

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 562**

51 Int. Cl.:

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/433 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016 PCT/EP2016/079253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016 E 16805078 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3383872**

54 Título: **Compuestos de 1,3,4-tiadiazol y su uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

30.11.2015 US 201562260784 P

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

27.11.2020

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)
2 Redman Place, London
E20 1JG, GB**

72 Inventor/es:

**FINLAY, MAURICE, RAYMOND, VERSCHOYLE;
PERKINS, DAVID, ROBERT;
NISSINK, JOHANNES, WILHELMUS, MARIA;
RAUBO, PIOTR, ANTONI;
SMITH, PETER, DUNCAN y
BAILEY, ANDREW**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 796 562 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de 1,3,4-tiadiazol y su uso en el tratamiento del cáncer

5 Campo técnico

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

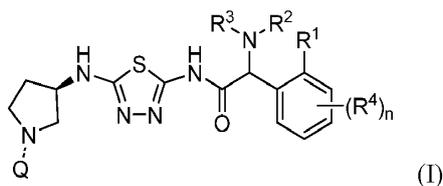
15 Antecedentes

La glutamina es el aminoácido plasmático más abundante y está involucrado en muchas trayectorias que promueven el crecimiento. Particularmente, la glutamina está involucrada en la oxidación en el ciclo TCA y en el mantenimiento del equilibrio redox celular, y proporciona además nitrógeno para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos (Curi y otros., Front. Biosci. 2007, 12, 344-57; DeBerardinis y Cheng, Oncogene 2010, 313 -324) Muchas células cancerosas dependen del metabolismo de la glutamina como consecuencia de los cambios metabólicos en la célula, que incluyen el efecto Warburg, donde el piruvato glicolítico se convierte en ácido láctico en lugar de usarse para crear acetil CoA (Koppenol y otros., Nature Reviews 2011, 11, 325-337). Como consecuencia de esta dependencia del metabolismo de la glutamina, estas células cancerosas son sensibles a los cambios en los niveles de glutamina exógena. Además, la evidencia existente sugiere que la glutaminólisis juega un papel clave en ciertos tipos de cáncer (Hensley y otros, J. Clin. Investir. 2013, 123, 3678- 3684), y se asocia con conductores oncogénicos conocidos como Myc (Dang, Cancer Res. 2010, 70, 859-863).

La primera etapa del catabolismo de la glutamina a glutamato se cataliza por la glutaminasa, que existe como dos isoformas, GLS1 y GLS2, originalmente identificadas como expresadas en el riñón y el hígado, respectivamente. Se sabe que la glutaminasa renal (GLS1) se expresa de manera más ubicua que la glutaminasa hepática (GLS2) y tiene 2 variantes de empalme, KGA y la isoforma GAC más corta, ambas ubicadas en las mitocondrias. (Elgadi y otros., Physiol. Genomics 1999, 1, 51-62; Cassago y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 2012, 109, 1092- 1097). La expresión de la GLS1 se asocia con el crecimiento tumoral y la malignidad en varios tipos de enfermedades (Wang y otros, Cancer Cell 2010, 18, 207-219; van der Heuvel y otros., Cancer Bio. Ther. 2012, 13, 1185- 1194). Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la GLS1 sean útiles en el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación con otros agentes anticancerígenos. Las patentes números US2014/0142081 y WO2013/078123 describen compuestos heterocíclicos útiles como los inhibidores de la glutaminasa.

40 Resumen

En un aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula (I):



50

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es piridazin-3-ilo, 6-fluoropiridazin-3-ilo;

R¹ es H;

R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6, o R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;

55

o R¹ y R² tomados juntos son -(CH₂)₂- y R³ es -CH₃;

R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y

n es 0, 1, o 2.

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

60

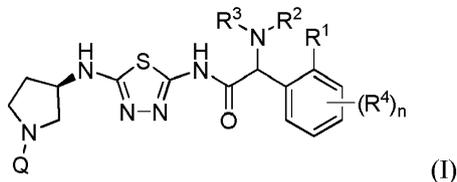
En otro aspecto, un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento del cáncer.

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

Descripción detallada

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

Se proporciona un compuesto de Fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Q es piridazin-3-ilo, 6-fluoropiridazin-3-ilo;

R¹ es H;

R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6, o R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;

o R¹ y R² tomados juntos son -(CH₂)₂- y R³ es -CH₃;

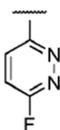
R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ o -CN; y

n es 0, 1, o 2.

Los anillos de piridazin-3-ilo y 6-fluoropiridazin-3-ilo tienen las siguientes estructuras:

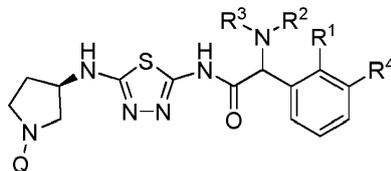


piridazin-3-ilo



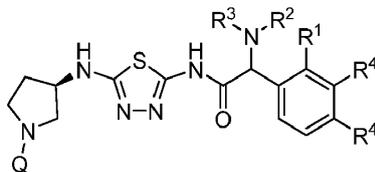
6-fluoropiridazin-3-ilo

En algunas modalidades, cuando n es 1, entonces R⁴ puede estar en la posición 3, es decir:



En algunas modalidades, cuando n es 1, entonces R⁴ puede estar en la posición 4, es decir:

En algunas modalidades, cuando n es 2, entonces una instancia de R⁴ puede estar en la posición 3, y la otra instancia de R⁴ puede estar en la posición 4, es decir:



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

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

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

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

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

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

20 Una modalidad adicional proporciona cualquiera de las modalidades definidas en la presente descripción (por ejemplo, la modalidad de la reivindicación 1) con la condición de que uno o más ejemplos específicos (por Ejemplo, uno, dos o tres Ejemplos específicos, o alternativamente un Ejemplo específico) seleccionados del grupo que consiste en los Ejemplos 1(a), 1(b), 2(a), 2(b), 3(a), 3(b), 4(a), 4(b), 5(a), 5(b), 6(a), 6(b), 7(a), 7(b), 8(a), 8(b), 9, 10, 11(a), 11(b), 12(a), 12(b), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 se rechazan individualmente.

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

Q puede ser piridazin-3-ilo.

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

n puede ser 0.

n puede ser 1.

40

n puede ser 2.

R¹ puede ser H

45 R¹ puede ser H, n puede ser 1 y R⁴ puede estar en la posición 3.

R¹ puede ser H, n puede ser 1, y R⁴ puede ser 3-metilo, 3-metoxi, 3-difluorometoxi, 3-trifluorometoxi o 3-ciano.

R¹ puede ser H, n puede ser 1 y R⁴ puede estar en la posición 4.

50

R¹ puede ser H, n puede ser 1 y R⁴ puede ser 4-fluoro o 4-metilo.

n puede ser 2.

55 R¹ puede ser H

R¹ puede ser H, n puede ser 1 y R⁴ puede estar en la posición 3.

R¹ puede ser H, n puede ser 1, y R⁴ puede ser 3-metilo, 3-metoxi, 3-difluorometoxi, 3-trifluorometoxi o 3-ciano.

60

R¹ puede ser H, n puede ser 1 y R⁴ puede estar en la posición 4.

R¹ puede ser H, n puede ser 1 y R⁴ puede ser 4-fluoro o 4-metilo.

65 R¹ puede ser H, n puede ser 2, una instancia de R⁴ puede estar en la posición 3 y la otra instancia de R⁴ puede estar en la posición 4.

- R¹ puede ser H, n puede ser 2 y una instancia de R⁴ es 3-trifluorometoxi, y la otra instancia de R⁴ es 4-fluoro.
- 5 R² y R³ pueden ser cada uno independientemente alquilo C1-C6;
- R² y R³ pueden ser cada uno independientemente metilo;
- R² y R³ tomados juntos pueden ser -(CH₂)₃-.
- 10 R¹ puede ser H
R¹ y R² tomados juntos pueden ser -(CH₂)₂- y R³ puede ser -CH₃.
R⁴ puede ser H.
- 15 R⁴ puede ser halo.
R⁴ puede ser fluoro.
R⁴ puede ser -CH₃.
- 20 R⁴ puede ser -OCH₃.
R⁴ puede ser -OCHF₂.
R⁴ puede ser -OCF₃.
- 25 R⁴ puede ser -CN.
- 30 En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:
Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R¹ es H;
R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6, o R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;
R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y
n es 0, 1, o 2.
- 35 En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:
Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R¹ es H;
R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6, o R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;
R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y
40 n es 1.
- 45 En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:
Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R¹ es H;
R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6, o R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;
R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y
n es 1, donde R⁴ está en la posición 3.
- 50 En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:
Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R¹ es H;
R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6;
R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y
n es 0, 1, o 2.
- 55 En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:
Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R¹ es H;
R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6;
60 R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y
n es 1, donde R⁴ está en la posición 3.
- 65 En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:
Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;
R¹ es H;
R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;

R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y
n es 0, 1, o 2.

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

Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;

R¹ es H;

R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃;

R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y

n es 1, donde R⁴ está en la posición 3.

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

Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;

R¹ y R² tomados juntos son -(CH₂)₂- y R³ es -CH₃;

R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y

n es 0, 1, o 2.

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

(2S)-2-(dimetilamino)-2-fenil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2R)-2-(dimetilamino)-2-fenil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-ilo]acetamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2R)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-ilo]acetamida;

(2R)-2-(azetidín-1-ilo)-2-(3-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-ilo]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida;

(2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-ilo]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida;

(1S)-2-metil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida;

(1R)-2-metil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-ilo]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(p-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(m-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2R)-2-(azetidín-1-ilo)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida;

(2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida; y

(2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida.

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

(2S)-2-(dimetilamino)-2-fenil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-2-(3-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida;

(1S)-2-metil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(p-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(m-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-

(trifluorometoxi)fenil]acetamida;

(2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida; y
(2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida.

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

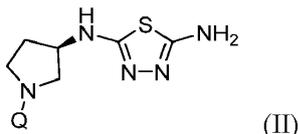
10 Los átomos de los compuestos y sales descritos en esta descripción pueden existir en diferentes formas isotópicas. La presente invención abarca todas las formas isotópicas de los compuestos de Fórmula (I) que incluyen un carbono ^{11}C o ^{13}C e hidrógeno ^1H , ^2H (deuterio) o ^3H (tritio).

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

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

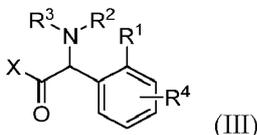
En una modalidad, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que es un diastereómero único que está en un exceso diastereomérico (% de) de $\geq 95\%$, $\geq 98\%$ o $\geq 99\%$. En una modalidad, el diastereómero único está presente en un exceso diastereomérico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

25 Los compuestos de Fórmula (I) pueden, por ejemplo, prepararse por la reacción de un compuesto de la Fórmula II):



30

donde Q se define anteriormente, con un compuesto de Fórmula (III):



35

40 donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se definen anteriormente y X es un grupo saliente, como un átomo de halógeno (por ejemplo, un átomo de cloro) o un grupo hidroxilo. La reacción se realiza convenientemente en un solvente adecuado (por ejemplo *N,N*-dimetilformamida o *N,N*-dimetilacetamida) y en presencia de una base (por ejemplo *di*-isopropil etilamina) a una temperatura adecuada. Las temperaturas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la temperatura ambiente (de aproximadamente $20\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $30\text{ }^\circ\text{C}$), temperatura reducida (por ejemplo, de aproximadamente $-77\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $0\text{ }^\circ\text{C}$) o temperatura elevada, por ejemplo, entre aproximadamente $80\text{ }^\circ\text{C}$ y $120\text{ }^\circ\text{C}$, donde X es un grupo hidroxilo, puede usarse un agente de acoplamiento adecuado (por ejemplo, HATU) para formar el enlace amida.

45

Los compuestos de Fórmula (III), y las sales de estos, por lo tanto, son útiles como Producto intermedios en la preparación de los compuestos de Fórmula (I) y proporcionan una modalidad adicional.

50 Los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) pueden prepararse por métodos similares a los mostrados en la sección de Ejemplos.

Una sal adecuada de un compuesto de Fórmula (III) es una sal de adición de base. Una sal de adición de base de un compuesto de Fórmula (III) puede formarse poniendo en contacto el compuesto con una base inorgánica u orgánica adecuada en condiciones conocidas por la persona experta. Dichas bases no necesitan generar sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, una sal de adición de base puede formarse mediante el uso de una base inorgánica tal como un hidróxido de metal alcalino (tal como hidróxido de sodio, potasio o litio) o un hidróxido de metal alcalino térreo (tal como hidróxido de calcio o hidróxido de magnesio). Una sal de adición de base puede formarse además, mediante el uso de una base orgánica tal como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina o tris-(2-hidroxi)etilamina.

60

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

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

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

En una modalidad, el cáncer es cáncer metastásico.

10 En una modalidad, el cáncer es cáncer no metastásico.

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

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

25 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto de Fórmula (I), como se describe en cualquiera de las modalidades en la presente descripción, que es eficaz para proporcionar terapia a un individuo. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva puede causar cualquiera de los cambios observables o medibles en un individuo como se describe en la definición de "terapia", "tratamiento" y "profilaxis" anterior. Por ejemplo, la cantidad efectiva puede reducir el número de células cancerígenas o tumorales; reducir el tamaño total del tumor; inhibir o detener la infiltración de las células tumorales en órganos periféricos, que incluyen, por ejemplo, los tejidos blandos y los huesos; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. Una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para disminuir los síntomas de una enfermedad sensible a la inhibición de la actividad de la GLS1. La eficacia para la terapia del cáncer *in vivo* puede, por ejemplo, medirse mediante la evaluación de la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad, las velocidades de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida. Como reconocen aquellos con experiencia en la técnica, las cantidades efectivas pueden variar en dependencia de la vía de administración, excipiente usado, y el uso compartido con otros agentes. Por ejemplo, donde se usa una terapia de combinación, la cantidad del compuesto de Fórmula (I) o la sal farmacéuticamente aceptable descrita en esta descripción y la cantidad de los otros agentes farmacéuticamente activos es, cuando se combinan, conjuntamente eficaces para tratar un trastorno dirigido en el paciente animal. En este contexto, las cantidades combinadas están en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si son, cuando se combinan, suficientes para disminuir los síntomas de una enfermedad sensible a la inhibición de la actividad de la GLS1 como se describió anteriormente. Típicamente, tales cantidades pueden determinarse por un experto en la técnica, por ejemplo, comenzando con el intervalo de dosificación descrito en esta descripción, para el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un intervalo de dosificación aprobado o publicado) de los otros compuestos farmacéuticamente activos. El término "profilaxis" pretende tener su significado normal e incluye la profilaxis primaria para prevenir el desarrollo de la enfermedad y la profilaxis secundaria de manera que, la enfermedad ya se ha desarrollado y el paciente está temporal o permanentemente protegido contra la exacerbación o el empeoramiento de la enfermedad.

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

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

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

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

65

Se describe además el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

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

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

15 Se describe además en la presente descripción el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por la GLS1. En una modalidad, la enfermedad mediada por la GLS1 es el cáncer. En algunas modalidades, el cáncer puede ser cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de páncreas, cáncer renal o cáncer hepatocelular.

20 En una modalidad se describe además, el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

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

25 En una modalidad, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para usar en un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita dicho tratamiento, que incluye administrar al animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, el cáncer puede ser cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de páncreas, cáncer renal o cáncer hepatocelular.

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

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

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

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

45 Se describe además, en la presente descripción, un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita dicho tratamiento, que incluye, administrar al animal de sangre caliente un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este y al menos una sustancia antitumoral adicional, en donde, las cantidades del compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y la sustancia antitumoral adicional son conjuntamente eficaces para producir un efecto anticancerígeno.

50 En una modalidad se describe un método para tratar el cáncer en un animal de sangre caliente que necesita dicho tratamiento, que incluye, administrar al animal de sangre caliente un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este y administrar al menos, simultánea, separada o secuencialmente, una sustancia antitumoral adicional al animal de sangre caliente, en donde, las cantidades del compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y la sustancia antitumoral adicional son conjuntamente eficaces para producir un efecto anticancerígeno.

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

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

De acuerdo con otra modalidad, se describe un estuche que comprende:

65 a) Un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en una primera forma de una dosificación unitaria;

b) Una segunda sustancia antitumoral en una segunda forma de dosificación unitaria;

- c) Un contenedor que contiene las formas de dosificación unitarias primera y segunda; y, opcionalmente,
d) Las instrucciones de uso.

5 El compuesto de Fórmula (I), y una sal farmacéutica mente aceptable de este, puede administrarse como composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En consecuencia, en una modalidad se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

20 En una modalidad se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en la terapia.

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

30 El compuesto de Fórmula (I) normalmente se administrará a un animal de sangre caliente en una dosis unitaria dentro del intervalo de 5-5000 mg/m² de área corporal del animal, es decir, aproximadamente 0,1-100 mg/kg, y esto normalmente proporciona una dosis terapéuticamente efectiva. Una forma de dosis unitaria, como una tableta o cápsula, generalmente contendrá, por ejemplo, 1-250 mg de ingrediente activo. La dosis diaria necesariamente variará en dependencia del huésped tratado, la vía particular de administración, cualquier terapia que se administre conjuntamente y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando. En consecuencia, el profesional que está tratando a un paciente en particular puede determinar la dosis óptima.
35

EJEMPLOS

Las diversas modalidades se ilustran mediante los siguientes ejemplos. La invención no debe interpretarse como limitada a los Ejemplos.
40

Durante la preparación de los ejemplos, generalmente:

- a) Las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, es decir en el intervalo de aproximadamente 17 a 30 °C y bajo una atmósfera de un gas inerte tal como nitrógeno a menos que se indique lo contrario;
45 b) Las evaporaciones se llevaron a cabo mediante evaporación rotativa o utilizando el equipo de Genevac al vacío y los procedimientos de tratamiento se llevaron a cabo después de la eliminación de los sólidos residuales por filtración;
c) Las purificaciones por cromatografía instantánea se realizaron en un Isco Combiflash Companion automatizado mediante el uso de columnas de sílice preempaquetadas Grace Resolve, e (instantánea de fase inversa) Isco Combiflash Rf mediante el uso de columnas RediSep Gold C18;
50 d) Los rendimientos, cuando están presentes, no son necesariamente los máximos alcanzables;
e) Las estructuras de los productos finales de Fórmula (I) se confirmaron por espectroscopía de masas después de resonancia magnética nuclear (RMN), con valores de desplazamiento químico de RMN medidos en la escala delta. Los espectros de resonancia magnética de protones se determinaron mediante el uso de un instrumento Bruker Avance 700 (700 MHz), Bruker Avance 500 (500 MHz), Bruker 400 (400 MHz) o Bruker 300 (300 MHz); ¹⁹F NMR se determinaron a 282 MHz o 376 MHz; ¹³C RMN se determinó a 75 MHz o 100 MHz; las mediciones se tomaron a aproximadamente 20 - 30 °C a menos que se especifique lo contrario; se usaron las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; m, multiplete; dd, doblete de dobletes; ddd, doblete de doblete de doblete; dt, doblete de trillizos; bs, señal amplia;
55 f) Los productos finales de Fórmula (I) se caracterizaron además por espectroscopía de masas después de cromatografía líquida (LCMS), mediante el uso de un sistema HPLC en base a un sistema LC Waters 2790/95 con un 2996 PDA y un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple ZQ de 2000 amu. Los solventes usados fueron A= agua, B= acetonitrilo, C= acetonitrilo:agua, ácido fórmico al 0,1%, 50:50 y D= acetonitrilo: agua, hidróxido de amonio al 0,1 %, 50:50. A un régimen de flujo de 1,1 mL/min, se inyectaron 5 µL de muestra en una columna Phenomenex Gemini NX de 50 x 2,1, 5 µm. El gradiente osciló de 95 % de A a 95 % de B durante 4,0 minutos con una infusión constante de 5 % de C (para el análisis de ácido, D se usa para el análisis de base). El flujo se mantuvo al 95 % de B durante 0,5 minutos antes de volver a las condiciones de inicio. Los datos se adquirieron de 150 a 850 amu en modo positivo y negativo en el espectrómetro de masas y a 220 -320 nm en el PDA. El LCMS se realizó además en un sistema UPLC utilizando una bomba binaria Waters Acquity con administrador de muestras, Acquity PDA y un espectrómetro de masas SQD. Los solventes usados
60
65

fueron A1 = ácido fórmico (ac) al 0,1 %, B1= ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo, A2 = hidróxido de amonio (ac) al 0,1 % y B2 hidróxido de amonio al 0,1 % en acetonitrilo. A un régimen de flujo de 1 mL/min, se inyectó 1 µL de muestra en una columna 50 x 2,1 Waters BEH de 1,7 µm (a 40 °C). El gradiente osciló del 97 % de A1 al 97% de B1 durante 1,30 minutos antes de mantenerse durante 0,2 minutos y volver a las condiciones de inicio (sustituya A1 y B1 por A2 y B2 para el análisis de base). Los datos se adquirieron de 150 - 1000 amu en modo iónico positivo y negativo en el espectrómetro de masas y de 245 -320 amu en el PDA;

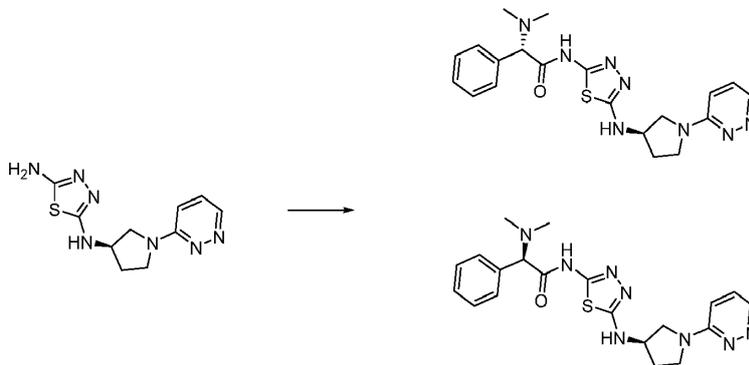
g) Generalmente los Producto intermedios no se caracterizaron por completo y la pureza se evaluó mediante el análisis cromatográfico de capa delgada, espectral de masas, HPLC y/o RMN;

h) Las siguientes abreviaturas se han usado: h = hora(s); r.t = temperatura ambiente (~17-30 °C); conc. = concentrado; FCC = cromatografía en columna instantánea mediante el uso de sílice; AIBN = azobisisobutironitrilo; DCM = diclorometano; DIPEA = *di*-isopropil etilamina; DMA = *N,N*-dimetilacetamida; DMF = *N,N*-dimetilformamida; DMSO = dimetilsulfóxido; EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; Et₂O = éter dietílico; EtOAc = acetato de etilo; EtOH = etanol; HATU = 1-*bis*(dimetilamino) metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-*b*] piridinio hexafluorofosfato de 3-óxidos; HOBT = hidroxibenzotriazol; K₂CO₃ = carbonato de potasio; MeOH = metanol; MeCN = acetonitrilo; MgSO₄ = sulfato de magnesio anhidro; Na₂SO₄ = sulfato de sodio anhidro; NBS = *N*-bromo succinimida; TFA = ácido trifluoroacético; THF = tetrahidrofurano; sat. = solución acuosa saturada.

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

Ejemplo 1(a) y 1(b)

(2*S*)-2-(Dimetilamino)-2-fenil-*N*-[5-[[3*R*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2*R*)-2-(dimetilamino)-2-fenil-*N*-[5-[[3*R*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



Se añadió HATU (866 mg, 2,28 mmol) al hidrocloreto de ácido 2-(dimetilamino)-2-fenil-acético (410 mg, 1,90 mmol), *N*'-[[3*R*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 500 mg, 1,90 mmol) y DIPEA (0,992 mL, 5,70 mmol) DMF (6 mL) a 0 °C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con metanol (5 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX de 20 g eluyendo con metanol para eliminar las impurezas no básicas seguido de una solución 3,5 N de amoniaco en metanol para extraer el producto. Los lavados metanólicos/amoniacaes que contenían el producto se evaporaron a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice (gradiente de elución de 0 a 9 % (NH₃/metanol 7N) en diclorometano). Las fracciones que contenían el producto se evaporaron para producir material crudo. El residuo se repartió entre 2-metiltetrahidrofurano y salmuera acuosa, la capa orgánica se lavó con salmuera acuosa dos veces antes de secarse (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para producir el producto (350 mg, 43,4 %) como una goma y una mezcla de diastereoisómeros.

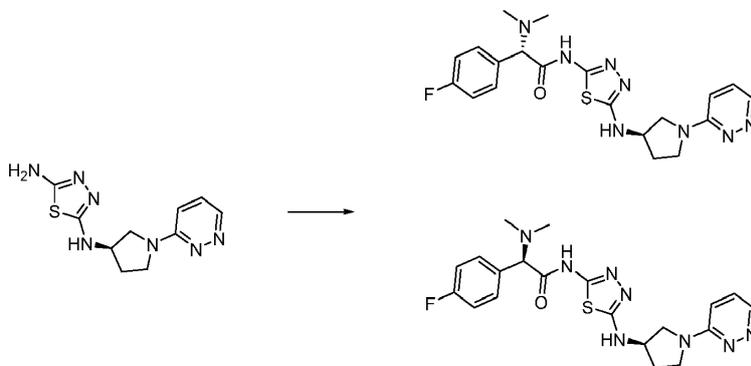
La mezcla se separó por HPLC quiral (columna C4, sílice de 20 micras, diámetro 4,6 mm, longitud 250 mm, heptano/EtOH-MeOH 60/40). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 1(a) como el primer isómero eluido (sólido, 128 mg, 37 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 1,99 - 2,09 (1H, m), 2,13 (6H, s), 2,21 - 2,33 (1H, m), 3,44 - 3,6 (3H, m), 3,73 (1H, dd), 4,06 (1H, s), 4,31 - 4,4 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,25 - 7,38 (4H, m), 7,45 (2H, dd), 7,64 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 12,13 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 425.

Ejemplo 1(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 137 mg, 39 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 2 - 2,1 (1H, m), 2,13 (6H, s), 2,22 - 2,32 (1H, m), 3,43 - 3,6 (3H, m), 3,73 (1H, dd), 4,06 (1H, s), 4,31 - 4,41 (1H, m), 6,84 (1H, dd), 7,27 - 7,38 (4H, m), 7,45 (2H, d), 7,64 (1H, d), 8,46 (1H, dd), 12,14 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 425.

Ejemplo 2(a) y 2(b)

(2S)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2R)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



Se añadió HATU (433 mg, 1,14 mmol) al hidrocloreto de ácido 2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-acético (222 mg, 0,95 mmol), *N*'-[5-[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 250 mg, 0,95 mmol) y DIPEA (0,496 mL, 2,85 mmol) en DMF (3 mL) a 0 °C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con metanol (5 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX de 20 g eluyendo con metanol para eliminar las impurezas no básicas seguido de una solución 3,5 N de amoníaco en metanol para extraer el producto. Los lavados metanólicos/amoniacaes que contenían el producto se evaporaron a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice, gradiente de elución de 0 a 9% (NH₃/metanol 7N) en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron para producir el producto. El residuo se repartió entre 2-metiltetrahidrofurano y salmuera acuosa, la capa orgánica se lavó con salmuera acuosa dos veces antes de secarse (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para producir el producto crudo como una mezcla de diastereoisómeros.

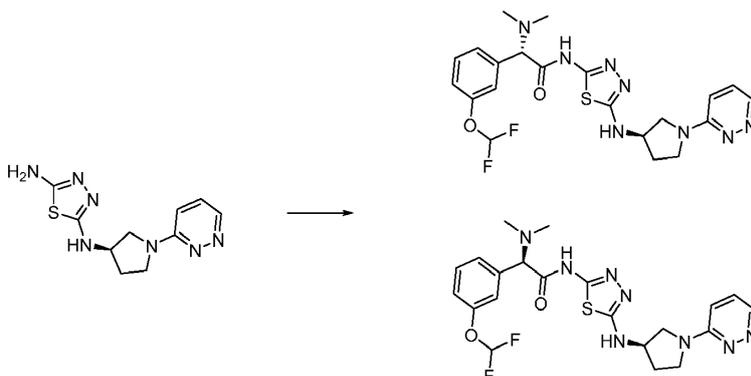
La mezcla se separó por HPLC quiral (Agilent 1100, columna IB, sílice de 20 micras/μm, diámetro 4,6 mm, longitud 250 mm, heptano/EtOH-MeOH, 60/40 como eluyente). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 2(a) como el primer isómero eluido (sólido, 98 mg, 33 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 2,01 - 2,1 (1H, m), 2,12 (6H, s), 2,21 - 2,34 (1H, m), 3,47 (1H, dd), 3,52 - 3,59 (2H, m), 3,73 (1H, dd), 4,07 (1H, s), 4,37 (1H, dq), 6,85 (1H, dd), 7,14 - 7,23 (2H, m), 7,31 (1H, dd), 7,44 - 7,51 (2H, m), 7,66 (1H, d), 8,46 (1H, dd), 12,18 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 443.

Ejemplo 2(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 100 mg, 33 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 2 - 2,1 (1H, m), 2,12 (6H, s), 2,21 - 2,33 (1H, m), 3,46 - 3,58 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,07 (1H, s), 4,31 - 4,41 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,15 - 7,22 (2H, m), 7,32 (1H, dd), 7,48 (2H, ddd), 7,66 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 12,17 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 443.

Ejemplo 3(a) y 3(b)

(2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



Se añadió HATU (416 mg, 1,09 mmol) a *N*-[(3*R*)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 240 mg, 0,91 mmol), ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)acético (Producto intermedio 9, 246 mg, 1,00 mmol) y DIPEA (0,159 mL, 0,91 mmol) en DMF (8 mL) a 21 °C bajo nitrógeno. La solución resultante se agitó a 21 °C durante 1 hora. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH₃/MeOH 1M y las fracciones puras se adsorbieron sobre sílice.

El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre sílice, (gradiente de elución de MeOH de 0 a 7 % en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar el producto como una goma amarilla y una mezcla de diastereoisómeros.

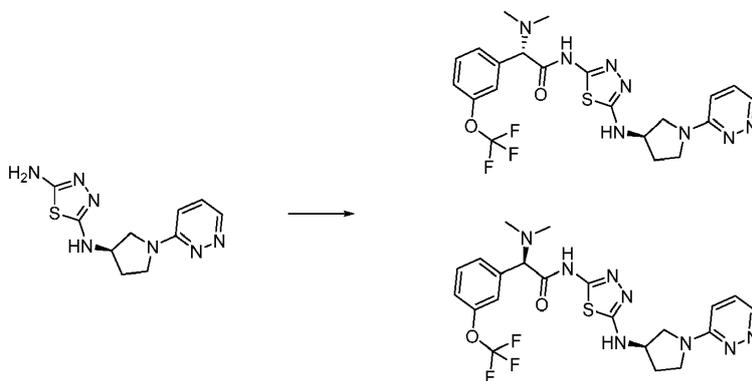
La mezcla se separó por HPLC (Agilent 1100, columna OJ, sílice de 20 micras μm, diámetro 50 mm, longitud 250 mm, MeCN/MeOH, 90/10 como eluyente). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 3(a) como el primer isómero eluido (sólido, 50 mg, 11 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,08 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,49 (6H, s), 3,39 - 3,61 (3H, m), 3,75 (1H, m), 4,37 (1H, m), 6,95 (1H, d), 7,13-7,22 (1H, d), 7,29 (1H, s), 7,33 - 7,42 (4H, m), 7,48 (1H, d), 7,77 (1H, m), 8,48 (1H, d), 12,20 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 491.

Ejemplo 3(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 57 mg, 1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,08 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,49 (6H, s), 3,39 - 3,61 (3H, m), 3,75 (1H, m), 4,37 (1H, m), 6,95 (1H, d), 7,13-7,22 (1H, d), 7,29 (1H, s), 7,33 - 7,42 (4H, m), 7,48 (1H, d), 7,77 (1H, m), 8,48 (1H, d), 12,19 (s, 1H); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 491.

Ejemplo 4(a) y 4(b)

(2*S*-2-(dimetilamino)-*N*-[5-[[3*R*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida y (2*R*)-2-(dimetilamino)-*N*-[5-[[3*R*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida



Se añadió HATU (3,00 g, 7,88 mmol) a *N*-[(3*R*)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 1,73 g, 6,57 mmol), ácido 2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 11, 2,248 g, 8,54 mmol) DIPEA (3,43 mL, 19,71 mmol) en DMF (30 mL) a 21 °C bajo nitrógeno. La solución resultante se agitó a 60 °C durante 1 hora. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH₃/MeOH 1M y las fracciones puras se adsorbieron sobre sílice. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice (gradiente de elución de NH₃/MeOH 1M, de 0 a 10 % en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar un sólido marrón como una mezcla de diastereoisómeros.

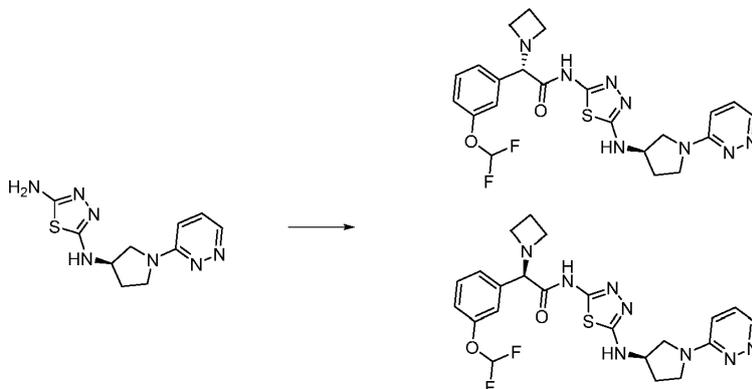
La mezcla se separó por HPLC (columna Chiral Technologies OD, sílice de 20 μm, diámetro de 100 mm, longitud de 250 mm, mezcla 50/50 de heptano/EtOH como eluyentes, velocidad de flujo de 450 mL/min). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 4(a) como el primer isómero eluido (sólido, 250 mg, 7 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 1,78 - 1,87 (1H, m), 1,91 (6H, s), 2 - 2,13 (1H, m), 3,14 - 3,41 (3H, m), 3,51 (1H, m), 3,91 (1H, s), 4,12 (2H, m), 6,62 (1H, dd), 7,09 (2H, dd), 7,17 - 7,35 (3H, m), 7,40 (1H, d), 8,24 (1H, dd); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 509.

Ejemplo 4(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 285 mg, 9 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,08 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,49 (6H, s), 3,39 - 3,61 (3H, m), 3,75 (1H, m), 4,37 (1H, m), 6,95 (1H, d), 7,13-7,22 (1H, d), 7,29 (1H, s), 7,33 - 7,42 (4H, m), 7,48 (1H, d), 7,77 (1H, m), 8,48 (1H, d); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 509.

Ejemplo 5(a) y 5(b)

(2S)-2-(azetidin-1-il)-2-[3-difluorometoxi]fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2R)-2-(azetidin-1-il)-2-[3-difluorometoxi]fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



Se añadió HATU (279 mg, 0,73 mmol) al ácido 2-(azetidin-1-il)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 13, 145 mg, 0,56 mmol), *N'*-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 148 mg, 0,56 mmol) y DIPEA (0,295 mL, 1,69 mmol) en *N*-metil-2-pirrolidinona (15 mL) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Esta solución se diluyó con metanol (15 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g eluyendo con metanol para eliminar las impurezas seguido de una solución IN de amoníaco en metanol para extraer el producto. El solvente se evaporó bajo presión reducida para producir el producto crudo. El producto crudo se disolvió en metanol/diclorometano y se evaporó sobre gel de sílice. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en sílice, (gradiente de elución de metanol del 0 a 6 % en diclorometano). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar el producto como una goma y una mezcla de diastereoisómeros.

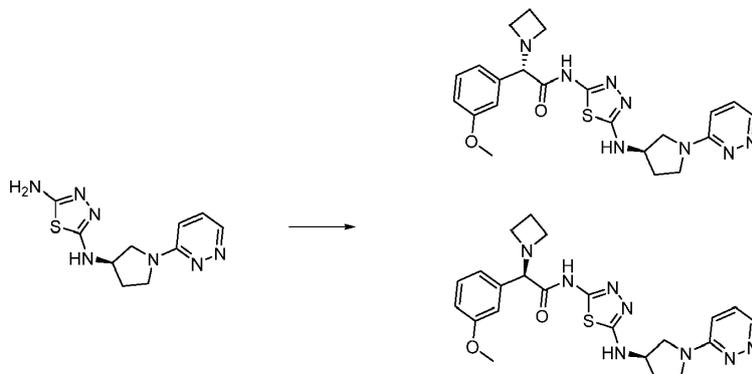
La mezcla se separó por HPLC (columna Phenomenex Lux IA, sílice de 20 μ m, diámetro 50 mm, longitud 250 mm, MeCN/MeOH, 95/05 a 120 mL/min). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 5(a) como el primer isómero eluido (sólido, 91 mg, 37 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,97 - 2,08 (3H, m), 2,23 - 2,31 (1H, m), 3,07 - 3,19 (4H, m), 3,46 - 3,6 (3H, m), 3,75 (1H, dd), 4,23 (1H, s), 4,37 (1H, dt), 6,86 (1H, dd), 7,03 - 7,44 (6H, m), 7,63 (1H, d), 8,48 (1H, dd), 12,00 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 503.

Ejemplo 5(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 43 mg, 17 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,97 - 2,11 (3H, m), 2,28 (1H, dt), 3,07 - 3,19 (4H, m), 3,48 (1H, dd), 3,52 - 3,6 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,23 (1H, s), 4,34 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,02 - 7,43 (6H, m), 7,63 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,98 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 503.

Ejemplo 6(a) y 6(b)

(2S)-2-(azetidin-1-il)-2-[3-metoxifenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2R)-2-(azetidin-1-il)-2-[3-metoxifenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



Se añadió HATU (413 mg, 1,09 mmol) al ácido 2-(azetidin-1-il)-2-[3-(metoxifenil]acético (Producto intermedio 17, 185 mg, 0,84 mmol), *N'*-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 220 mg, 0,84 mmol) y DIPEA (0,438 mL, 2,51 mmol) en *N*-metil-2-pirrolidinona (15 mL) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Esta solución se diluyó con metanol (15 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g eluyendo con metanol para eliminar las impurezas seguido de una solución IN de amoníaco en metanol para extraer el producto. El solvente se evaporó bajo presión reducida para producir el producto crudo. El producto crudo se disolvió en metanol/diclorometano y se evaporó sobre gel de sílice. El residuo se purificó por cromatografía instantánea

en sílice, (gradiente de elución de metanol del 0 a 12 % en diclorometano). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar el producto como un sólido y una mezcla de diastereoisómeros

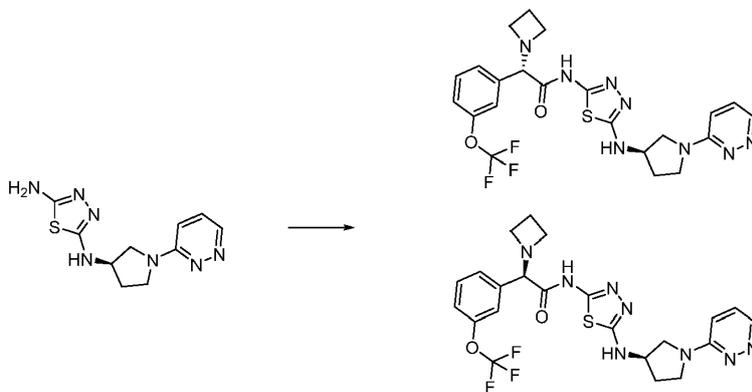
La mezcla se separó por HPLC (columna Phenomenex Lux IE, sílice de 20 μm , diámetro 50 mm, longitud 250 mm, eluyente EtOH a 120 mL/min). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 6(a) como el primer isómero eluido (sólido, 137 mg, 39 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,95 - 2,11 (3H, m), 2,22 - 2,32 (1H, m), 3,11 (4H, dq), 3,44 - 3,59 (3H, m), 3,71 - 3,77 (4H, m), 4,14 (1H, s), 4,36 (1H, dt), 6,82 - 6,88 (2H, m), 7,03 (1H, d), 7,06 (1H, d), 7,24 (1H, t), 7,31 (1H, dd), 7,61 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,86 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 467.

Ejemplo 6(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 67 mg, 19 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,95 - 2,09 (3H, m), 2,22 - 2,31 (1H, m), 3,04 - 3,17 (4H, m), 3,45 - 3,59 (3H, m), 3,71 - 3,78 (4H, m), 4,14 (1H, s), 4,33 - 4,4 (1H, m), 6,83 - 6,88 (2H, m), 7,03 (1H, d), 7,06 (1H, s), 7,25 (1H, t), 7,31 (1H, dd), 7,61 (1H, d), 8,47 (1H, d), 11,88 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 467.

Ejemplo 7(a) y 7(b)

(2S-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[3R]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida y (2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[3R]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida



Se añadió HATU (225 mg, 0,59 mmol) al ácido 2-(azetidín-1-ilo)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 20, 125 mg, 0,46 mmol), N '-[3R]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 120 mg, 0,46 mmol) y DIPEA (0,239 mL, 1,37 mmol) en N -metil-2-pirrolidinona (4 mL) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Esta solución se diluyó con metanol (15 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g eluyendo con metanol para eliminar las impurezas seguido de una solución 1N de amoniaco en metanol para extraer el producto. El solvente se evaporó bajo presión reducida para producir el producto crudo. El producto crudo se disolvió en metanol/diclorometano y se evaporó sobre gel de sílice. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en sílice, (gradiente de elución de metanol del 0 a 7 % en diclorometano). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar el producto como una goma y una mezcla de diastereoisómeros.

La mezcla se separó por HPLC (columna Chiral Technologies IA, sílice de 20 μm , diámetro 50 mm, longitud 250 mm, mediante el uso de una mezcla de MeCN/MeOH, 90/10, como eluyentes, velocidad de flujo 120 mL/min). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 7(a) como el primer isómero eluido (sólido, 72 mg, 38 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,95 - 2,09 (3H, m), 2,26 (1H, dt), 3,11 (4H, dq), 3,48 (1H, dd), 3,51 - 3,58 (2H, m), 3,74 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,36 (1H, dt), 6,85 (1H, dd), 7,28 - 7,34 (2H, m), 7,45 - 7,51 (3H, m), 7,64 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 12,09 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 521.

Ejemplo 7(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 79 mg, 42 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,96 - 2,11 (3H, m), 2,23 - 2,32 (1H, m), 3,05 - 3,16 (4H, m), 3,47 (1H, dd), 3,51 - 3,59 (2H, m), 3,73 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,36 (1H, dq), 6,84 (1H, dd), 7,27 - 7,33 (2H, m), 7,44 - 7,5 (3H, m), 7,63 (1H, d), 8,46 (1H, dd), 12,07 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 521.

Ejemplo 8(a) y 8(b)

(1S)-2-metil-N-[5-[[3R]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida y (1R)-2-metil-N-[5-[[3R]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida

65

5

10

15

20

25

30

35

40

45

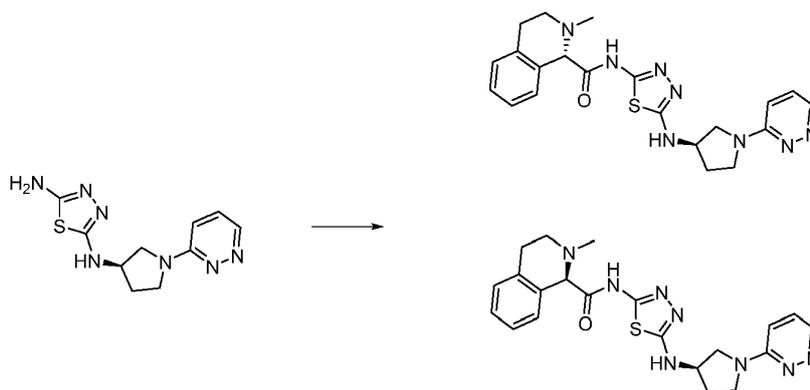
50

55

60

Ejemplo 10

65



Se añadió HATU (238 mg, 0,63 mmol) al ácido 2-metil-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolina-1-carboxílico, HCL Producto intermedio 24, 110 mg, 0,48 mmol), *N*-[(3*R*-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 127 mg, 0,48 mmol) y DIPEA (0,295 mL, 1,69 mmol) en *N*-metil-2-pirrolidinona (2 mL) y DMF (3 mL) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Esta solución se diluyó con metanol (15 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g eluyendo con metanol para eliminar las impurezas seguido de una solución IN de amoniaco en metanol para extraer el producto. El solvente se evaporó bajo presión reducida para producir el producto crudo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice (gradiente de elución de metanol del 0 % al 6 % en diclorometano). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar el producto como una goma y una mezcla de diastereoisómeros.

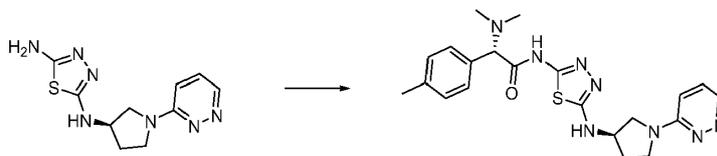
La mezcla se separó por HPLC (columna Phenomenex Lux C2, sílice de 20 μ m, diámetro 50 mm, longitud 250 mm, mediante el uso de EtOH como eluyente a una velocidad de flujo de 120 mL/min). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para proporcionar:

Ejemplo 8(a) como el primer isómero eluido (sólido, 49 mg, 43 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 2,02 - 2,11 (1H, m), 2,23 - 2,31 (1H, m), 2,37 (3H, s), 2,54 - 2,61 (1H, m), 2,78 (1H, dt), 2,95 (1H, dt), 3,18 - 3,25 (1H, m), 3,47 - 3,59 (3H, m), 3,75 (1H, dd), 4,35 (1H, s), 4,36 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,11 - 7,19 (4H, m), 7,32 (1H, dd), 7,65 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,95 (1H, s); *m/z*: ES^+ [M+H] $^+$ 437.

Ejemplo 8(b) como el segundo isómero eluido (sólido, 52 mg, 46 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 2,03 - 2,11 (1H, m), 2,23 - 2,32 (1H, m), 2,37 (3H, s), 2,54 - 2,62 (1H, m), 2,79 (1H, dt), 2,94 (1H, dt), 3,18 - 3,26 (1H, m), 3,42 - 3,59 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,35 (1H, s), 4,37 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,11 - 7,19 (4H, m), 7,31 (1H, dd), 7,65 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,97 (1H, s); *m/z*: ES^+ [M+H] $^+$ 437.

Ejemplo 9

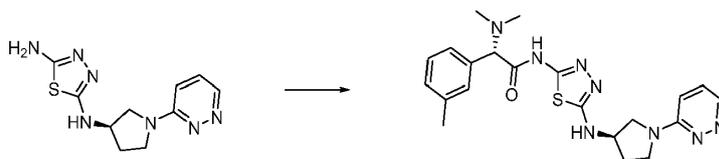
(2*S*)-2-(dimetilamino)-2-(4-metilfenil)-*N*-[5-[[*(3R)*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il] amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



Se añadió HATU (347 mg, 0,91 mmol) al ácido (2*S*)-2-(dimetilamino)-2-(*p*-tolilo)acético (Producto intermedio 26, 161 mg, 0,84 mmol), *N*[[*(3R)*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5 diamina (Producto intermedio 1, 200 mg, 0,76 mmol) y DIPEA (0,133 mL, 0,76 mmol) en DMA (7 mL) a 21 $^\circ\text{C}$ bajo nitrógeno. La solución resultante se agitó a 0 $^\circ\text{C}$ durante 45 minutos. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH_3/MeOH 1M y las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar el producto crudo como una goma. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre sílice, (gradiente de elución de MeOH del 0 a 10 % en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse, se trituraron con DCM/éter y se filtraron para proporcionar (2*S*)-2-(dimetilamino)-2-(4-metilfenil)-*N*-[5-[[*(3R)*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (109 mg, 33 %) como un sólido crema; ^1H RMN (400 MHz, DMSO, 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,25 (1H, m), 2,08 (1H, dt), 2,19 (6H, s), 2,24 - 2,36 (4H, m), 3,48 (1H, dd), 3,54 - 3,65 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,34 - 4,5 (1H, m), 6,86 (1H, dd), 7,18 (2H, d), 7,28 - 7,44 (3H, m), 7,66 (1H, d), 8,48 (1H, dd), 12,12 (1H, s); *m/z*: ES^+ [M+H] $^+$ 439.

Ejemplo 10

(2*S*)-2-(dimetilamino)-2-(3-metilfenil)-*N*-[5-[[*(3R)*]-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida



5

10

15

Se añadió HATU (416 mg, 1,09 mmol) al ácido (2S)-2-(dimetilamino)-2-(*m*-tolilo)acético (Producto intermedio 27, 194 mg, 1,00 mmol), *N*[[*(3R)*-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5 diamina (Producto intermedio 1, 240 mg, 0,91 mmol) DIPEA (0,159 mL, 0,91 mmol) en DMF (12 mL) a 21 °C bajo nitrógeno. La solución resultante se agitó a 0 °C durante 30 minutos. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH₃/MeOH 1M y las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar una goma. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre sílice, (gradiente de elución de metanol del 0 a 10 % en DCM). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse, se trituraron con DCM/éter y se filtraron para proporcionar (2S)-2-(dimetilamino)-2-(*m*-tolilo)-*N*-[5-[[*(3R)*-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (91 mg, 23 %) como un sólido crema; ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 1,25 (1H, m), 2,08 (1H, dq), 2,19 - 2,42 (10H, m), 3,49 (1H, dd), 3,57 (2H, td), 3,75 (1H, dd), 4,29 - 4,46 (1H, m), 6,88 (1H, dd), 7,19 (1H, s), 7,26 - 7,41 (4H, m), 7,71 (1H, s), 8,48 (1H, dd), 12,30 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 439.

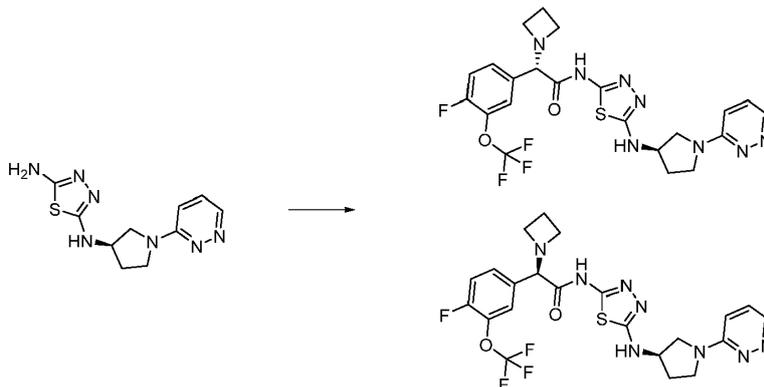
20

Ejemplo 11(a) y 11(b)

25

(2S)-2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-*N*-[5-[[*(3R)*-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida y (2R)-2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-*N*-[5-[[*(3R)*-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

30



35

40

*N*2-[[*(3R)*-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 28, Se disolvieron 0,09 g, 0,30 mmol) en DMF (2 mL) bajo N₂ a r.t. Se añadió [2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetil]oxilitio (Producto intermedio 1, 0,09 g, 0,307 mmol), seguido por DIPEA (0,08 mL, 0,46 mmol). La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de la adición de HATU (139,9 mg, 0,36 mmol), y luego durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH (1 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX de 5 g, se lavó con MeOH y luego se eluyó con NH₃ 2 M en MeOH. La fracción básica se evaporó y el residuo se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, velocidad de flujo 25 mL/min). Se usaron proporciones polares decrecientes de agua y MeCN que contenían ácido fórmico al 0,1 % como una fase móvil. Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron y se absorbieron en un cartucho SCX de 1 g que se lavó con MeOH y luego se eluyó con NH₃ 2 M en MeOH para dar 2-(azetidía-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi) fenil]-*N*-[5-[[*(3R)*-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida como un sólido blanco (88 mg, 53 %). Los diastereómeros se separaron mediante HPLC preparativa quiral (columna ChiralPak IA, sílice de 20 µm, diámetro 50 mm, longitud 250 mm), MeCN/MeOH, 90/10 a 120 mL/min. Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para dar:

55

Ejemplo 11(a) como el primer isómero eluido (35,4 mg, 21 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 1,97 - 2,1 (3H, m), 2,23 - 2,32 (1H, m), 3,06 - 3,17 (4H, m), 3,49 (1H, dd), 3,53 - 3,59 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,34 - 4,42 (1H, m), 6,86 (1H, d), 7,32 (1H, dd), 7,47 - 7,58 (2H, m), 7,64 (2H, dd), 8,48 (1H, d); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

60

Ejemplo 11(b) como el segundo isómero eluido (26,9 mg, 16 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 1,96 - 2,11 (3H, m), 2,23 - 2,34 (1H, m), 3,07 - 3,17 (4H, m), 3,48 (1H, dd), 3,53 - 3,6 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,33 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,32 (1H, dd), 7,47 - 7,57 (2H, m), 7,64 (2H, dd), 8,48 (1H, dd); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

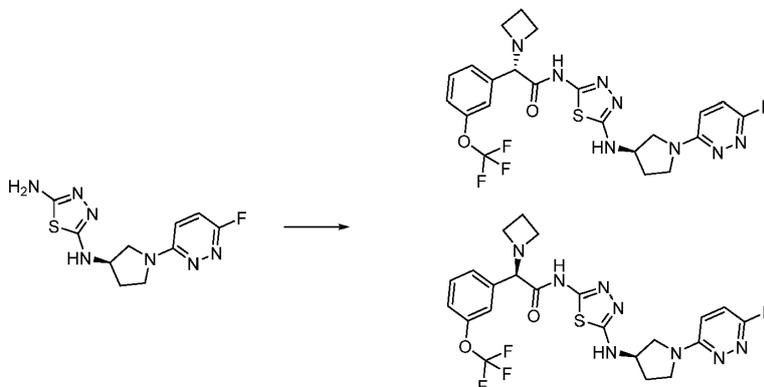
Ejemplo 12(a) y 12(b)

(2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida y (2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida

5

10

15



20

25

30

N2-[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 6, 0,11 g, 0,38 mmol) y [2-(azetidín-1-ilo)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetil]oxilitio (Producto intermedio 21, 0,13 g, 0,46 mmol) se disolvieron en DMF (2 mL) a temperatura ambiente bajo N₂. La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de la adición de DIPEA (0,34 mL, 1,943 mmol) y HATU (0,4 mL, 0,389 mmol) y luego a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla bruta se absorbió en una columna SCX de 5 g que se lavó con MeOH y luego se eluyó con NH₃ 2 M en MeOH. La fracción básica se evaporó para dar una goma naranja. La fracción básica se evaporó y el residuo se purificó por HPLC preparativa (columna SunFire C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, velocidad de flujo 25 mL/min). Se usaron proporciones polares decrecientes de agua y MeCN que contenían ácido fórmico al 0,1 % como una fase móvil. Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron y se absorbieron en un cartucho SCX de 1 g que se lavó con MeOH y luego se eluyó con NH₃ 2 M en MeOH para dar 2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida como un sólido blanco. Los diastereómeros se separaron mediante HPLC preparativa quiral (columna Chiralpak IC, sílice de 20 µm, diámetro 50 mm, longitud 250 mm), heptano/EtOAc 20/80 (+TEA al 0,2 %) a 120 mL/min. Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron hasta secarse para dar:

35

Ejemplo 12(a) como el primer isómero eluido (28,60 mg, 13 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 2,04 - 2,18 (3H, m), 2,34 (1H, dt), 3,20 (4H, dq), 3,54 (1H, dd), 3,58 - 3,67 (2H, m), 3,81 (1H, dd), 4,35 (1H, s), 4,4 - 4,48 (1H, m), 7,23 (1H, dd), 7,35 - 7,4 (1H, m), 7,42 (1H, dd), 7,53 - 7,55 (1H, m), 7,57 (2H, d), 7,71 (1H, d), 12,07 (1H, s); m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

40

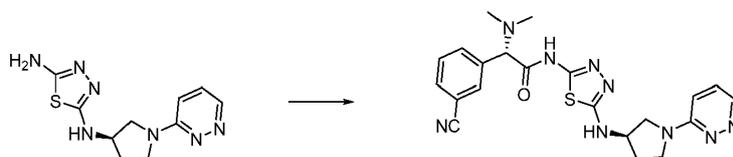
Ejemplo 12(b) como el segundo isómero eluido (13,5 mg, 6 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) 1,96 - 2,1 (3H, m), 2,28 (1H, dt), 3,13 (4H, dq), 3,46 (1H, dd), 3,51 - 3,59 (2H, m), 3,74 (1H, dd), 4,28 (1H, s), 4,34 - 4,41 (1H, m), 7,16 (1H, dd), 7,29 - 7,32 (1H, m), 7,34 (1H, dd), 7,47 - 7,49 (1H, m), 7,50 (2H, d), 7,64 (1H, d), 12,00 (1H, s); m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

Ejemplo 13

45

(2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-il]pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida

50



55

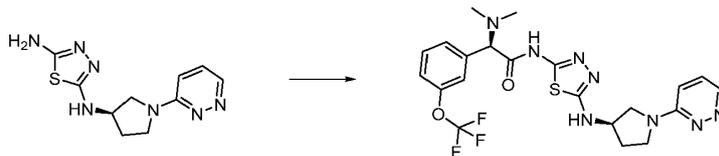
60

N2-[(3R)-1-piridazina-3-il]pirrolidina-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 0,09 g, 0,30 mmol) se disolvió en DMF (2 mL) bajo N₂ a temperatura ambiente. Se añadió ácido (2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)acético (Producto intermedio 32, 0,06 g, 0,307 mmol), seguido de DIPEA (0,08 mL, 0,46 mmol). La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de la adición de HATU (139,9 mg, 0,368 mmol), y luego se dejó agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH (1 mL) y se pasó a través de un cartucho SCX de 5 g, se lavó con MeOH y luego se eluyó con NH₃ 2 M en MeOH. La fracción básica se evaporó y se purificó mediante HPLC preparativa (columna XBridge OBD C18, 5 µm, 50 mm x 19 mm, velocidad de flujo de 25 mL/min, proporciones polares decrecientes de agua y MeCN que contenía 0,3 mL/L de NH₄OH se usaron como una fase móvil. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar (2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-il]pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida como un sólido beige (43 mg, 31 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2,09 - 2,02 (1H, m), 2,14 (6H, d), 2,32 - 2,24 (1H, m), 3,60 - 3,43 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,17 (1H, s), 4,38 (1H, q), 6,87 (1H, ddd), 7,33 (1H, ddd), 7,60 (1H, td), 7,71 (1H, d), 7,80 (2H, ddq), 7,87 (1H, t), 8,48 (1H, dt), 12,30 (1H, s); m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 450.

65

Ejemplo 14

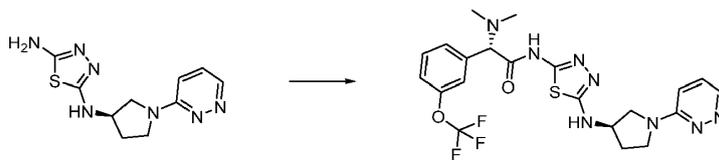
(2R)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida



Se agregó DIPEA (0,199 mL, 1,14 mmol) a N2-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 150 mg, 0,57 mmol), ácido (2R)-2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 38, 150 mg, 0,57 mmol), EDC (218 mg, 1,14 mmol) y HOBT (87 mg, 0,57 mmol) en DMF (4 mL) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 h. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, sílice 5 µm, diámetro 50 mm, longitud 150 mm), mediante el uso de mezclas cada vez más polares de agua y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron hasta secarse para proporcionar (2R)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida (15 mg, 5 %) como un sólido marrón. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 30 °C) δ 2,27-2,35 (m, 1H), 2,44-2,56 (m, 1H), 2,88 (s, 6H), 3,72-3,84 (m, 3H), 3,97-4,03 (m, 1H), 4,54-4,59 (m, 1H), 5,16 (s, 1H), 7,50-7,73 (m, 5H), 7,84-7,88 (m, 1H), 8,53 (s, 1H); m/z: ES⁻ [M-H]⁻ 507.

Ejemplo 18

(2S)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida



Se agregó DIPEA (0,199 mL, 1,14 mmol) a N2-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina (Producto intermedio 1, 150 mg, 0,57 mmol), ácido (2S)-2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 39, 150 mg, 0,57 mmol), EDC (218 mg, 1,14 mmol) y HOBT (87 mg, 0,57 mmol) en DMF (4 mL) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 horas. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, sílice 5 µm, diámetro 50 mm, longitud 150 mm), mediante el uso de mezclas cada vez más polares de agua y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron hasta secarse para proporcionar (2S)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida (15 mg, 5 %) como un sólido marrón. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 30 °C) δ 2,28-2,35 (m, 1H), 2,45-2,59 (m, 1H), 2,86 (s, 6H), 3,69-3,77 (m, 1H), 3,77-3,84 (m, 2H), 3,95-4,01 (m, 1H), 4,56-4,58 (m, 1H), 5,12 (s, 1H), 7,49-7,69 (m, 5H), 7,79-7,84 (m, 1H), 8,51 (d, 1H); m/z: ES⁻ [M-H]⁻ 507.

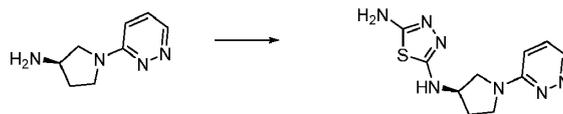
Ejemplos adicionales

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

Núm. de Ejemplo	Nombre	Datos de MS
14	(2R)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida	m/z (ES ⁺), [M-H] ⁻ = 507
15	(2R)-2-(dimetilamino)-2-(4-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES ⁺), [M+H] ⁺ = 455
16	(2S)-2-(dimetilamino)-2-(4-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES ⁺), [M+H] ⁺ = 455
17	(2S)-2-(dimetilamino)-2-(o-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida	m/z (ES ⁺), [M+H] ⁺ = 439
18	(2S)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida	m/z (ES ⁺), [M-H] ⁻ = 507

Producto intermedio 1

N-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina



5

10

En un frasco de fondo redondo de 1 L se colocó una solución de diclorhidrato de (3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-amina (Producto intermedio 2, 10,5 g, 44,29 mmol) en DMF (400 mL), 5-bromo-1,3,4-tiadiazol-2-amina (7,94 g, 44,10 mmol) y DIPEA (17,07 g, 132,08 mmol). La solución se agitó durante 4 h a 80 °C. La mezcla resultante se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante recristalización en etanol/EtOAc para dar *N*-[(3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina como un sólido amarillo claro (11 g, 94 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 30 °C) δ 2,04 (1H, td), 2,22 - 2,31 (1H, m), 3,43 - 3,62 (3H, m), 3,72 (1H, dd), 4,28 (1H, dq), 6,27 (2H, s), 6,86 (1H, dd), 7,07 (1H, d), 7,33 (1H, dd), 8,48 (1H, dd). *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 264,28.

15

Se preparó además el Producto intermedio 1 a gran escala de acuerdo con el siguiente método alternativo:

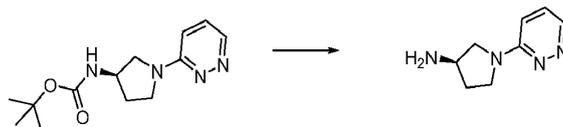
20

(*R*)-1-(piridazina-3-ilo)pirrolidin-3-amina (Producto intermedio 3, forma de base libre, 25,5 g, 150,63 mmol) y 5-bromo-1,3,4-tiadiazol-2-amina (29,8 g, 165,70 mmol) con DIPEA (39,4 mL, 225,95 mmol) se agitó como una suspensión en MeOH (200 mL) a 45 °C. La suspensión se enfrió a 20 °C y el sólido se aisló por filtración al vacío. Se usaron 50 mL de MeOH como lavado de desplazamiento de la torta del filtro y luego se secó durante la noche en el horno de vacío a 40 °C. Se obtuvo el Producto intermedio 1 (32,9 g, 83 %) como un polvo beige que fluye libremente.

Producto intermedio 2

25

Diclorhidrato de (3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-amina



30

35

En un frasco de fondo redondo de 1 L se colocó una solución de *N*-[(3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]carbamato de *tert*-butilo (Producto intermedio 4, 20 g, 75,66 mmol) en dioxano (200 mL) y HCl concentrado (100 mL). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró al vacío. El producto crudo se recristalizó en MeOH/EtOAc en una proporción de 1:2. Esto resultó en diclorhidrato de (3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-amina como un sólido blanco (13,4 g, 75 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 26 °C) δ 2,25 - 2,43 (2H, m), 3,66 - 3,74 (1H, m), 3,78 - 3,90 (3H, m), 4,02 - 4,10 (1H, m), 7,75 (1H, d), 7,94 (1H, dd), 8,66 (1H, d), 8,77-8,98 (3H, brn). *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 165.

40

El Producto intermedio 3 (forma de base libre) se preparó además de acuerdo con el siguiente método:

45

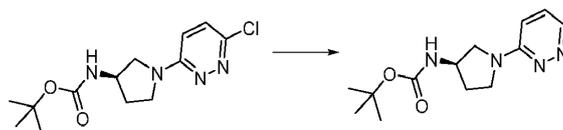
N-[(3*R*)-1-(6-cloropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]carbamato de *tert*-butilo (Producto intermedio 5, 20 g, 107,38 mmol) en piridina (400 mL) se mezcló con hidróxido de paladio sobre carbono (catalizador de Pearlman, 27,5 g, 25,84 mmol) y 1-metil-1,4-ciclohexadieno (31,0 mL, 276,13 mmol) en MeOH (1375 mL). La mezcla de reacción se calentó después a 65 °C durante 90 minutos. Con la conversión completa observada, la reacción se enfrió nuevamente a temperatura ambiente y el catalizador se eliminó por filtración. Luego se cargó HCl 3 M en MeOH (184 mL, 552,27 mmol) a la mezcla de reacción, y la solución se calentó a 65 °C durante 1 h. Con la conversión completa observada, la solución de reacción se enfrió nuevamente a temperatura ambiente y se pasó a través de columnas SCX de 10 x 50 g que se habían eluido previamente con MeOH. El compuesto se liberó del SCX mediante el uso de NH₃ 1 M en MeOH. La solución resultante se diluyó con tolueno (1 L) y se concentró hasta secarse a través de la evaporación rotatoria para dar un sólido que fluye libremente. (3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-amina se aisló a una resistencia de 97 % p/p como la base libre.

50

Producto intermedio 4

55

N-[(3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]carbamato de *tert*-butilo



60

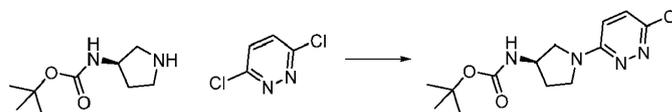
65

En un frasco de fondo redondo de 2 L se colocó una solución de *N*-[(3*R*)-1-(6-cloropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]carbamato de *tert*-butilo (Producto intermedio 5, 23 g, 76,98 mmol) en MeOH (800 mL) y paladio sobre carbono (2 g). El sistema se purgó y se mantuvo con gas hidrógeno. La solución resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. Los sólidos se filtraron. La mezcla resultante se concentró al vacío para dar *N*-[(3*R*)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]carbamato de *tert*-butilo (20 g, 84 %) como un sólido amarillo. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 24 °C) δ 1,44 (9H, s), 2,25 - 2,35 (2H, m), 3,48 -

3,56 (1H, m), 3,70 - 4,10 (3H, m), 4,35 - 4,42 (1H, m), 7,26 - 7,32 (1H, m), 7,70 - 7,75 (1H, m), 8,53 - 8,55 (1H, m). *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 265.

Producto intermedio 5

N-[(3*R*)-1-(6-cloropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-il]carbamato de *tert*-butilo

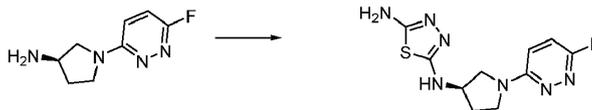


En un frasco de fondo redondo de 1 L se colocó una solución de *N*-[(3*R*)-pirrolidina-3-ila]carbamato de *tert*-butilo (20 g, 107,38 mmol) en piridina (400 mL) y 3,6-dicloropiridazina (16 g, 107,40 mmol). La solución resultante se agitó durante toda la noche a reflujo. La mezcla resultante se concentró al vacío. El producto crudo se purificó por recristalización en etanol/Et₂O en la proporción de 1:3 para dar *N*-[(3*R*)-1-(6-cloropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-il]carbamato de *tert*-butilo (23 g, 72 %) como un sólido amarillo.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30 °C) δ 1,45 (9H, s), 2,02 (1H, dq), 2,31 (1H, td), 3,41 (1H, dd), 3,54 - 3,70 (2H, m), 3,78 (1H, dd), 4,37 (1H, s), 4,76 (1H, s), 6,61 (1H, d), 7,17 (1H, d). *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 299.

Producto intermedio 6

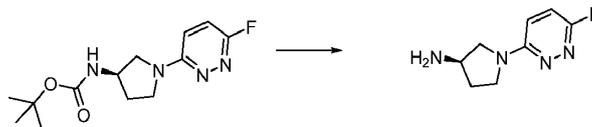
*N*2-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-il]-1,3,4-tiadiazol-2,5-diamina



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

Producto intermedio 7

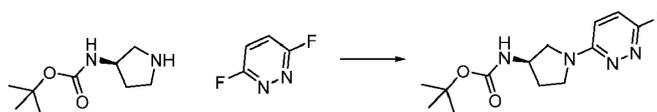
(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-amina



Se añadió *N*-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-il]carbamato de *tert*-butilo (Producto intermedio 8, 6 g, 21,25 mmol) a DCM (70 mL) y TFA (14,00 mL) a 25 °C. La solución resultante se agitó a 25 °C durante 4 h. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de una columna SCX. El producto deseado se eluyó de la columna mediante el uso de NH₃ 1 M en MeOH y las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar (3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-amina (2,0 g, 52 %) como un sólido gomoso amarillo pálido. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 30 °C) δ 1,55 - 1,83 (1H, m), 1,98 - 2,13 (1H, m), 2,89 - 3,14 (1H, m), 3,29 - 3,43 (1H, m), 3,54 (3H, dtd), 7,06 (1H, dd), 7,30 (1H, dd). *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 183.

Producto intermedio 8

N-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidina-3-il]carbamato de *tert*-butilo

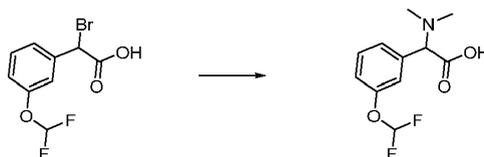


Una mezcla de 3,6-difluoropiridazina (6,06 g, 52,21 mmol), *N*-[(3*R*)-pirrolidina-3-il]carbamato de *tert*-butilo (9,72 g, 52,21 mmol), DIPEA (22,80 mL, 130,53 mmol) y *n*-butanol (140 mL) se agitó a 130 °C durante 10 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (750 mL) y se lavó con agua (150 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó

para obtener el producto crudo. Esto se disolvió luego en DCM y el producto crudo se purificó por FCC (SiO₂, EtOAc 30 - 65 % en heptanos). Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para obtener *N*-[(3*R*)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidina-3-il]carbamato de *tert*-butilo (15 g, 102 %) como un sólido crema. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30 °C) δ 1,46 (9H, s), 1,91 - 2,13 (1H, m), 2,32 (1H, dq), 3,40 (1H, dd), 3,56 - 3,72 (2H, m), 3,78 (1H, dd), 4,37 (1H, s), 4,70 (1H, s), 6,78 (1H, dd), 6,98 (1H, dd). *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 283.

Producto intermedio 9

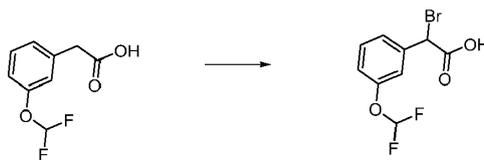
Ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)acético



Se añadió dimetilamina 2 M en THF (0,623 mL, 1,25 mmol) al ácido 2-bromo-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acético (Producto intermedio 10, 350 mg, 1,25 mmol) y DIPEA (0,665 mL, 3,74 mmol) en MeCN (8 mL) a 21 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se evaporó luego para dar el ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)acético crudo como una goma marrón que se usó cruda para las etapas posteriores; *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 246.

Producto intermedio 10

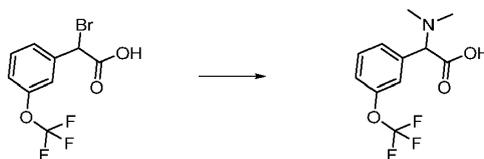
Ácido 2-bromo-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acético



El ácido 2-(3-(difluorometoxi)fenil)acético (263 mg, 1,30 mmol) y NBS (255 mg, 1,43 mmol) se disolvieron en cloroformo (10 mL) y se calentaron a 80 °C. A esto se agregó (*E*)-2,2'-(diazeno-1,2-diil)bis(2-metilpropanonitrilo) (10,68 mg, 0,07 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 3 h. Luego se añadió NBS adicional (120 mg) y la reacción se dejó a reflujo durante 1,5 horas adicionales. La reacción se dejó luego a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió NBS adicional (60 mg) y la reacción se calentó a 80 °C durante 1 hora adicional. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el cloroformo se eliminó a presión reducida, dejando el ácido 2-bromo-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acético que se usó crudo en reacciones posteriores, *m/z*: ES⁻ [M-H]⁻ 279.

Producto intermedio 11

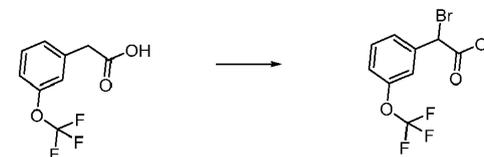
Ácido 2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético



Se añadió dimetilamina 2 M en THF (7,94 mL, 15,88 mmol) al ácido 2-bromo-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (Producto intermedio 12, 4,75 g, 15,88 mmol) y DIPEA (8,48 mL, 47,65 mmol) en MeCN (75 mL) a 21 °C, dando una ligera exotermia. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego la reacción se evaporó para dar el ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)acético crudo como una goma marrón que se usó bruta para las etapas posteriores; *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 264.

Producto intermedio 12

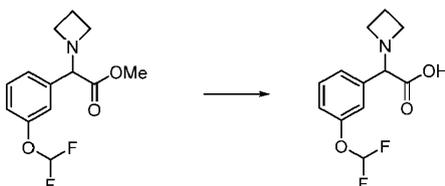
Ácido 2-bromo-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético



El ácido 2-(3-(trifluorometoxi)fenil)acético (3,5 g, 15,90 mmol) y NBS (3,11 g, 17,49 mmol) se disolvieron en cloroformo (100 mL) y se calentaron a 80 °C. A esto se agregó (*E*)-2,2'-(diazeno-1,2-diil)bis(2-metilpropanonitrilo) (0,131 g, 0,79 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 6 h. Luego la reacción se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego se evaporó el disolvente para dar el ácido 2-bromo-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético crudo que se usó sin ninguna purificación adicional. *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 297.

Producto intermedio 13

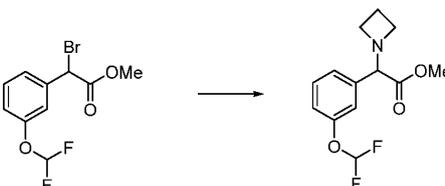
Ácido 2-(azetidín-1-il)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]acético



Se añadió una solución de hidróxido de litio monohidrato (96 mg, 2,29 mmol) en agua (3 mL) a una solución de 2-(azetidín-1-il)-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo (Producto intermedio 14, 310 mg, 1,14 mmol) en metanol (6 mL) y la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ajustó luego a pH 4 mediante la adición de HCl acuoso 2 M. La solución se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g, eluyendo con metanol seguido de una solución 1N de amoníaco en metanol para extraer el producto. El disolvente se evaporó a presión reducida para producir ácido 2-(azetidín-1-il)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]acético (290 mg, 99 %) como una goma; ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,18 (2H, p), 3,56 (2H, q), 3,75 (2H, q), 4,44 (1H, s), 7,12 (1H, dd), 7,17 (1H, s), 7,20 (1H, t), 7,23 (1H, d), 7,38 - 7,43 (1H, m); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 258.

Producto intermedio 14

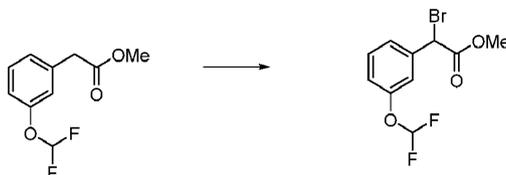
2-(azetidín-1-il)-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo



Se añadió gota a gota una solución de trietilamina (263 µl, 1,89 mmol) y azetidín (98 mg, 1,72 mmol) en MeCN (2 mL) a una solución a 0 °C de 2-bromo-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo (Producto intermedio 15 507 mg, 1,72 mmol) en MeCN (5 mL). La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre la salmuera acuosa y el acetato de etilo, la capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 2-(azetidín-1-il)-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo (310 mg, 67 %) como un líquido; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 30 °C) δ 2,12 (2H, p), 3,17 (2H, q), 3,28 (2H, q), 3,68 (3H, s), 4,02 (1H, s), 6,52 (1H, t), 7,04 - 7,08 (1H, m), 7,20 (1H, d), 7,25 - 7,28 (1H, m), 7,33 (1H, t); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 272.

Producto intermedio 15

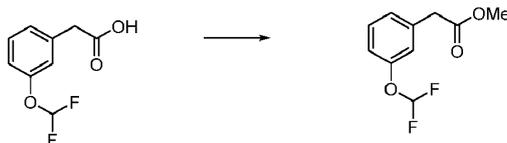
2-bromo-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo



Una mezcla de 2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo (Producto intermedio 16 1,1 g, 5,09 mmol) y NBS (0,951 g, 5,34 mmol) y (*E*)-2,2'-(diazeno-1,2-diil)bis(2-metilpropanonitrilo) (0,042 g, 0,25 mmol) en tetracloruro de carbono (20 mL) se calentó a reflujo durante 4 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. El sólido se filtró y se desechó, y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. La purificación se realizó por cromatografía rápida sobre sílice (gradiente de elución de acetato de etilo al 0-5 % en heptano). Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida para dar 2-bromo-2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo (0,830 g, 55 %) como un líquido. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30 °C) δ 3,80 (3H, s), 5,32 (1H, s), 6,52 (1H, t), 7,11 (1H, dt), 7,32 - 7,4 (3H, m). *m/z*: GC EI M⁺ 293,9701.

Producto intermedio 16

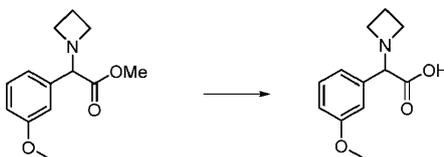
2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo



Una solución de ácido 2-(3-(difluorometoxi)fenil)acético (1 g, 4,95 mmol) y ácido sulfúrico (10,87 μ l, 0,20 mmol) en metanol (30 mL) se calentó a reflujo durante 2 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se particionó entre el acetato de etilo y el bicarbonato de sodio acuoso. La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 2-(3-(difluorometoxi)fenil)acetato de metilo (1,1 g, 103 %) como un aceite. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30 °C) δ 3,63 (2H, s), 3,70 (3H, s), 6,50 (1H, t), 7,01 - 7,07 (2H, m), 7,11 - 7,15 (1H, m), 7,31 (1H, t). *m/z*: GC EI M+ 216,0593.

Producto intermedio 17

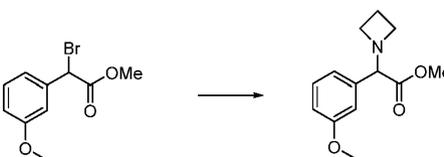
Ácido 2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)acético



Se añadió una solución de hidróxido de litio (64,1 mg, 2,68 mmol) en agua (3 mL) a una solución de 2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)acetato de metilo (Producto intermedio 18 420 mg, 1,79 mmol) en metanol (6 mL) y la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ajustó luego a pH 4 mediante la adición de HCl acuoso 2 M. La solución se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g, eluyendo con metanol seguido de una solución 1N de amoníaco en metanol para extraer el producto. El disolvente se evaporó a presión reducida para producir ácido 2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)acético (380 mg, 96 %) como un sólido; ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,14 - 2,24 (2H, m), 3,58 (2H, q), 3,74 (3H, s), 3,79 (2H, q), 4,40 (1H, s), 6,85 - 6,89 (1H, m), 6,91 - 6,95 (2H, m), 7,25 (1H, t); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 222.

Producto intermedio 18

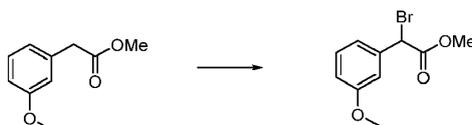
2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)acetato de metilo



Se añadió gota a gota una solución de trietilamina (284 μ l, 2,04 mmol) y azetidín (106 mg, 1,85 mmol) en acetonitrilo (2 mL) a una solución a 0 °C de 2-bromo-2-(3-metoxifenil)acetato de metilo (Producto intermedio 19, 480 mg, 1,85 mmol) en MeCN (5 mL). La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre la salmuera acuosa y el acetato de etilo, la capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)acetato de metilo (420 mg, 96 %) como un líquido; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30 °C) δ 2,11 (2H, p), 3,16 (2H, q), 3,30 (2H, q), 3,67 (3H, s), 3,81 (3H, s), 3,99 (1H, s), 6,82 - 6,86 (1H, m), 6,96 - 7 (2H, m), 7,23 (1H, t); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 236.

Producto intermedio 19

2-bromo-2-(3-metoxifenil)acetato de metilo

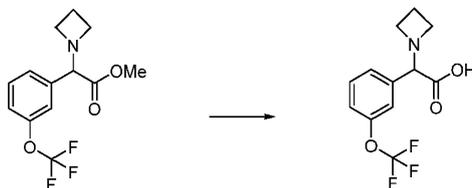


Una mezcla de 2-(3-metoxifenil)acetato de metilo (550 mg, 3,05 mmol) y NBS (570 mg, 3,20 mmol) y (*E*)-2,2'-(diazeno-1,2-diil)bis(2-metilpropanonitrilo) (25,06 mg, 0,15 mmol) en tetracloruro de carbono (15 mL) se calentó a reflujo durante 4 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. El sólido se filtró y se desechó, y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía rápida sobre sílice, (gradiente de 0-10 % de acetato de etilo en heptano). Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida para dar 2-bromo-2-(3-metoxifenil)acetato de

metilo (490 mg, 62 %) como un líquido. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 30 °C) δ 3,79 (3H, s), 3,82 (3H, s), 5,33 (1H, s), 6,88 (1H, ddd), 7,07 - 7,12 (2H, m), 7,23 - 7,29 (1H, m). m/z : GC EI M+ 257,9882.

Producto intermedio 20

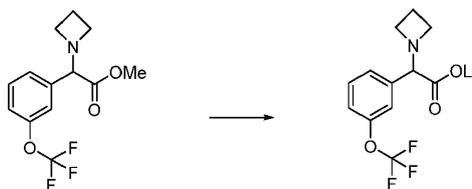
Ácido 2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético



Se añadió una solución de hidróxido de litio monohidratado (116 mg, 2,77 mmol) en agua (3 mL) a una solución de 2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (Producto intermedio 22, 400 mg, 1,38 mmol) en metanol (6 mL) y la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ajustó luego a pH 4 mediante la adición de HCl acuoso 2 M. La solución se pasó a través de un cartucho SCX-2 de 20 g, eluyendo con metanol seguido de una solución 1N de amoníaco en metanol para extraer el producto. El disolvente se evaporó bajo presión reducida a ácido 2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (380 mg, 100 %) como una goma. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,19 (2H, p), 3,5 - 3,6 (2H, m), 3,75 (2H, q), 4,49 (1H, s), 7,31 (1H, d), 7,35 (1H, s), 7,39 (1H, d), 7,50 (1H, t); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 276.

Producto intermedio 21

[2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetil]oxilitio

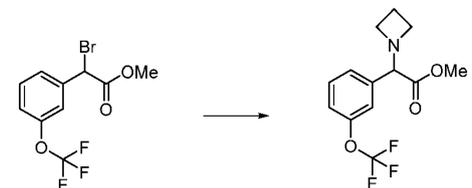


2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (Producto intermedio 22, 0,94 g, 3,25 mmol) y monohidrato de hidróxido de litio (0,27 g, 6,5 mmol) se disolvieron en una mezcla de metanol (10 mL) y agua (5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se evaporó y se secó *en el vacío* para dar [2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetil]oxilitio como un sólido amarillo pálido (944 mg, 103 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,79 (p, J = 6,9 Hz, 2H) 2,87 (2H, q), 3,01 (2H, q), 3,52 (1H, s), 7,02 (1H, ddt), 7,30 - 7,20 (3H, m). m/z : ES^- $[\text{M}+\text{H}]^-$ 275.

Producto intermedio 22

2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo

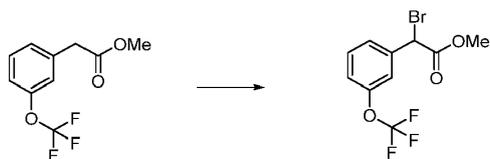


Se añadió gota a gota una solución de azetidín fresca (0,22 mL, 3,19 mmol) y trietilamina (0,49 mL, 3,51 mmol) en MeCN (4 mL) a 2-bromo-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (Producto intermedio 23, 1,0 g, 3,19 mmol) en MeCN (10 mL) enfriado en un baño de hielo bajo N_2 . La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 5 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse y el residuo se repartió entre EtOAc y salmuera (75 mL cada uno). Los compuestos orgánicos se secaron (MgSO_4) y evaporaron para dar 2-(azetidín-1-il)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo como un aceite naranja (940 mg, 101 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2,13 (2H, q), 3,17 (2H, td), 3,34 - 3,24 (2H, m), 3,69 (3H, s), 4,04 (1H, s), 7,16 (1H, m), 7,31 (1H, dq), 7,40 - 7,33 (2H, m). m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 290.

Producto intermedio 23

2-bromo-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo

5



10

15

Una mezcla de 2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (3,6 g, 15,37 mmol), *N*-bromosuccinimida (2,87 g, 16,14 mmol) y AIBN (0,13 g, 0,76 mmol) en tetracloruro de carbono (50 mL) se calentaron a reflujo durante 3 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, y el precipitado se eliminó por filtración a través de celita. El filtrado se evaporó sobre sílice y se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, gradiente de elución ciclohexano 100 % aumentando gradualmente a acetato de etilo 10 % en ciclohexano). Las fracciones puras se evaporaron para dar 2-bromo-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo como un aceite amarillo pálido (3,97 g, 82 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,81 (3H, s), 5,33 (1H, s), 7,22 (1H, ddq), 7,51 - 7,37 (3H, m).

Producto intermedio 24

Ácido 2-metil-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolina-1-carboxílico, HCl

20



25

30

A una suspensión de ácido 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-carboxílico (Producto intermedio 25, 2,63 g, 14,84 mmol) en MeOH (150 mL) se añadió ácido acético (20 mL), ácido clorhídrico 6*N* (2,474 mL, 14,84 mmol), seguido de paladio sobre carbono al 10 % (350 mg, 3,29 mmol) y formaldehído (1,506 g, 18,55 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno (balón). El catalizador se filtró y el disolvente se evaporó bajo presión reducida para producir el ácido 2-metil-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-carboxílico (3,15 g, 93 %) como una sal de hidrocloreto sólido; ¹H RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 2,89 (3H, s), 3,13 (2H, t), 3,42 - 3,49 (1H, m), 3,76 - 3,85 (1H, m), 5,33 (1H, s), 7,27 - 7,38 (3H, m), 7,41 - 7,45 (1H, m); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 192.

Producto intermedio 25

Ácido 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-carboxílico

35



40

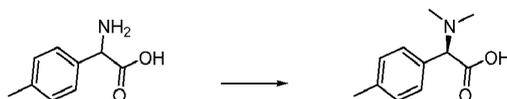
45

Se cargó una bomba de acero de 300 mL con ácido isoquinolina-1-carboxílico (3 g, 17,32 mmol), ácido acético (100 mL) y óxido de platino (IV) (0,2 g, 0,88 mmol). La mezcla resultante se hidrogenó a una presión de 7 bares durante 18 horas con agitación mecánica. Se diluyó con MeOH (80 mL), se filtró a través de Celite y se enjuagó con MeOH y ácido acético. El filtrado se concentró hasta secarse para dar un sólido gris claro. La trituración con MeOH proporcionó el ácido 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-carboxílico (2,63 g, 86 %) como un sólido gris claro que se usó sin ninguna purificación adicional.

Producto intermedio 26

Ácido (2*S*)-2-(dimetilamino)-2-(4-metilfenil)acético

50



55

60

65

Dentro de un frasco de fondo redondo de 1 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó ácido 2-amino-2-(*p*-tolil)acético (36 g, 217,93 mmol, 1,00 equiv), cloruro de hidrógeno (120 mL, 1*N*, 3,95 mol, 18,10 equiv), metanol (120 mL, 2,96 mol, 13,60 equiv), paraformaldehído (37 % en H₂O, 120 mL) y paladio sobre carbono (36 g, 338,28 mmol, 1,60 equiv). La solución resultante se agitó durante 48 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno (balón). Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró al vacío. La solución resultante se diluyó con 1500 mL de metanol. El valor pH de la solución se ajustó a 6 con MeONa. Los sólidos se filtraron y el filtrado resultante se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante SFC preparatoria (columna, CHIRALPAK AD-H SFC, 5 x 25 cm, 5 μm; fase móvil, CO₂(55 %), MEOH (DEA 0,2 %) (45 %); Detector, UV 220 nm. Esto dio como resultado el ácido (2*S*)-2-(dimetilamino)-2-(*p*-tolil)acético (10 g, 24 %) como un sólido blanco; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 25 °C) δ 2,32 (3H, s), 2,60 (6H, s), 7,19 - 7,21 (2H, d), 4,22 (1H, s), 7,37 - 7,40 (2H, d); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 194.

Producto intermedio 27

Ácido (2S)-2-(Dimetilamino)-2-(3-metilfenil)acético

5



10

15

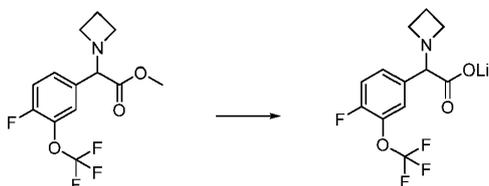
En un frasco de fondo redondo de 1 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó el ácido 2-amino-2-(4-metilfenil)acético (36 g, 217,93 mmol, 1,00 equiv), cloruro de hidrógeno (120 mL, 1 N, 2,60 mol, 12,00 equiv), metanol (120 mL, 2,96 mol, 13,60 equiv), paraformaldehído (37 % en H₂O, 120 mL) y paladio sobre carbono (36 g, 338,28 mmol, 1,60 equiv). La solución resultante se agitó durante 48 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno (balón). Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró al vacío. La solución resultante se diluyó con metanol (1500 mL). El valor pH de la solución se ajustó a 6 con MeONa. Los sólidos se filtraron y el filtrado resultante se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante SFC preparatoria (columna, CHIRALPAK AD-H SFC, 5 x 25 cm, 5 µm); fase móvil, CO₂(60 %), MEOH (DEA 0,2 %) (40 %); detector, UV 220 nm. Esto dio como resultado el ácido (2S)-2-(dimetilamino)-2-(3-metilfenil)acético (10 g, 24 %) como un sólido blanco; ¹H NMR (300MHz, CD₃OD, 27 °C) δ 2,37 (3H, s), 2,62 (6H, s), 4,20 (1H, s), 7,21 - 7,38 (4H, m); m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 194.

Producto intermedio 28

20

[2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetil]oxilítio

25



30

2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)acetato de metilo (Producto intermedio 29, 0,76 g, 3,25 mmol) y monohidrato de hidróxido de litio (0,1 g, 2,49 mmol) se disolvieron en una mezcla de metanol (5 mL) y agua (2 mL). La reacción se agitó durante 2 ha temperatura ambiente, luego se evaporó a presión reducida y se secó *al vacío* durante el fin de semana para dar [2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetil]oxilítio como un sólido amarillo pálido (0,48 g, 97 %).

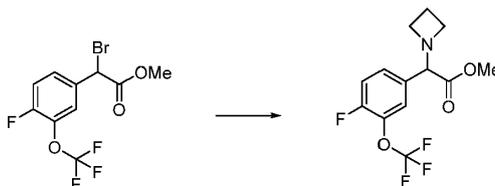
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,72 (2H, p) 2,80 (2H, q), 2,93 (2H, q), 3,44 (1H, s), 7,16 (1H, dd), 7,24 (1H, ddd), 7,34 (1H, dt). m/z: ES⁻ [M-H]⁻ 294.

35

Producto intermedio 29

2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo

40



45

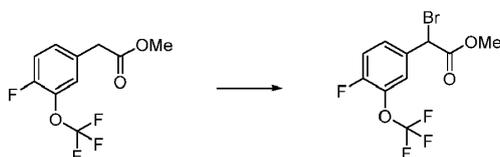
Se añadió gota a gota una solución de azetidín fresca (0,12 mL, 1,81 mmol) y trietilamina (0,28 mL, 1,99 mmol) en MeCN (5 mL) a 2-bromo-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (Producto intermedio 30 0,6 g, 1,812 mmol) en MeCN (12 mL) enfriado en un baño de hielo bajo N₂. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse y el residuo se repartió entre EtOAc y salmuera (100 mL cada uno). Los compuestos orgánicos se secaron (MgSO₄) y se evaporó para dar 2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo como una goma amarilla (0,51 g, 93 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2,14 (2H, q) 3,17 (2H, td), 3,27 (2H, td), 3,69 (3H, s), 4,00 (1H, s), 7,20 - 7,14 (1H, m), 7,35 (1H, dddd), 7,43 (1H, ddd). m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 308.

55

Producto intermedio 30

2-bromo-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo

60



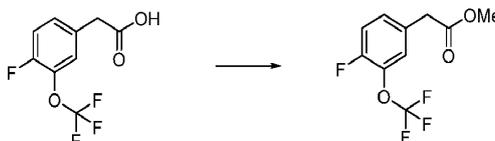
65

Se agregaron 2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (Producto intermedio 31, 0,65 g, 2,578 mmol) y *N*-bromosuccinimida (4,08 g, 22,919 mmol) se pesaron en un frasco de fondo redondo y 2,2-azobis(2-metilpropionitrilo), (AIBN, 0,02 g, 0,129 mmol) en tetracloruro de carbono (6 mL). La reacción se calentó hasta reflujo durante 4 horas después se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El precipitado se filtró y la solución se trató con sílice y se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía rápida en columna eluyendo con 100 % de ciclohexano aumentando gradualmente a 30 % de EtOAc en ciclohexano. Las fracciones apropiadas se evaporaron a presión reducida para producir 2-bromo-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo como un aceite amarillo pálido (1,1 g, 129 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 3,81 (3H, s), 5,29 (1H, s), 7,17 - 7,24 (1H, m,), 7,46 - 7,52 (1H, m), 7,53 - 7,59 (1H, m).

Producto intermedio 31

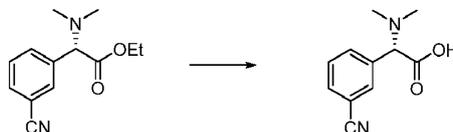
2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo



Ácido 4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenilacético (1,0 g, 4,199 mmol) se suspendió en metanol (10 mL) y se trató con ácido sulfúrico (0,07 mL, 0,84 mmol) y se calentó a 45 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió a la temperatura ambiente y el metanol se eliminó bajo presión reducida. El residuo se diluyó con salmuera (20 mL) y después se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). Los extractos de EtOAc combinados se lavaron con salmuera (30 mL), se secaron sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]acetato de metilo (0,65 g, 61 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3,63 (3H, s), 3,78 (2H, s), 7,33 - 7,39 (1H, m), 7,42 - 7,53 (2H, m). m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 253.

Producto intermedio 32

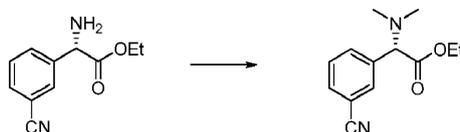
Ácido (2*S*)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)acético



En un frasco de fondo redondo de 3 bocas de 500 mL, se colocó una solución de (2*S*)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)acetato de etilo (Producto intermedio 33, 18 g, 77,49 mmol, 1,00 equiv) en tetrahidrofurano (200 mL) y una solución de LiOH (3,56 g, 148,66 mmol, 2,00 equiv) en agua (100 mL). La solución resultante se agitó durante 3 h a 25 °C. La solución resultante se extrajo con 2x100 mL de diclorometano y las capas orgánicas se combinaron. El valor de pH de la solución se ajustó a 3-4 con cloruro de hidrógeno acuoso (1 mol/L). La mezcla resultante se concentró al vacío. La mezcla resultante se lavó con 2x100 mL de acetona. Esto dio como resultado 15 g (95 %) de ácido (2*S*)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)acético como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 2,46 (6H, s), 4,28 (1H, s), 7,61-7,58 (1H, t), 7,77-7,75 (1H, d), 7,86-7,81 (2H, t). m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 205.

Producto intermedio 33

(2*S*)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)acetato de etilo

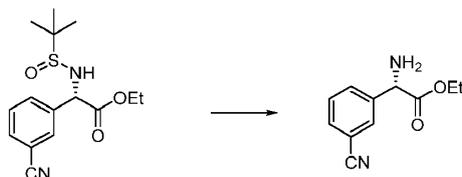


En un frasco de fondo redondo de 3 bocas de 1000 mL, se colocó una solución de (2*S*)-2-amino-2-(3-cianofenil)acetato de etilo (Producto intermedio 34, 20 g, 97,93 mmol, 1,00 equiv) en metanol (200 mL), una solución de formaldehído (44,1 g, 1,47 mol, 6,00 equiv) en agua y NaBH_3CN (18,2 g, 289,62 mmol, 3,00 equiv). La solución resultante se agitó durante la noche a 25 °C. La mezcla resultante se concentró al vacío. El residuo se aplicó sobre una columna de gel de sílice con acetato de etilo/éter de petróleo (1/1). Esto dio como resultado 18 g (79 %) de (2*S*)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)acetato de etilo como un sólido blanco.

Producto intermedio 34

(2*S*)-2-amino-2-(3-cianofenil)acetato de etilo

5



10

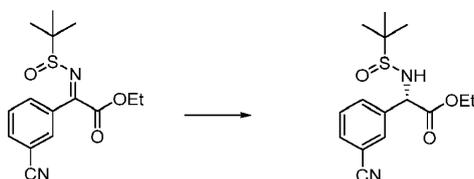
En un frasco de fondo redondo de 3 bocas de 1000 mL, se colocó una solución de (2S)-2-(3-cianofenil)-2-[(2S)-2-metilpropano-2-sulfinil]amino]acetato de etilo (Producto intermedio 35 40,00 g, 129,70 mmol, 1,00 equiv) En 1,4-dioxano (100 mL) y una solución de cloruro de hidrógeno (g) en 1,4-dioxano (200 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a 25 °C. La mezcla resultante se concentró al vacío. La mezcla resultante se lavó con 1x100 mL de MTBE. Esto dio como resultado 20 g (76 %) de (2S)-2-amino-2-(3-cianofenil)acetato de etilo como un sólido amarillo claro.

15

Producto intermedio 35

(2S)-2-(3-cianofenil)-2-[(2S)-2-metilpropano-2-sulfinil]amino]acetato

20



25

En un frasco de fondo redondo de 4 bocas de 2000 mL, se colocó una solución de (2Z)-2-(3-cianofenil)-2-[(S)-2-metilpropano-2-sulfinil]imino]acetato de etilo (Producto intermedio 36 50 g, 163,20 mmol, 1,00 equiv) en tetrahidrofurano (1000 mL). Esto fue seguido por la adición de L-selectrida (196 mL, 917,61 mmol, 1,20 equiv) gota a gota con agitación a -78 °C. La solución resultante se agitó durante 5 h a -78 °C. La reacción se inactivó luego mediante la adición de 500 mL de NH₄Cl acuoso. La solución resultante se extrajo con 3X350 mL de acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron. La mezcla resultante se lavó con 1x200 mL de salmuera. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo vacío. Esto dio como resultado 40 g (79 %) de (2S)-2-(3-cianofenil)-2-[(2S)-2-metilpropano-2-sulfinil]amino]acetato de etilo como un aceite amarillo.

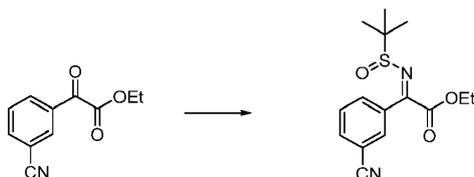
30

35

Producto intermedio 36

(2Z)-2-(3-cianofenil)-2-[(S)-2-metilpropano-2-sulfinil]imino]acetato de etilo

40



45

En un frasco de fondo redondo de 4 bocas de 3000 mL, se colocó una solución de 2-(3-cianofenil)-2-oxoacetato de etilo (Producto intermedio 37, 80 g, 393,71 mmol, 1,00 equiv) en tetrahidrofurano (800 mL), (S)-2-metilpropano-2-sulfinamida (52,5 g, 433,16 mmol, 1,10 equiv) y tetraetoxititanio (134,7 g, 590,51 mmol, 1,50 equiv). La solución resultante se agitó durante toda la noche a 65 °C. La mezcla de reacción luego se inactivó por la adición de 200 mL de NaCl acuoso. Los sólidos se filtraron. La solución resultante se extrajo con 3X250 mL de acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron. La mezcla resultante se lavó con 1x200 mL de salmuera. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo vacío. El residuo se aplicó sobre una columna de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo/éter de petróleo (1/2). Esto dio como resultado 50 g (41 %) de (2Z)-2-(3-cianofenil)-2-[(S)-2-metilpropano-2-sulfinil]imino]acetato de etilo como un aceite amarillo.

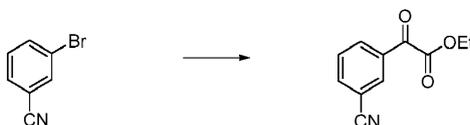
50

55

Producto intermedio 37

2-(3-cianofenil)-2-oxoacetato de etilo

60



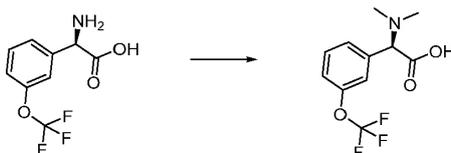
65

En un frasco de fondo redondo de 4 bocas de 5000 mL purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de 3-bromobenzonitrilo (200 g, 1,10 mol, 1,00 equiv) en tetrahidrofurano (1000 mL). Esto fue seguido

por la adición de *i*-PrMgCl (663 mL, 5,38 mol, 1,20 equiv) gota a gota con agitación a 0 °C. La solución resultante se agitó durante 2 h a 0 °C. A esto se añadió oxalato de dietilo (193,6 g, 1,32 mol, 1,20 equiv) gota a gota con agitación a -40 °C. La solución resultante se agitó durante 1 h a -40 °C. La reacción se inactivó luego mediante la adición de 800 mL de HCl. La mezcla resultante se concentró al vacío. El valor pH de la solución se ajustó a 8-9 con bicarbonato de sodio. La solución resultante se extrajo con 3x500 mL de acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. El residuo se aplicó sobre una columna de gel de sílice que eluye con acetato de etilo/éter de petróleo (1/1). Esto dio como resultado 80 g (36 %) de 2-(3-cianofenil)-2-oxoacetato de etilo como un aceite amarillo.

10 Producto intermedio 38

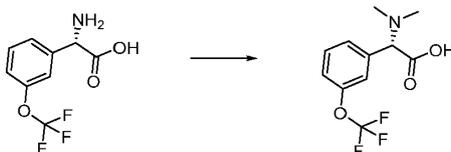
Ácido (2*R*)-2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético



20 Ácido (2*R*)-2-amino-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (1 g, 4,25 mmol), formaldehído (1,277 g, 42,52 mmol) y Pd-C (0,045 g, 0,43 mmol) en MeOH (30 mL) y ácido clorhídrico, (1 N) (2 mL) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a presión y 40 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de celita. El sólido se lavó con MeOH (20 mL). El filtrado se combinó y se evaporó para proporcionar ácido (2*S*)-2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (1 g, 89 %) como un sólido blanco; *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 264.

25 Producto intermedio 39

Ácido (2*S*)-2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético



35 Ácido (2*S*)-2-amino-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (1 g, 4,25 mmol), formaldehído (1,277 g, 42,52 mmol) y Pd-C (0,045 g, 0,43 mmol) en MeOH (30 mL) y ácido clorhídrico, (1 N) (2 mL) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a presión y 40 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de celita. El sólido se lavó con MeOH (20 mL). El filtrado se combinó y se evaporó para proporcionar ácido (2*R*)-2-(dimetilamino)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (1 g, 89 %) como un sólido blanco; *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 264.

Ensayos biológicos

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

i. Se usaron las siguientes abreviaturas: CO₂ = Dióxido de carbono; DMEM = medio Eagle modificado de Dulbecco; DMSO = dimetil sulfóxido; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético; EGTA = ácido etilenglicoltetraacético; FCS = suero fetal de ternera; h = hora(s); NBS = superficie no ligante; SDS = dodecil sulfato de sodio; TRIS = Tris(hidroximetil)aminometano.

50 ii. Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante el uso de un modelo de ajuste inteligente en Genedata. El valor de IC₅₀ fue la concentración del compuesto de prueba que inhibió el 50 % de la actividad biológica.

Ensayo a): Ensayo de potencia enzimática de GLS

55 Se usó un ensayo acoplado Glutamato Oxidasa/AmplexRed para medir la capacidad de los compuestos para unirse e inhibir la actividad de la GLS1 *in vitro*. La proteína GLS1 marcada con 6His (aminoácidos 63-669) expresada en *E. Coli* se purificó y se almacenó a -80 °C en alícuotas. La GLS1 se diluyó 2 veces la concentración de trabajo y se incubó a temperatura ambiente para permitir que las formas tetraméricas/diméricas alcancen el estado estacionario. Las mediciones del ensayo se realizaron en un tampón que comprende TRIS 50 mM, pH 7,8, NaPO₄ 100 mM, pH 7,8, Tween20 al 0,001 % v/v. La proteína GLS1 recombinante purificada se diluyó en tampón de ensayo a 12 nM y se incubó previamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los compuestos de prueba se prepararon por dilución en DMSO al 100 % para dar el intervalo de dosis correcto para una respuesta de concentración de 12 puntos y un volumen apropiado (2,5-60 nl) dispensado en placas de microensayo de 384 pocillos (código de producto Greiner 784900) mediante el uso de un dispensador acústico Labcye Echo 555. La concentración del DMSO se mantuvo al 2 % rellenando de nuevo con solución de DMSO. Luego se dispensaron 3 µL de la proteína GLS1 diluida (12 nM) en cada pocillo mediante el uso de un dispensador automático BioRaptr (Beckman-Coulter) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Luego se añadieron 3 μL de glutamina 100 mM diluida en tampón de ensayo y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. La reacción se detuvo luego mediante la adición de 45 μM de 6-(2-bromoetil)-2,3-dimetilquinazolin-4-ona, 75 μM de Amplex Red, 0,375 unidades/mL de peroxidasa de rábano picante, 0,12 unidades/mL de glutamato oxidasa en 100 mM Tris pH 7,5. Después de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, las placas se leyeron en un Perkin Elmer EnVision mediante el uso de filtros ópticos de 535/590 nm y los datos sin procesar se analizaron con el uso de Genedata para generar valores IC_{50} . Se usó además una versión del artefacto del ensayo donde la proteína GLS marcada con 6His y la glutamina con tampón para descartar los efectos no específicos sobre los componentes del ensayo.

10 Ensayo b): Ensayo de potencia celular de la GLS

Se evaluó el potencial de los compuestos para inhibir la actividad de la GLS celular mediante el uso de un ensayo acoplado con PC3 que mide el agotamiento del glutamato celular. Los compuestos de prueba se prepararon por dilución en DMSO al 100 % para dar el intervalo de dosis correcto para una respuesta de concentración de 12 puntos y un volumen apropiado (5-120 nl) dispensado en placas de microensayo de 384 pocillos (código de producto Corning 3712) mediante el uso de un dispensador acústico Labcyte Echo 555. La concentración de DMSO se mantuvo al 0,3 % rellenando nuevamente con solución de DMSO. Las células PC3 se cultivaron en DMEM libre de fenol, FCS dializado al 10 %, glutamina 2 mM y después de la dispersión por tripsinización se colocaron en placas a $5,6 \times 10^3$ células por pocillo en 40 μL de medio de crecimiento directamente en las placas de ensayo de 384 pocillos que contienen el compuesto dispensado. Después de la incubación durante 6 h a 37 °C, CO_2 al 5 %, se aspiraron los medios de crecimiento y las células se lisaron en 15 μL de tampón que contenía TRIS 10 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, $\text{Na}_4\text{PAGS}_2\text{O}_7$ 20 mM, Na_3VO_4 2 mM, Tritón X-100 al 1 %, glicerol al 10 %, SDS al 0,1 % y desoxicolato al 0,5 %. Luego, se transfirieron 4 μL de lisado celular a una placa NBS de 384 pocillos (código de producto Corning 3575) y se añadieron 35 μL de Amplex Red 27,5 μM , 0,1375 U/mL de peroxidasa de rábano picante, 0,044 U/mL de glutamato oxidasa, TRIS 100 mM, pH 7,5. Después de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, las placas se leyeron en un Perkin Elmer EnVision mediante el uso de filtros ópticos de 535/590nm y los datos en crudo se analizaron mediante el uso de un programa informático patentado para generar los valores de IC_{50} .

30 Ensayo c): Ensayo de proliferación celular de la GLS

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

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

Tabla 1. Datos del ensayo

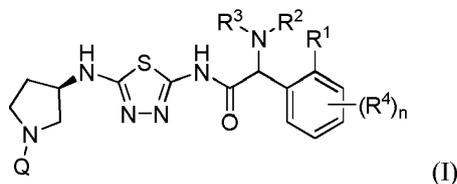
Ejemplos de los compuestos #	Ensayo a) IC_{50} enzimática en μM	Ensayo b) Promedio MOA celular de la GLS IC_{50} μM	Ensayo c) Promedio de proliferación IC_{50} μM
1(a)	1,72	0,0334	0,0686
1(b)	0,0826	0,00408	0,0547
2(a)	0,0746	0,00344	0,0896
2(b)	1,24	0,0128	0,0979
3(a)	0,261	0,0112	0,0127
3(b)	0,0524	0,000295	0,00825
4(a)	0,0564	0,000405	0,00841
4(b)	0,522	0,00191	0,00252
5(a)	0,981	0,022	0,0293
5(b)	0,0772	0,00192	0,0132

ES 2 796 562 T3

	6(a)	0,981	0,022	0,0293
	6(b)	0,944	0,0297	0,0808
5	7(a)	1,33	0,00861	0,00624
	7(b)	0,102	0,000985	0,00245
	8(a)	0,053	0,00191	0,00881
10	8(b)	0,194	0,0209	0,0851
	9	0,132	0,00281	0,0448
	10	0,0592	0,00212	0,0212
15	11(a)	0,952	0,0308-	0,0191
	11(b)	0,132	0,00177-	0,0301
	12(a)	2,51	0,0153	0,0116
20	12(b)	0,246	0,00141	0,0129
	13	0,226	0,0113	0,0768
	14	2,26	0,0102	0,00523
25	15	3,75	0,0222	0,152
	16	0,198	0,00476	0,131
	17	0,187	0,0107	0,163
30	18	0,182	0,0011	0,00351

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula (I):



o una sal aceptable farmacéuticamente de este, en donde:

Q es piridazin-3-ilo o 6-fluoropiridazin-3-ilo;

R¹ es H;

R² y R³ son cada uno independientemente alquilo C1-C6, o R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-;

o R¹ y R² tomados juntos son -(CH₂)₂- y R³ es -CH₃;

R⁴ es halo, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃o -CN; y

n es 0, 1, o 2.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde Q es piridazina-3-ilo.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde n es 0.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde n es 1 y R⁴ es metilo, metoxi, difluorometoxi, trifluorometoxi o ciano, y R⁴ está en la posición 3.
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde n es 1 y R⁴ se selecciona del grupo que consiste en flúor y metilo y R⁴ está en la 4 posición.
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde n es 2, un ejemplo de R⁴ es trifluorometoxi y está en la posición 3, y el otro ejemplo de R⁴ es fluoro y está en la posición 4.
7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R² y R³ son cada uno metilo.
8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R² y R³ tomados juntos son -(CH₂)₃-.
9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R¹ es H.
10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R¹ y R² tomados juntos son -(CH₂)₂- y R³ es -CH₃.
11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:
- (2S)-2-(dimetilamino)-2-fenil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2R)-2-(dimetilamino)-2-fenil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2S)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2R)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2S)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
- (2R)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazina-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
- (2S)-2-(azetidín-1-il)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
- (2R)-2-(azetidín-1-il)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;

- (2S)-2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2R)-2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
 5 (2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-ilo]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
 (1S)-2-metil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida;
 (1R)-2-metil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida;
 10 (2S)-2-(dimetilamino)-2-(p-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(dimetilamino)-2-(m-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 15 (2R)-2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-il)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
 (2R)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida; y
 20 (2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida.
12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:
- 25 (2S)-2-(dimetilamino)-2-fenil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(dimetilamino)-2-(4-fluorofenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 30 (2S)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-il)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 35 (2S)-2-(azetidín-1-il)-2-(3-metoxifenil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
 (1S)-2-metil-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-1-carboxamida;
 40 (2S)-2-(dimetilamino)-2-(p-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(dimetilamino)-2-(m-tolil)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-il)-2-[4-fluoro-3-(trifluorometoxi)fenil]-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
 (2S)-2-(azetidín-1-ilo)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida;
 45 (2R)-2-(azetidín-1-il)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-fluoropiridazin-3-ilo)pirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acetamida; y
 (2S)-2-(3-cianofenil)-2-(dimetilamino)-N-[5-[[[(3R)-1-piridazin-3-ilpirrolidin-3-il]amino]-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida.
- 50 13. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
14. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento del cáncer.
- 55 15. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer renal o cáncer hepatocelular.