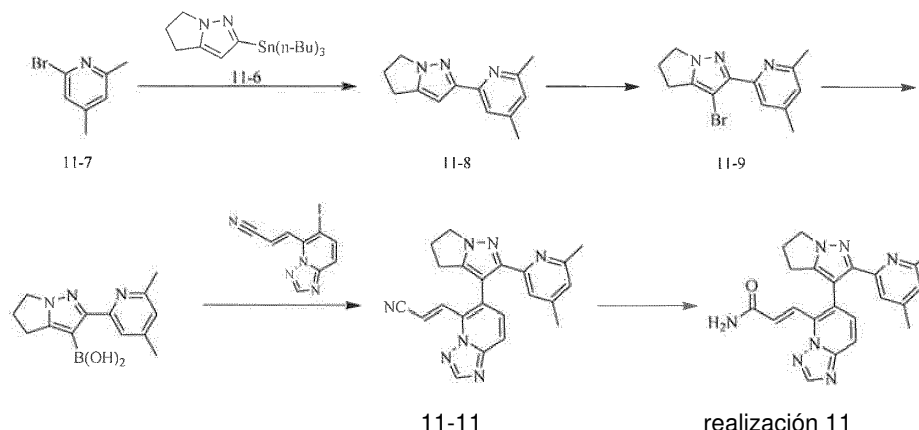


20 Etapa A: Se disolvieron en agua L-prolina (50 g, 434,29 mmol) y nitrito de sodio (41,95 g, 608,01 mmol), luego se añadió ácido clorhídrico concentrado (50 ml) a -10-0°C (se controló para que no fuera superior a 10°C). Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 0,5 h, luego se elevó a 25°C y se agitó durante 16 h. La mezcla se diluyó con agua (200 ml), luego se extrajo con metil terc-butil éter (300 ml x 5). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar N-nitro-L-prolina (57,00 g, en bruto).

25 Etapa B: Se disolvió N-nitro-L-prolina (57,00 g, en bruto) en tolueno (90 ml), se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota anhídrido trifluoroacético (82,51 ml, 593,21 mmol) en 1 h. La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 2 h. Se dispersó carbonato de potasio (87,45 g, 632,76 mmol) en agua (50 ml) y diclorometano (100 ml), y la solución de reacción anterior se añadió gota a gota a la solución a 0°C en 1 hora. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a 25°C durante 1 h. La mezcla se extrajo con diclorometano (100 ml x 5). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 0/1) para dar 5,6-dihidro-4H-pirroló[1,2-*c*][1,2,3]oxadiazol-7-*io*-3-olato (39,00 g, rendimiento: 78,20%).

35 Etapa C: Se disolvió 5,6-dihidro-4H-pirroló[1,2-*c*][1,2,3]oxadiazol-7-*ium*-3-olato (23,5 g, 186,35 mmol) en tolueno (120 ml) bajo nitrógeno, a continuación se añadió 2-cloroacetileno tri-*n*-butilestano (84,67 g, 242,26 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 150°C durante 40 h y se purificó directamente por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 1/0-20/1) para dar 2-(tributilstani)-5,6-dihidro-4H-pirroló[1,2-*b*]pirazol (13,00 g, rendimiento: 17,56%).

Preparación de la realización 11



5 Etapa A: 2-(tributylestanil)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol (1,49 g, 3,76 mmol), 2-bromo-4,6-dimetil-piridina (700,00 mg, 3,76 mmol), cloruro de litio (318,98 mg, 7,52 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina) paladio se añadieron (434,77 mg, 376,24 μ mol) a dioxano (20 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 100-110°C y se agitó durante 12 h. El seguimiento por LCMS mostró que 2-(tributylestanil)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol no se consumió por completo. La reacción se agitó durante otras 12 h a 100-110°C. Nuevamente, el seguimiento por LCMS demostró que 2-(tributylestanil)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol no se consumió por completo. La reacción se continuó agitando durante 12 h a 100-110°C. Por último, se completó la reacción controlada por LCMS. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió vertiéndola en agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa en gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para dar 2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol (649,00 mg, rendimiento: 63,81%, pureza: 78,847%).

20 Etapa B: 2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol (150,00 mg, 703,30 μ mol) y NBS (137,69 mg, 773,63 μ mol) se disolvieron en *N,N*-dimetilformamida (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 2 h, luego se inactivó vertiéndola en agua (15 ml) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (15 ml), se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa en gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para dar 3-bromo-2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol (150,00 mg, rendimiento: 73,00%).

25 Etapa C: 3-bromo-2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol (150,00 mg, 513,40 μ mol) y borato de triisopropilo (255,87 mg, 1,36 mmol, 312,04 μ l) se disolvieron en tetrahidrofurano (4 ml). La mezcla se enfrió a -78-60°C, luego se añadió gota a gota *n*-butil litio (2,5 M, 533,94 μ l). La mezcla de reacción se calentó a 15-20°C y se agitó durante 30 minutos, luego se enfrió vertiéndola en una solución saturada de cloruro de amonio (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa en gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para dar (2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol-3-il)bórico (90,00 mg, rendimiento: 68,18%).

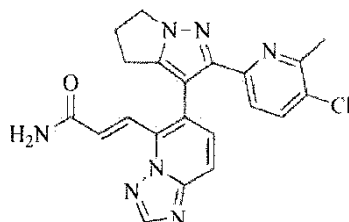
35 Etapa D: Se añadieron (*E*)-3-(6-yodo-[1,2,4] triazolo[1,5-*a*] piridin-5-il)acrilonitrilo (100,00 mg, 337,76 μ mol), (2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol-3-il) ácido bórico (86,84 mg, 337,76 μ mol), carbonato de sodio (107,40 mg, 1,01 mmol), dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (7,41 mg, 10,13 μ mol), dicitohexilfosfina-2'6'-dimetoxifenilo (1,39 mg, 3,38 μ mol) y [2-(2-aminofenil)fenil]-cloro-paladio; ciclohexil-[2-(2,6-dimetoxifenil)fenil]fosfina (12,17 mg, 16,89 μ mol) a un disolvente mixto de dioxano (20 ml) y agua (4 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 80-90°C y se agitó durante 12 h. A continuación la mezcla se enfrió vertiéndola en agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa en gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1) para proporcionar (*E*)-3-(6-(2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilonitrilo (80,00 mg, en bruto).

45 Etapa E: (*E*)-3-(6-(2-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4*H*-pirrolo[1,2-*b*]pirazol-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)acrilonitrilo (80,00 mg, en bruto) se disolvió en un disolvente mixto de agua (1 ml) y dimetilsulfóxido (2 ml), luego se añadieron hidróxido de sodio (10,49 mg, 262,18 μ mol) y peróxido de hidrógeno (74,31 mg, 655,45 μ mol) en una porción respectivamente. La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 2 h, luego se enfrió vertiéndola en agua (20 ml) y se extrajo con diclorometano (20 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía

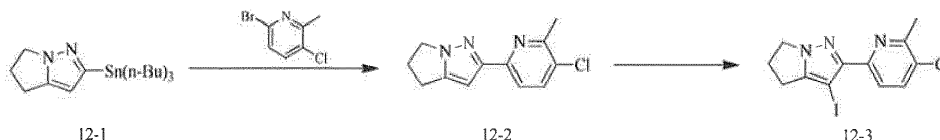
preparativa en gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 30/1), y el producto bruto se controló impuro por LCMS. El producto bruto se purificó nuevamente por HPLC preparativa (columna: Phenomenex Synergi C18 150 x 30 mm x 4 µm; fase móvil: [agua (ácido fórmico al 0,225%)-acetonitrilo]; gradiente: 10%-40%, 12 min) para dar la realización 11 (12,00 mg, formiato, rendimiento: 22,90%). ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 8,53 (s, 1H), 8,21 (br s, 1H), 8,00 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 7,76 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,68-7,56 (m, 2H), 7,38 (s, 1H), 6,99 (s, 1H), 4,34 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,97-2,89 (m, 2H), 2,80-2,69 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,17 (s, 3H)

5

Realización 12



Preparación del intermedio 12-3



10

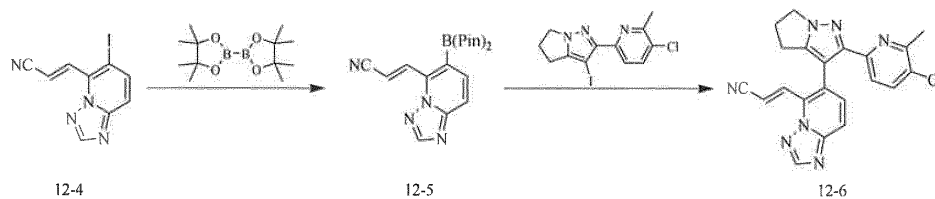
Etapa A: 2-(tributylestanil)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (2,69 g, 6,78 mmol), 6-bromo-3-cloro-2-metilpiridina (700,00 mg, 3,39 mmol), cloruro de litio (287,43 mg, 6,78 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (391,77 mg, 339,00 µmol) se añadieron a dioxano (30 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 100-110°C y se agitó durante 12 h. La mezcla se enfrió vertiéndola en agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1-5/1) para dar 2-(5-cloro-6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (600,00 mg, rendimiento: 67,19%). ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) 7,65(q, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,59 (s, 1H), 4,22 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,95 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,71-2,59 (m, 5H).

15

Etapa B: 2-(5-cloro-6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (200,00 mg, 855,80 µmol) se disolvió en N, N-dimetilformamida (3 ml) y luego se añadió NIS (211,79 mg, 941,38 µmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h, luego se filtró, y la torta del filtro se recogió, se concentró y se secó para dar 2-(5-cloro-6-metilpiridin-2-il)-3-yodo-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (264,00 mg, rendimiento: 85,79%).

20

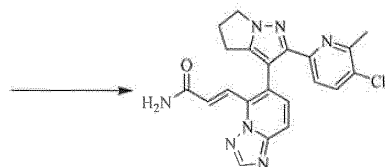
Preparación de la realización 12



12-4

12-5

12-6



25

realización 12

Etapa A: (E)-3-(6-yodo-1,2,4-triazolo[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (200,00 mg, 675,52 µmol), bis (pinacolato)diboro (205,85 mg, 810,62 µmol), dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (49,43 mg, 67,55 µmol) y acetato de potasio (132,59 mg, 1,35 mmol) se añadieron a dioxano (20 ml). La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 100-110°C y se agitó durante 12 h. La reacción se dejó sin tratar y la solución se usó directamente en la etapa siguiente.

30

Etapa B: Se añadieron a la mezcla 2-(5-cloro-6-metilpiridin-2-il)-3-yodo-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (121,43 mg, 337,69 μmol), carbonato de sodio (107,38 mg, 1,01 μmol), dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (24,71 mg, 33,77 μmol), dicitclohexilfosfina-2'6'-dimetoxibifenilo (13,86 mg, 33,77 μmol), [2-(2-aminofenil) fenil]-cloro-paladio; ciclohexil-[2-(2,6-dimetoxifenil)fenil]fosfina (24,33 mg, 33,77 μmol), dioxano (4,00 ml) y agua (4,00 ml) en la etapa A. La mezcla de reacción se cargó con nitrógeno tres veces, luego se calentó a 90-100°C y se agitó durante 2 h. La mezcla se enfrió vertiéndola en agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía preparativa en gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol 30/1) para proporcionar (E)-3-(6-(2-(5-cloro-6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il)-[1,2,4] triazolol[1,5-a]piridin-5-il) acrilonitrilo (120,00 mg, rendimiento: 88,43%).

Etapa C: (E)-3-(6-(2-(5-cloro-6-metilpiridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b] pirazol-3-il)-[1,2,4] triazolol[1,5-a]piridin-5-il)acrilonitrilo (120,00 mg, 298,62 μmol) se disolvió en un disolvente mezclado de dimetilsulfóxido (2 ml) y agua (1 ml), a continuación se añadieron sucesivamente peróxido de hidrógeno (338,54 mg, 2,99 mmol) e hidróxido de sodio (2 mol/l, 597,24 μl). La mezcla de reacción se agitó a 15-20°C durante 12 h. El seguimiento por LCMS demostró que la reacción no se completó. Luego la mezcla de reacción se calentó a 40-50°C y se agitó durante 2 h. El seguimiento por LCMS indicó la finalización de la reacción. La mezcla se inactivó vertiéndola en agua (10 ml) y se extrajo con diclorometano (30 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (columna: Phenomenex Synergi C18 150 x 30 mm x 4 μm ; fase móvil: [agua (ácido fórmico al 0,225%)-ACN]; gradiente: 24%-54%, 12 min) para dar la realización 12 (21,46 mg, rendimiento: 15,72%). ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 8,56 (s, 1H), 8,06 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,73-7,61 (m, 4H), 4,34 (br d, J = 6,0 Hz, 2H), 2,94-2,85 (m, 2H), 2,73 (br s, 2H), 2,17 (s, 3H).

Experimento 1: Ensayo de actividad inhibidora de TGF β -RI *in vitro*

Método experimental:

- 1) Compuesto de ensayo: la IC₅₀ se determinó diluyendo en 10 puntos de gradiente con cada gradiente por dilución triple y con una concentración inicial de 5 μM .
- 2) La IC₅₀ del compuesto de referencia LDN193189 se determinó diluyendo en 10 puntos de gradiente con cada gradiente por dilución triple y con una concentración inicial de 20 μM .
- 3) El sistema de reacción contiene ATP 10 μM .
- 4) Calcular el valor de IC₅₀ por ajuste de curva cuando el porcentaje de actividad enzimática (en comparación con el grupo disolvente) es inferior al 65% a la concentración más alta de la muestra.

Resultados experimentales: Véase la tabla 1

Conclusión: El compuesto de la presente invención tiene una excelente actividad inhibidora *in vitro*.

Tabla 1

Muestra	IC ₅₀ de TGF- β RI	Muestra	IC ₅₀ TGF- β RI
Realización 1	A	Realización 7	B
Realización 2	B	Realización 8	B
Realización 3	B	Realización 9	B
Realización 4	B	Realización 10	B
Realización 5	B	Realización 11	C
Realización 6	B	Realización 12	C

[Nota] El intervalo de los valores de IC₅₀ se muestran como sigue: 50 nM \geq A \geq 1 nM; 500 nM \geq B $>$ 50 nM; C $>$ 500 nM.

Experimento 2: Ensayo de inhibición de la proliferación en células embrionarias de ratón NIH/3T3

Principio experimental:

El ensayo de viabilidad celular luminiscente de Promega (método CellTiter-Glo®, es decir, detección y análisis de actividad de fluorescencia de ATP), el compuesto se agrega a la placa de cultivo celular para la incubación. Se añadió

un tampón de sustrato para detectar el contenido de ATP intracelular el día de la detección. Agitar ligeramente y centrifugar a 1.000 rpm durante 1 min. Se analiza después de dejar en reposo durante 10 min. La placa de ensayo se analizó usando el marcador enzimático multifuncional Envision de PerkinElmer, Inc., y el modo de análisis fue detección de fluorescencia, y los datos se expresaron mediante la lectura de la señal de quimioluminiscencia a 400-700 nm.

Etapas experimentales

1) Cuando la cobertura de crecimiento celular era de aproximadamente el 70%, la capa celular se lavó con 10 ml de tampón de fosfato de Duchenne (D-PBS) que no contiene calcio ni magnesio, luego se agregaron 2 ml de digesto tripsina-EDTA al 0,25%. El matraz de cultivo celular se colocó en un incubadora con dióxido de carbono CO₂ a 37°C y se incubó durante 3-5 minutos, a continuación se agregaron 8 ml de medio de cultivo completo que contenía células FBS DMEM al 2%, y las células se hincharon uniformemente en organismos unicelulares y se contaron con el citómetro Vi-cell y /La suspensión celular NIH/3T3 se diluyó a $0,375 \times 10^5$ células / ml.

2) Se añadieron 50 µl de medio que contenía DMEM al 2% alrededor de la placa de cultivo celular de 384 pocillos, a continuación se añadieron 40 µl de suspensión celular a los pocillos restantes a 1500 células por pocillo. La distribución de las células se observó al microscopio, y las placas celulares se colocaron en una incubadora de cultivo celular con CO₂ al 5% a 37°C.

3) La dilución del compuesto se refiere a la preparación del compuesto.

4) Se añadió manualmente una mezcla de suero bovino fetal al 2% que contenía 1 ng/ml de TGF-β1 en medio DMEM a la placa intermedia del compuesto, 20 µl por pocillo.

5) La placa intermedia del compuesto se agitó ligeramente durante 10 segundos a 1000 rpm/min y se centrifugó durante 10 segundos.

6) 10 µl del líquido mezclado de las etapas 4 y 5 de cada pocillo se transfirió a la placa celular inoculada a un volumen final de 50 µl usando una estación de trabajo con líquido Bravo, y la concentración final de TGF-β1 se diluyó a 0,2 ng/ml, y se centrifugó durante 10 segundos a 1.000 rpm/min. Las placas se colocaron en una incubadora con dióxido de carbono al 5% a 37°C, dióxido de carbono al 5% durante 72 h. La concentración final del compuesto es: (unidad: µM)

30	9,488	3,001	0,949	0,300	0,095	0,030	0,009	0,003
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

7) La placa celular que contenía el compuesto se cultivó en una incubadora celular con CO₂ al 5% a 37°C durante 3 días.

8) Después de eso, se agregaron 25 µl de solución de detección de actividad de fluorescencia ATP a cada pocillo de la placa celular, luego se agitó suavemente durante aproximadamente 1 minuto y se centrifugó a 500 rpm/min durante aproximadamente 30 segundos, y la lectura se realizó en un instrumento Envision después de dejar en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos en la oscuridad.

Resultados experimentales: véase la tabla 2

Tabla 2

Muestra	Inhibición de la proliferación en NIH3T3 IC ₅₀	Muestra	Inhibición de la proliferación en NIH3T3 IC ₅₀
Realización 1	A	Realización 6	A
Realización 2	B	Realización 8	B
Realización 3	B	Realización 9	A
Realización 4	B	Realización 10	B
Realización 5	C		

[Nota] El intervalo de los valores IC₅₀ se muestran de la siguiente manera: $2 \mu M \geq A \geq 0,5 \mu M$; $5 \mu M \geq B > 2 \mu M$; $C > 5 \mu M$.

Conclusión: El compuesto de la presente invención tiene una excelente actividad inhibidora de la proliferación celular NIH3T3.

Experimento 3: Experimento de inhibición de la proliferación de células tumorales en un modelo de tumor en ratón

BALB/c de células CT-26 tumorales de cáncer rectal de ratón trasplantadas por vía subcutánea en combinación con BioXcell-mPD-L1

Diseño del experimento:

- 5 La tabla siguiente enumera los grupos de animales y el régimen de dosis de la realización 1, el compuesto de referencia positivo LY2157299 y el anticuerpo monoclonal BioXcell PD-L1 (BioXcell-mPD-L1), que se usan solos o en combinación *in vivo*. Véase la tabla 3.

Tabla 3 Grupos de animales y régimen de agrupación

Grupo	Numero de ratones	Tratamiento con compuesto	Dosis (mg/kg)	Parámetro de volumen de dosis (µl/g)	Vía de administración	Frecuencia de administración
1	12	Control de disolventes	-	10	bucal	Dos veces al día × 3 semanas
2	12	Realización 1	75	10	bucal	Dos veces al día × 3 semanas
3	12	LY2157299	75	10	bucal	Dos veces al día × 3 semanas
4	12	BioXcell-mPD-L1	10	10	IP	Dos veces por semana × 3 semanas
5	12	Realización 1 + BioXcell-mPD-L1	75+10	10	bucal + IP	Dos veces al día × 3 semanas + dos veces a la semana × 3 semanas
6	12	LY2157299 + BioXcell-mPD-L1	75+10	10	bucal + IP	Dos veces al día × 3 semanas + dos veces a la semana × 3 semanas

Métodos y etapas experimentales:

- 10 1) Cultivo celular Se cultivaron *in vitro* en una sola capa células CT-26 de cáncer de colon de ratón, y las condiciones de cultivo son medio RPMI1640 (Medio nº 1640, Roswell Parker Memorial Institute) enriquecido con suero fetal bovino al 10% a 37°C, CO₂ al 5%. El paso se digirió habitualmente con tripsina-EDTA dos veces por semana. Cuando la saturación celular es del 80% al 90%, las células se recogen, cuentan y se inoculan.

2) Inoculación de células tumorales

- 15 0,1 ml (1 × 10⁵) de células CT-26 se inocularon por vía subcutánea en la parte posterior derecha de cada ratón BALB/c. A los ratones se les administró en grupos según el peso corporal de los ratones el segundo día después de la inoculación celular.

3) Medida tumoral e indicadores experimentales

- 20 El indicador experimental es investigar si el crecimiento tumoral se ha inhibido, retrasado o curado. Los diámetros tumorales se midieron con calibradores Vernier dos veces a la semana. El volumen del tumor se calcula como: $V = 0,5a \times b^2$ y a y b representan los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente.

- 25 El efecto antitumoral del compuesto se evaluó por TGI (%) o proporción de proliferación tumoral T/C (%). El TGI (%) refleja la proporción de inhibición del crecimiento tumoral. Cálculo de TGI (%): $TGI (\%) = [(1 - (\text{volumen tumoral medio al final de la administración de un grupo de tratamiento} - \text{volumen tumoral medio al comienzo de la administración del grupo de tratamiento})) / (\text{volumen tumoral medio en el final del tratamiento del grupo de referencia de disolvente} - \text{volumen tumoral medio al inicio del tratamiento del grupo de referencia de disolvente})] \times 100\%$.

Proporción de proliferación tumoral T/C (%): la fórmula es la siguiente: $T/C\% = T/C \times 100\%$ (T: grupo de tratamiento; C: grupo de referencia negativa).

- 30 Los pesos tumorales se midieron después del final del experimento y se calculó el porcentaje de T/C_{peso} . T_{peso} y C_{peso} representan los pesos tumorales del grupo administrado con el fármaco y el grupo de referencia del vehículo, respectivamente.

4) Colección de muestras PK

El día 20 después de la administración, la administración se realizó según el régimen de dosis.

5 Se dividieron doce ratones en 4 grupos y se recogió sangre a las 0,25, 1, 1,5, 4 y 8 h después de la última administración; se sacrificaron los ratones a 0,25, 1, 4 y 8 h para recolectar tumores e hígado. Se colocó sangre completa en un tubo de 0,5 ml con anticoagulante EDTA-2K, se centrifugó a 7.000 rpm, 4°C durante 10 minutos para obtener plasma. Se colocó tejido tumoral en un criotubo de 10 ml. El plasma y los tejidos tumorales se transfirieron rápidamente a un congelador a -80°C para su almacenamiento.

5) Análisis estadístico

10 Análisis estadístico, que incluye la desviación media y típica (SEM) del volumen del tumor en cada punto de tiempo para cada grupo (para datos específicos véase la tabla 4). El grupo de tratamiento mostró el mejor efecto terapéutico el día 20 después de la administración al final del ensayo y, por lo tanto, se realizó un análisis estadístico basado en estos datos para evaluar la diferencia entre los grupos. Se utilizó la ensayo de la T para la comparación entre los dos grupos, y se utilizó el análisis de la variancia unidireccional para la comparación entre tres o más grupos. Si había una diferencia significativa en los valores de F, se usaba el método Gass-Howell para el ensayo. Si no hay una diferencia significativa en los valores de F, se utiliza el método Dunnet (2 lados) para el análisis. Todos los análisis de datos se realizaron con SPSS 17.0. Se consideró una diferencia significativa en $p < 0,05$.

Resultados experimentales:

1) Mortalidad, morbilidad y cambios de peso.

20 El peso corporal de los animales experimentales se utilizó como indicador de referencia para la determinación indirecta de la toxicidad del fármaco. Ninguno de los grupos a los que administró el fármaco en este modelo mostró pérdida de peso significativa, sin morbilidad ni muerte.

Los efectos de la realización 1, LY2157299 y BioXcell-mPD-L1 sobre el peso corporal del modelo de ratón BALB/c hembra con tumor por xenoinjerto subcutáneo de células CT-26 se muestran en la figura 1. Los puntos de datos representan el peso corporal medio dentro del grupo y las barras de error representan las desviaciones típicas (SEM).

25 2) Volumen tumoral

Los cambios en el volumen tumoral de ratones BALB/c hembras de células CT-26 trasplantadas por vía subcutánea después de la realización 1, el tratamiento con LY2157299 y BioXcell-mPD-LI se muestran en la tabla 4.

3) Curva de crecimiento tumoral

30 Las curvas de crecimiento tumoral de los ratones portadores de tumor modelo xenoinjerto de CT-26 después de la administración de la realización 1, LY2157299 y BioXcell-mPD-L1 se muestran en la figura. 2. Los puntos de datos representan el volumen tumoral medio dentro del grupo y las barras de error representan las desviaciones típicas (SEM).

Tabla 4 Volumen tumoral en diferentes momentos en cada grupo

Día de administración	Volumen tumoral (mm ³) ^a					
	Control de disolventes	Realización 1	LY2157299	BioXcell-mPD-L1	Realización 1+ BioXcell-mPD-L1	LY2157299 + BioXcell-mPD-L1
		75 mg/kg	75 mg/kg	10 mg/kg	75 mg/kg + 10 mg/kg	75 mg/kg + 10 mg/kg
10	156±20	102±19	98±14	205±24	99±12	120±16
13	608±62	339±89	446±104	808±169	357±72	404±94
15	1091±120	552±147	840±177	1160±243	517±118	661±147
17	1720±160	874±240	1256±257	1636±343	680±136	1012±238
20	2578±229	1331±394	2186±435	2218+502	975±193	1381±327

[Nota]. a. Promedio ± SEM.

Conclusión:

Este experimento evaluó la eficacia *in vivo* de la realización 1, la referencia positiva LY2157299 y BioXcell-mPD-L1 en un modelo de xenoinjerto CT-26 de cáncer de colon murino. Veinte días después del inicio de la administración, el volumen tumoral de los ratones con tumor en el grupo de referencia de disolvente alcanzó 2.578 mm³. La combinación de la realización 1 (75 mg/kg) y BioXcell-mPD-L1 (10 mg/kg) tuvo un efecto antitumoral significativo en comparación con el grupo de referencia con disolvente (T/C = 38%, TGI = 62,2%, $p = 0,012$), el volumen del tumor fue de 975 mm³; realización 1 (75 mg/kg), LY2157299 (75 mg/kg), BioXcell-mPD-L1 (10 mg/kg) solo, y las dosis combinadas de LY2157299 (75 mg/kg) y BioXcell-mPD-L1 (10 mg/kg) no demostraron ningún efecto antitumoral significativo en comparación con el grupo de referencia con disolvente. Los volúmenes tumorales fueron 1.331, 2.186, 2.218 y 1.381 mm³ respectivamente (T/C = 51%, 85%, 86% y 54%, $p = 0,071, 0,906, 0,932$ y $0,089$).

Experimento 4: Experimento de inhibición de metástasis de células tumorales en modelo de trasplante ortotópico de ratón BALB/c de células 4T1 de cáncer de mama de ratón

Método experimental:

1) Creación de un modelo de tumor 4T1 *in situ*:

Las células 4T1-Luc de cáncer de mama de ratón marcadas con fluorescencia se expandieron *in vitro*. Antes de recolectar las células, los ratones se anestesiaron con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. Después de anestesiarse a los ratones se fijaron, la piel abdominal se desinfectó con alcohol al 70%. 100 µl de tampón fosfato (que contiene $0,5 \times 10^6$ células 4T1-luc2) se inocularon en el lado izquierdo del cuarto par de almohadillas de grasa mamaria abdominal en ratones, y la incisión se suturó para desinfectar la piel. Los animales se mantienen calientes con una manta térmica, se observan hasta que se despiertan y se vuelven a poner en sus jaulas. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 mg/kg de buprenorfina para alivio del dolor 30 minutos antes de la cirugía y 6 horas después de la cirugía.

2) Plan de tratamiento del grupo:

El tercer día después del modelado, los animales se sometieron a detección de bioluminiscencia por diagnóstico por la imagen de datos infrarrojos, agrupados aleatoriamente según los valores de fluorescencia y se administraron según el siguiente protocolo experimental, véase la tabla 5.

3) Diseño experimental del criterio de valoración:

Para observar el efecto inhibitorio de la realización 1 sobre el crecimiento tumoral y la metástasis, el criterio de valoración experimental se diseñó para que fuera 30-35 días después de la administración, con referencia a los datos históricos del modelo. Al final del experimento, se diseccionaron el tumor *in situ* y varios tejidos de órganos, se pesó el tumor y se detectó la intensidad de fluorescencia de cada órgano por fluorescencia IVIS. La inhibición del crecimiento de los tumores ortotópicos se puede comparar por el peso del tumor *in situ* en el criterio de valoración experimental, y la curva de inhibición se genera a partir de los datos de medición del volumen del tumor dos veces por semana durante el experimento. La inhibición de la metástasis tumoral se determinó por la presencia o ausencia de detección de fluorescencia de cada órgano y el análisis de la intensidad de fluorescencia relativa.

Al final del experimento, se detectará el peso del tumor y se calculará la tasa de crecimiento relativo del tumor T/C (%); el volumen del tumor se calcula como: $V = 0,5a \times b^2$, y a y b representan los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Al mismo tiempo, se extrajeron el pulmón, el hígado, el bazo, el riñón, el intestino y la extremidad superior izquierda, y se detectó fluorescencia para determinar si había metástasis e intensidad y relación de metástasis.

El efecto antitumoral del compuesto se evaluó por la proporción de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) o la proporción relativa de crecimiento tumoral T/C (%).

Cálculo de TGI (%):

$TGI (\%) = [(1 - (\text{volumen tumoral medio al final de la administración de un grupo de tratamiento} - \text{volumen tumoral medio al comienzo de la administración del grupo de tratamiento})) / (\text{volumen tumoral medio en el final del tratamiento del grupo de referencia de disolvente} - \text{volumen tumoral medio al inicio de la administración del grupo de referencia de disolvente})] \times 100\%$.

Cálculo relativo de la proporción de crecimiento tumoral T/C (%):

$T/C (\%) = T_t (\text{grupo de tratamiento}) / C_t (\text{grupo de referencia}) \times 100\%$, T_t es el volumen tumoral medio en una determinada medición, y C_t tiene los mismos datos en el día.

Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA unidireccional. Si hay una diferencia significativa en los valores de F, se deben hacer comparaciones múltiples después del análisis ANOVA. Todos los datos en este experimento se analizaron utilizando SPSS 17.0. Se consideró una diferencia significativa a $p < 0,05$.

Tabla 5 Grupos de animales y posología

Grupo	Numero de ratones	Terapia con compuesto	Dosis (mg/kg)	Parámetro de volumen de dosis (µl/g)	Vía de administración	Frecuencia de administración
1	12	Control de disolventes	-	10	bucal	Una vez al día × 32
2	12	LY2157299	75	10	bucal	Una vez al día × 32
3	12	Realización 1	75	10	bucal	Una vez al día × 32

Resultados experimentales:

1) Cambios en el peso corporal del animal:

- 5 Los cambios relativos del peso corporal se calcularon en función del peso corporal del animal al comienzo de la dosificación, como se muestra en la figura 3. Los puntos de datos representan el cambio porcentual en el peso corporal promedio en el grupo, y las barras de error representan desviaciones típicas (SEM).

2) Efecto inhibitorio de la realización 1 sobre la incidencia de metástasis tumoral:

- 10 Al final del experimento, se despegó cada tejido de órgano y se midieron el diagnóstico por la imagen de fluorescencia y el registro del valor de intensidad de fluorescencia por IVIS durante 40 segundos de exposición en 8 min. Los resultados del diagnóstico por la imagen de fluorescencia de los tejidos probados de los 10 animales extirpados por los valores máximo y mínimo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Efecto del tratamiento de la realización 1 sobre la incidencia de metástasis tumoral en 4T1

Proporción de metástasis (%) ^a	Control de disolventes	LY2245035	Realización 1
Pulmón	100	100	100
Hígado	90	80	50
Bazo	30	10	0
Riñón	30	30	20
Intestino	80	60	60
Miembro superior	90	70	90

[Nota]: a. Número de animales con metástasis en cada grupo / número de animales en todo el grupo.

- 15 3) Inhibición de la realización 1 sobre la intensidad de metástasis tumoral en cada órgano:

Según el criterio de valoración experimental, el grupo referencia normalizó la intensidad de fluorescencia de cada grupo de órganos, y se obtuvo la relación de intensidad de fluorescencia relativa de cada grupo de órganos. La relación refleja el nivel de intensidad metastásica en los órganos correspondientes. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Efecto inhibitorio de la realización 1 sobre la intensidad metastásica de varios órganos

Área de metástasis (%) ^a	Control de disolventes	LY2245035	Realización 1
Pulmón	100	20	9
Hígado	100	31	10
Bazo	100	4	0
Riñón	100	121	67

Área de metástasis (%) ^a	Control de disolventes	LY2245035	Realización 1
Intestino	100	41	1
Miembro superior	100	54	12

[Nota]. a. Valor promedio de fluorescencia detectado por un órgano en el grupo administrado con el medicamento/valor promedio de fluorescencia detectado en un órgano del grupo de referencia

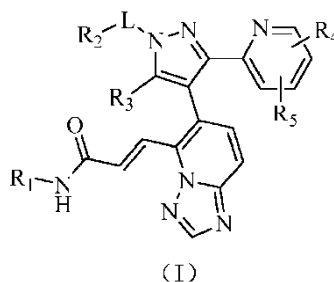
Conclusión:

5

Comparando los valores en la tabla de comparación, la realización 1 inhibió significativamente la metástasis de 4T1 en hígado, bazo, riñón e intestino, y el efecto inhibitor fue significativamente mejor que el del fármaco de referencia positiva. La realización 1 mostró una buena inhibición significativa en la aparición e intensidad de metástasis del tumor en tejidos de múltiples órganos y fue significativamente superior al fármaco de referencia positiva utilizado en este experimento.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptable,



en donde,

5 R₁ se selecciona entre hidrógeno, hidroxilo, amino o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₃ y cicloalquilo C₃₋₆, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, cicloalquilo C₃₋₆ y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

R₃ se selecciona entre hidrógeno o entre alquilo C₁₋₃ que está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

10 opcionalmente, R₂ y R₃ se unen para formar un anillo de 5-6 eslabones, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 o 3 R;

cada uno de R₄ y R₅ se selecciona independientemente entre hidrógeno, halógeno o se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₃ y heteroalquilo C₁₋₃, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R;

L se selecciona entre un enlace sencillo, -(CRR)₁₋₃-;

15 R- se selecciona de F, Cl, Br, I, CN, OH, NH₂, COOH o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo de 3 a 6 eslabones, fenilo y heteroarilo de 5 a 6 eslabones, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R';


R' se selecciona entre F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, COOH, Me, Et, CF₃, CHF₂, CH₂F, NHCH₃, N(CH₃)₂;



20 "hetero" se refiere a un heteroátomo o un grupo heteroatómico seleccionado entre el grupo que consiste en -C(=O)N(R)-, -N(R)-, -C(=NR)-, -S(=O)₂N(R)-, -S(=O)N(R)-, -O-, -S-, =O, =S, -O-N=, -C(=O)O-, -C(=O)-, -C(=S)-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -N(R)C(=O)N(R)-;

en cualquiera de los casos anteriores, el número del heteroátomo o el grupo heteroatómico se selecciona independientemente de 1, 2 o 3.

25 2. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1, en donde, R se selecciona entre F, Cl, Br, I, CN, OH, o entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R';

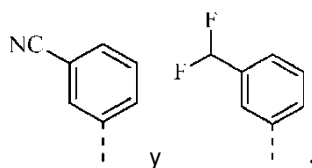
opcionalmente, R se selecciona entre el grupo que consiste en F, Cl, Br, I, CN, OH, metilo, CHF₂, etilo, propilo, ciclopropilo y fenilo.

30 3. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 1 o 2, en donde, R₁ se selecciona entre hidrógeno, o entre el grupo que consiste en metilo, etilo,  y el grupo está opcionalmente

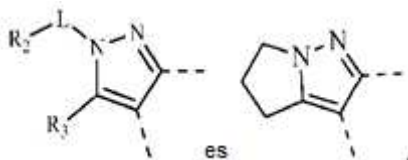
sustituido con 1, 2 o 3 R (s); opcionalmente, R₁ se selecciona entre hidrógeno, metilo, etilo,  

4. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 o 2, en donde, R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo y fenilo, y el grupo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R.

35 5. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 4, en donde, R₂ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo



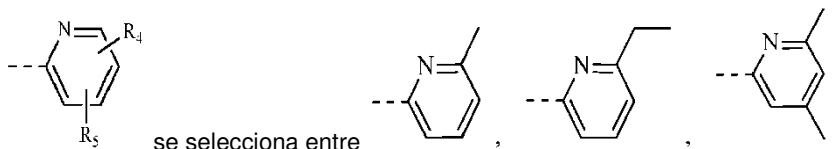
6. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 1 o 2, en



donde, R₂ y R₃ se unen, y el resto

7. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 o 2, en donde, cada uno de R₄ y R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, F, Cl, Br, metilo y etilo.

8. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 o 2, en



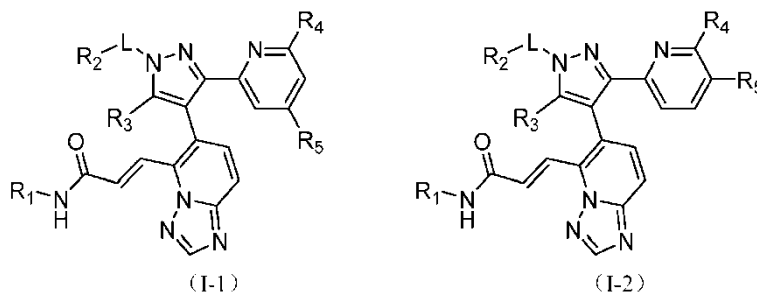
donde, el resto

se selecciona entre

9. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 o 2, en donde, L se selecciona entre un enlace sencillo y -(CH₂)₁₋₃-.

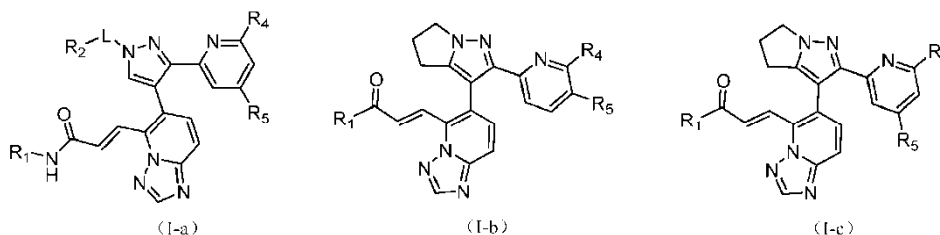
10. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 9, en donde, L se selecciona entre un enlace sencillo, -CH₂- y -CH₂CH₂-.

11. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según las reivindicaciones 1-10, el compuesto se selecciona entre



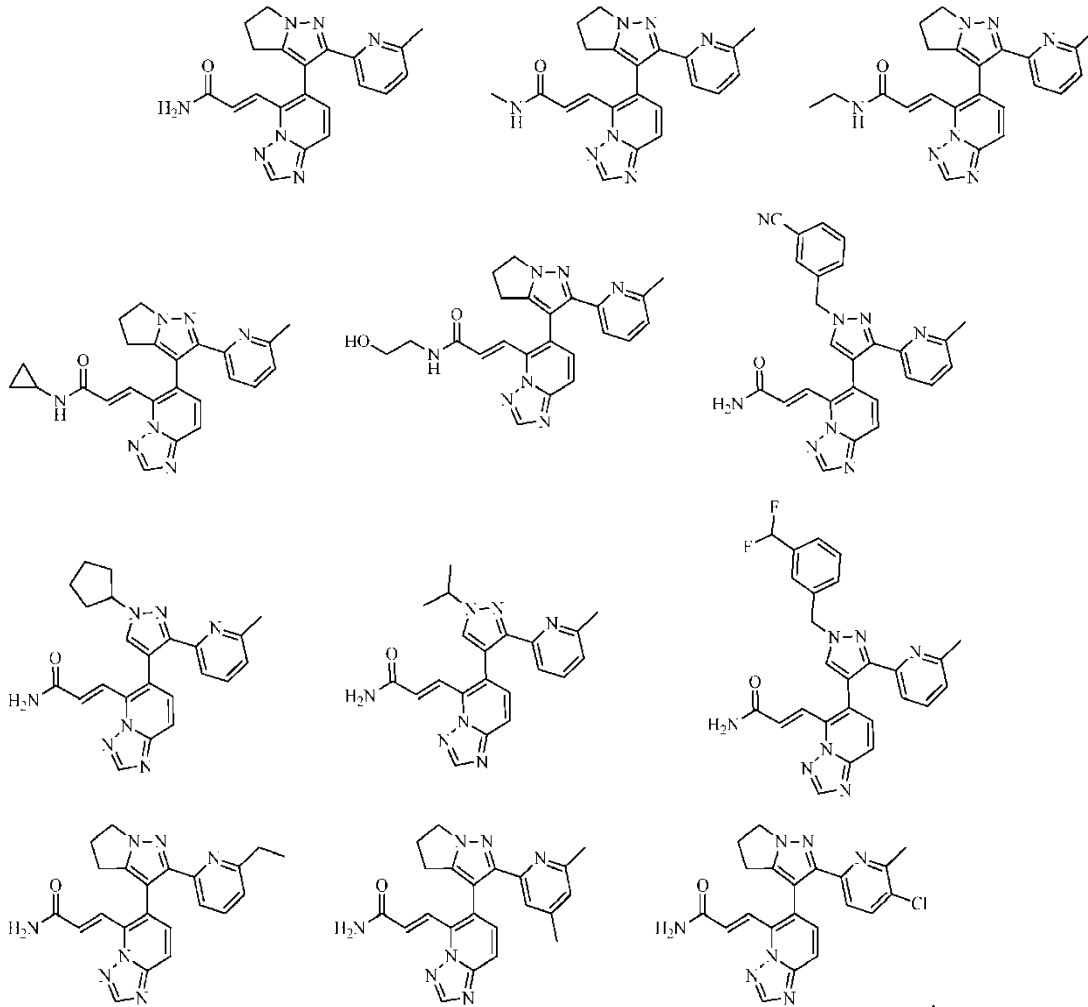
15. en donde, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y L se definen como cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y R₄ y R₅ no son hidrógeno simultáneamente.

12. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 11, el compuesto se selecciona entre



20. en donde, R₁, R₂, R₄, R₅ y L se definen como la reivindicación 11, y R₄ y R₅ no son ambos hidrógeno simultáneamente.

13. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 se selecciona entre el grupo que consiste en



5 14. Una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o la composición farmacéutica según la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento del cáncer, opcionalmente, el cáncer es cáncer de mama.

10

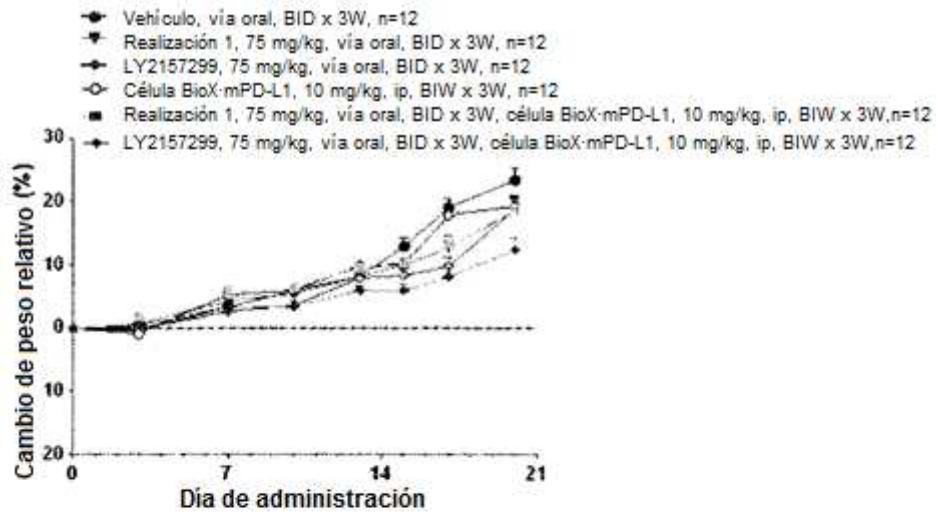


Figura 1

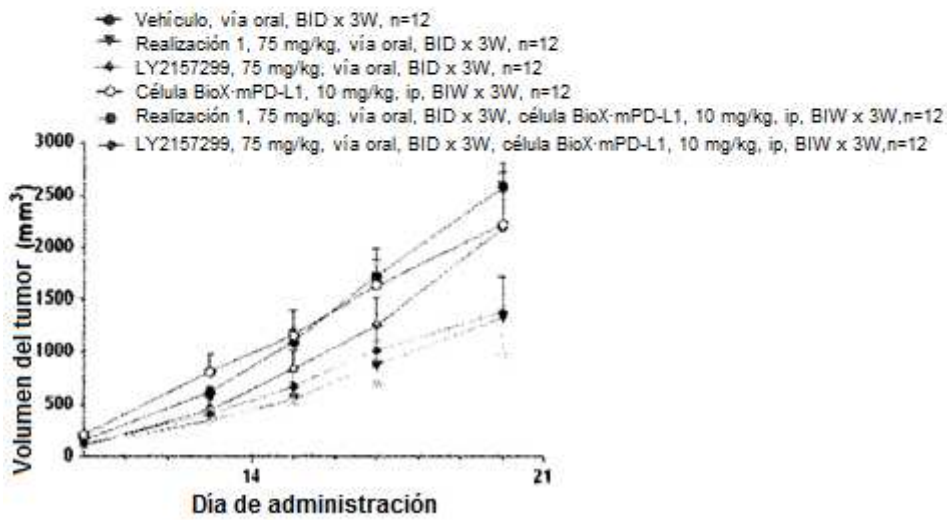


Figura 2

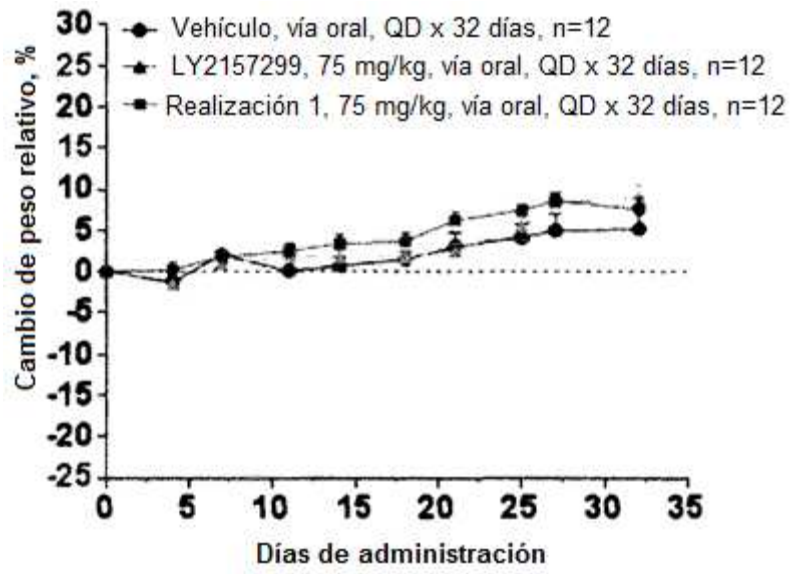


Figura 3