

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 723**

51 Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)

A61K 31/501 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2016** **PCT/EP2016/078899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17089587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2016** **E 16801774 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020** **EP 3380468**

54 Título: **Compuestos de bis-piridazina y su uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

27.11.2015 GB 201520959

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

18.02.2021

73 Titular/es:

CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)

2 Redman Place
London E20 1JQ, GB

72 Inventor/es:

FINLAY, MAURICE, RAYMOND, VERSCHOYLE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 806 723 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 bis-piridazina y su uso en el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

Esta memoria se refiere en general a compuestos de bis-piridazina y sales farmacéuticamente aceptables de ellos. Estos compuestos actúan sobre la enzima glutaminasa 1 ("GLS1"), y por ello esta memoria se refiere también al uso de tales compuestos y sales de ellos, para el tratamiento o prevención de enfermedad mediada por GLS1, incluyendo cáncer. La memoria se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de bis-piridazina y sales farmacéuticamente aceptables de ellos; kits que comprenden tales compuestos y sales; procedimientos de manufactura de tales componentes y sales; compuestos intermedios útiles en la manufactura de tales compuestos y sales; y a procedimientos para el tratamiento de enfermedad mediada por quinasa de GLS1, incluyendo cáncer, usando tales compuestos y sales.

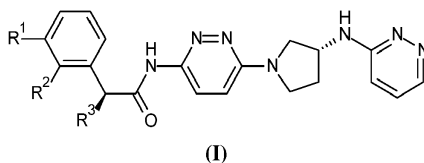
Antecedente

La glutamina es el aminoácido más abundante en el plasma y está involucrada en muchas rutas de promoción del crecimiento. En particular, la glutamina está involucrada en la oxidación en el ciclo del ácido tricarboxílico y en la preservación del equilibrio redox de la célula, y también suministra nitrógeno para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos (Curi et al., Front. Biosci. 2007, 12, 344-57; DeBardinis y Cheng, Oncogene 2009, 313-324). Muchas células de cáncer dependen del metabolismo de glutamina, como una consecuencia de cambios metabólicos en la célula, incluyendo el efecto Warburg en el que el piruvato glicolítico es convertido en ácido láctico, más que ser usado para crear Acetil CoA (Koppenol et al., Nature Reviews 2011, 11, 325-337). Como una consecuencia de esta dependencia sobre el metabolismo de glutamina, tales células de cáncer son sensibles a cambios en niveles exógenos de glutamina. Además, existe mucha evidencia que sugiere que la glutaminólisis juega un papel clave en ciertos tipos de cáncer (Hensley et al., J. Clin. Invest. 2013, 123, 3678- 3684), y está asociada con conductores oncogénicos conocidos tales como Myc (Dang, Cáncer Res. 2010, 70, 859- 863).

El primer paso del catabolismo de glutamina hasta glutamato es catalizado por glutaminasa, que existe como 2 isoformas GLS1 y GLS2, identificadas originalmente como siendo expresadas en el riñón e hígado respectivamente. La glutaminasa (GLS1) del riñón es conocida por ser expresada de manera más ubicua, que la glutaminasa (GLS2) de hígado, y tiene 2 variantes de empalme, KGA y la isoforma GAC más corta, estando ambas localizadas en el las mitocondrias. (Elgadi et al., Physiol. Genomics 1999, 1, 51-62; Cassago et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2012, 109, 1092-1097). La expresión de GLS1 está asociada con el crecimiento tumoral y malignidad en varios tipos de enfermedad (Wang et al., Cáncer Cell 2010, 18, 207-219; van der Heuvel et al., Cáncer Bio. Ther. 2012, 13, 1185-1194). Por ello, se espera que los inhibidores de GLS1 sean útiles en el tratamiento de cáncer, como monoterapia o en combinación con otros agentes contra el cáncer. Los inhibidores de glutaminasa son conocidos a partir del documento WO2015/101957.

Resumen de la invención

Brevemente, esta memoria describe, en parte, un compuesto de la Fórmula (I):



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

R¹ es hidrógeno, metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi;

R² es hidrógeno, metoxi, trifluorometoxi o trifluorometil; y

R³ es hidrógeno o metoxi.

Esta memoria describe también, en parte, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta memoria describe también, en parte, un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

Esta memoria describe también, en parte, un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer.

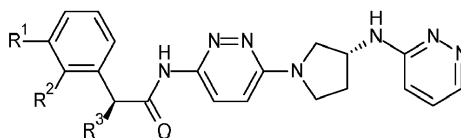
Esta memoria describe también, en parte, el uso de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Esta memoria describe también, en parte, un procedimiento para el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, el cual comprende la administración a dicho animal de sangre caliente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción de realizaciones ilustrativas

A lo largo de la memoria se detallan muchas realizaciones y serán evidentes para un lector experto en la técnica. La invención no debe ser interpretada como limitada a ninguna realización o realizaciones particular(es) de ella, sino que está limitada por las reivindicaciones.

En la primera realización, se suministra un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

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

R¹ es hidrógeno, metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi;

R² es hidrógeno, metoxi, trifluorometoxi o trifluorometil; y

R³ es hidrógeno o metoxi.

Un grupo hidrógeno es un átomo de hidrógeno individual. Por ejemplo, cuando R³ es hidrógeno, el grupo adyacente al grupo carbonilo en la Fórmula (I) es un grupo metileno. Cuando R¹ o R² son hidrógeno, ellos y el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo CH aromático.

El término "farmacéuticamente aceptable" es usado para especificar que un objeto (por ejemplo una sal, forma de dosificación, diluyente o vehículo) es adecuado para el uso en pacientes. En el Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P. H. Stahl y C. G. Wermuth, editores, Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA, 2002 puede encontrarse un ejemplo de lista de sales farmacéuticamente aceptables. Una sal adecuada farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la Fórmula (I) es, por ejemplo, una sal de adición ácida. Puede formarse una sal de adición ácida de un compuesto de la Fórmula (I), poniendo en contacto el compuesto con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, bajo condiciones conocidas por la persona experta. Una sal de adición ácida puede ser formada por ejemplo, usando un ácido inorgánico seleccionado de entre ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Por ejemplo, también puede formarse una sal de adición ácida usando un ácido orgánico seleccionado de entre ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico.

Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico o ácido bencenosulfónico.

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido clorhídrico o ácido bromhídrico.

Debe entenderse que puede ser posible formar otras sales farmacéuticamente aceptables, con otros ácidos adecuados de pKa apropiado, y éstas están incluidas en la definición de "sales farmacéuticamente aceptables".

Una sal adecuada farmacéuticamente aceptable adicional de un compuesto de la Fórmula (I) es una sal de adición básica. Puede formarse una sal de adición básica de un compuesto de la Fórmula (I), poniendo en contacto el compuesto con una base orgánica o inorgánica adecuada, bajo condiciones conocidas por los expertos. Puede formarse una sal de adición básica por ejemplo usando una base inorgánica seleccionada de un hidróxido de metal alcalino (tal como hidróxido de sodio, potasio o litio) o un hidróxido de metal alcalinotérreo (tal como hidróxido de calcio o hidróxido de magnesio). Puede formarse también una sal de adición básica usando una base orgánica seleccionada de entre metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina y tris-(2-hidroxietil)amina.

Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina o tris-(2-hidroxietil)amina.

- En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido clorhídrico, de ácido bromhídrico, de ácido sulfúrico, de ácido fosfórico, de ácido trifluoroacético, de ácido metanosulfónico, de ácido bencenosulfónico, de hidróxido de sodio, de hidróxido de potasio, de hidróxido de litio, de hidróxido de calcio, de hidróxido de magnesio, de metilamina, de dimetilamina, de trimetilamina, de piperidina, de morfolina o de tris-(2-hidroxietil)amina.
- Debe entenderse que puede ser posible formar otras sales farmacéuticamente aceptables con otras bases adecuadas, y éstas están incluidas en la definición de "sales farmacéuticamente aceptables".
- Una realización adicional suministra cualquiera de las realizaciones definidas en esta memoria (por ejemplo la realización de la reivindicación 1) con la condición de que se renuncie individualmente a uno o más ejemplos específicos (por ejemplo uno, dos o tres ejemplos específicos, o de manera alternativa un ejemplo específico) seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.
- Algunos valores de grupos variables en la Fórmula (I) son como sigue. Tales valores pueden ser usados en combinación con cualquiera de las definiciones, reivindicaciones (por ejemplo reivindicación 1), o realizaciones definidas en esta memoria, para suministrar realizaciones adicionales.
- a) R¹ es metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi.
 - b) R¹ es metoxi o difluorometoxi.
 - c) R¹ es metoxi o trifluorometoxi.
 - d) R¹ es difluorometoxi o trifluorometoxi.
 - e) R¹ es hidro.
 - f) R¹ es metoxi.
 - g) R¹ es difluorometoxi.
 - h) R¹ es trifluorometoxi.
 - i) R² es metoxi, trifluorometoxi o trifluorometil.
 - j) R² es hidro.
 - k) R² es metoxi.
 - l) R² es trifluorometoxi.
 - m) R² trifluorometil.
 - n) R³ es hidro.
 - o) R³ es metoxi.
- En una realización, se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:
- R¹ es hidro, metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi;
- R² es hidro; y
- R³ es metoxi.
- En una realización, se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:
- R¹ es metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi;
- R² es hidro; y
- R³ es metoxi.
- En una realización, se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:
- R¹ es hidro;

R² es metoxi, trifluorometoxi o trifluorometil; y

R³ es hidro.

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de:

- 5 (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida;
(2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida;
(2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida;
2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il] acetamida;
N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometil)fenil]acetamida; y
 - 10 N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometoxi)fenil] acetamida.

En una realización se suministra (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización se suministra (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida.
 - 15 En una realización se suministra una sal farmacéuticamente aceptable de (2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida.

En una realización se suministra (2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
 - 20 En una realización se suministra (2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida.

En una realización se suministra una sal farmacéuticamente aceptable de (2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida.

En una realización se suministra (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
 - 25 En una realización se suministra (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida.

En una realización se suministra una sal farmacéuticamente aceptable de (2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il] acetamida.
 - 30 En una realización se suministra 2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En una realización se suministra 2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida.

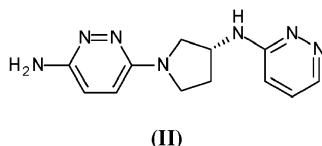
En una realización se suministra una sal farmacéuticamente aceptable de 2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il] acetamida.
 - 35 Los compuestos y sales descritos en esta memoria pueden existir en formas solvatada y formas no solvatadas. Por ejemplo, una forma solvatada puede ser una forma hidratada, tal como un hemihidrato, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato o una cantidad alternativa de ellos. La presente invención abarca todas tales formas solvatadas y no solvatadas de compuestos de la Fórmula (I).
 - 40 Los átomos de los compuestos y sales descritos en esta memoria pueden existir como sus isótopos. La presente invención abarca todos los compuestos de la Fórmula (I) en los que un átomo está reemplazado por uno o más de sus isótopos (por ejemplo un compuesto de la Fórmula (I) en la que uno o más átomos de carbono es un isótopo ¹¹C o ¹³C de carbono, o en la que uno o más átomos de hidrógeno es un isótopo ²H (deuterio) o ³H (tritio)).
 - 45 Los compuestos y sales descritos en esta memoria pueden existir como una mezcla de tautómeros. Los "tautómeros" son isómeros estructurales que existen en equilibrio resultante de la migración de un átomo de hidrógeno. La presente invención incluye todos los tautómeros de compuestos de la Fórmula (I).
- Los compuestos de la Fórmula (I) existen en formas ópticamente activas, en virtud de sus átomos asimétricos de

carbono.

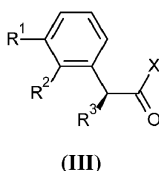
Ciertos compuestos de la Fórmula (I) (por ejemplo aquellos en los que R^3 es hidrógeno) existen como un enantiómero individual. Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es un enantiómero individual que está en un exceso enantiomérico (%ee) de $\geq 95\%$, $\geq 98\%$ o $\geq 99\%$. En una realización, el enantiómero individual está presente en exceso enantiomérico (%ee) de $\geq 99\%$.

Ciertos compuestos de la Fórmula (I) (por ejemplo aquellos en los que R^3 es metoxi) existen como un diastereoisómero individual. Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es un diastereoisómero individual que está en un exceso diastereoisomérico (%de) de $\geq 95\%$, $\geq 98\%$ o $\geq 99\%$. En una realización, el diastereoisómero individual está presente en un exceso diastereoisomérico (%de) de $\geq 99\%$.

Los compuestos de la Fórmula (I) pueden ser preparados por ejemplo mediante la reacción de un compuesto de la Fórmula (II):



con un compuesto de la fórmula (III):



en la que R^1 , R^2 y R^3 son como se definió en cualquiera de las realizaciones de esta memoria y X es un grupo saliente, tal como un átomo de halógeno (por ejemplo un átomo de cloro) o un grupo hidroxilo. La reacción es ejecutada de manera conveniente en un solvente adecuado (por ejemplo DMF o DMA) y en la presencia de una base (por ejemplo DIPEA) a una temperatura adecuada (por ejemplo a temperatura ambiente de alrededor de 20 a 30°C o a temperatura elevada, tal como entre 80 y 120°C, o alternativamente alrededor de 100°C). Cuando X es un grupo hidroxilo, para formar el enlace amida se usa un agente de acoplamiento adecuado (por ejemplo HATU).

Por ello, los compuestos de la Fórmula (II), y sales de los mismos son útiles como sustancias intermedias en la preparación de los compuestos de la Fórmula (I) y suministran una realización adicional, no cubierta por la invención.

En una realización se suministra 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina, o una sal de la misma.

En una realización se suministra 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina.

Los compuestos de la Fórmula (III), y sales de los mismos, son usados de manera similar como sustancias intermedias en la preparación de los compuestos de la Fórmula (I) y suministran una realización adicional, no cubierta por la invención.

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (III), o una sal del mismo, donde:

R^1 es difluorometoxi o trifluorometoxi;

R^2 es hidro;

R^3 es metoxi; y

X es un grupo saliente. En una realización X es hidroxilo o cloro. En una realización X es hidroxilo.

En una realización se suministra ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxiacético, o una sal del mismo.

En una realización se suministra ácido 2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético, o una sal del mismo.

En una realización se suministra ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxiacético.

En una realización se suministra ácido 2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil] acético.

Los compuestos de la Fórmula (II) y fórmula (III) pueden ser preparados mediante procedimientos similares a aquellos mostrados en la sección de Ejemplos.

Una sal adecuada de un compuesto de la Fórmula (II) es, por ejemplo, una sal de adición ácida. Puede formarse una sal de adición ácida de un compuesto de la Fórmula (II), poniendo el compuesto en contacto con un ácido orgánico o ácido inorgánico adecuado, bajo condiciones conocidas por la persona experta. No se requiere que tales ácidos generen sales farmacéuticamente aceptables cuando forman par con un compuesto de la Fórmula (II). Por ejemplo puede formarse una sal de adición ácida, usando un ácido inorgánico seleccionado de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. También puede formarse una sal de adición ácida, por ejemplo, usando un ácido orgánico seleccionado de entre ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico.

Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (II) o una sal del mismo, donde la sal es una sal de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico o ácido bencenosulfónico.

Una sal adecuada de un compuesto de la Fórmula (III) es una sal de adición básica. Puede formarse una sal de adición básica de un compuesto de la Fórmula (III), poniendo en contacto el compuesto con una base orgánica o inorgánica adecuada, bajo condiciones conocidas por el experto. No se requiere que tales bases generen sales farmacéuticamente aceptables, cuando forman par con un compuesto de la Fórmula (III). Por ejemplo puede formarse una sal de adición básica, usando una base inorgánica seleccionada de entre un hidróxido de metal alcalino (tal como hidróxido de sodio, potasio o litio) o un hidróxido de metal alcalinotérreo (tal como hidróxido de calcio o hidróxido de magnesio). También puede formarse una sal de adición básica, usando una base orgánica seleccionada de entre metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfina y tris-(2-hidroxietil)amina.

Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (III) o una sal del mismo, cuando 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, morfina o tris-(2-hidroxietil)amina.

Como un resultado de su actividad inhibidora de GLS1, se espera que los compuestos de la Fórmula (I), y sales farmacéuticamente aceptables de ellos sean útiles en la terapia, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades o condiciones médicas mediadas por lo menos en parte por GLS1, incluyendo cáncer.

Donde se mencione "cáncer", éste incluye el cáncer metastásico y también el cáncer no metastásico, tal que el tratamiento del cáncer involucra el tratamiento de tumores primarios y también metástasis tumoral.

En una realización el cáncer es cáncer metastásico.

En una realización el cáncer es cáncer no metastásico.

La "actividad inhibidora de GLS1" se refiere a un descenso en la actividad de GLS1 como una respuesta directa o indirecta a la presencia de un compuesto de la Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, respecto a la actividad de GLS1 en la ausencia del compuesto de la Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal descenso en la actividad puede deberse a la interacción directa del compuesto de la Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo con GLS1, o deberse a la interacción del compuesto de la Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más otros factores que a su vez afectan la actividad de GLS1. Por ejemplo, el compuesto de la Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede decrecer GLS1 mediante enlace directo con GLS1, causando (directa o indirectamente) otro factor para disminuir la actividad de GLS1, o por descenso (directo o indirecto), de la cantidad de GLS 1 presente en la célula u organismo.

Se pretende que el término "terapia" tenga su significado normal de tratamiento de una enfermedad, con objeto de aliviar total o parcialmente uno, algunos o todos sus síntomas, o corregir o compensar la patología subyacente. El término "terapia" incluye también "profilaxis", a menos que existan indicaciones específicas en sentido contrario. Los términos "terapéutico" y "terapéuticamente" deberían ser interpretados de una manera correspondiente.

Se pretende que el término "profilaxis" tenga su significado normal e incluya profilaxis primaria para prevenir el desarrollo de la enfermedad y profilaxis secundaria, en la cual la enfermedad ya se ha desarrollado y el paciente está protegido temporal o permanentemente contra la exacerbación o empeoramiento de la enfermedad o el desarrollo de nuevos síntomas asociados con la enfermedad.

El término "tratamiento" es usado como sinónimo de "terapia". De manera similar, el término "tratar" puede ser mirado como la aplicación de terapia donde "terapia" es como se define en esta memoria.

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

En una realización se suministra el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la manufactura de un medicamento.

En cualquier realización, el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por GLS1. En una realización, dicha enfermedad mediada por GLS1 es cáncer. En una realización, dicho cáncer es seleccionado de cáncer de mama (por ejemplo cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de célula no pequeña), cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.

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

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer.

- 10 En una realización se suministra el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por GLS1. En una realización, dicha enfermedad mediada por GLS1 es cáncer. En una realización, dicho cáncer es seleccionado de cáncer de mama (por ejemplo cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de célula no pequeña), cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.

- 15 En una realización se suministra el uso del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

- 20 También se describe un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad, en la cual la inhibición de GLS1 es benéfica en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, el cual comprende la administración a dicho animal de sangre caliente, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto de la Fórmula (I) como se describe en cualquiera de las realizaciones en esta memoria, que es efectiva para suministrar "terapia" a un sujeto, o "tratar" una enfermedad o desorden en un sujeto. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva puede causar cualquiera de los cambios observables o medibles en un sujeto, como se describe arriba en la definición de "terapia", "tratamiento" y "profilaxis". Por ejemplo, la cantidad efectiva puede reducir el número de células de cáncer o de tumor; reducir el tamaño total del tumor; inhibir o detener la infiltración de células de tumor dentro de órganos periféricos, incluyendo por ejemplo, el tejido blando y huesos; inhibir y detener la metástasis de tumor; inhibir y detener el crecimiento de tumor; aliviar en alguna extensión uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reducir la morbilidad y mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. Una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para reducir los síntomas de una enfermedad que responde a la inhibición de la actividad de GLS1. Para la terapia de cáncer puede medirse la eficacia *in vivo*, por ejemplo, evaluando la duración de supervivencia, tiempo para la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), duración de respuesta y/o calidad de vida. Como reconocen aquellos expertos en la técnica, las cantidades efectivas pueden variar dependiendo de la ruta de administración, uso de excipiente, y couso con otros agentes. Por ejemplo, cuando se usa una terapia de combinación, la cantidad del compuesto de la Fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable descrita en esta memoria y la cantidad de otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s), cuando están combinadas, son efectivas conjuntamente para tratar el desorden objetivo en el paciente animal. En este contexto, las cantidades combinadas están en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si ellas son, cuando están combinadas, suficientes para reducir los síntomas de una enfermedad que responde a la inhibición de actividad de GLS1, como se describió anteriormente. Típicamente, tales cantidades pueden ser determinadas por alguien experto en la técnica mediante, por ejemplo, inicio con el intervalo de dosificación descrito en esta memoria para el compuesto de la Fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un(os) intervalo(s) de dosificación aprobado(s) o de otra forma publicado(s), de el(los) otro(s) compuesto(s) farmacéuticamente activo(s).

- 45 "Animales de sangre caliente" incluye, por ejemplo, humanos.

- 50 También se describe un procedimiento para el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente que necesita tal tratamiento, el cual comprende la administración a dicho animal de sangre caliente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, dicho cáncer es seleccionado de cáncer de mama (por ejemplo cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de célula no pequeña), cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.

En cualquier realización, el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

- 55 El tratamiento descrito en esta especificación contra el cáncer puede ser aplicado como una terapia única, o puede involucrar, adicionalmente a la administración del compuesto de la Fórmula (I), cirugía convencional, radioterapia o

quimioterapia; o una combinación de tales terapias adicionales. Tal cirugía, radioterapia o quimioterapia convencionales pueden ser administradas simultáneamente, secuencialmente o separadamente del tratamiento con el compuesto de la Fórmula (I).

5 Por ello, en una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos una sustancia adicional antitumor, para uso en el tratamiento de cáncer.

En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos una sustancia adicional antitumor, para uso en el tratamiento simultáneo, separado o secuencial de cáncer.

10 En una realización se suministra un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer, donde el compuesto de la Fórmula (I) es administrado simultáneamente, separadamente o secuencialmente con por lo menos una sustancia adicional antitumor.

15 También se describe un procedimiento para el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente, que necesita de tal tratamiento, el cual comprende la administración a dicho animal de sangre caliente, de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y por lo menos una sustancia adicional antitumor, en el que las cantidades del compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la sustancia adicional antitumor son efectivas conjuntamente en la producción de un efecto anticáncer.

20 También se describe un procedimiento para el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente, que necesita de tal tratamiento, el cual comprende la administración a dicho animal de sangre caliente, de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la administración simultánea, separada o secuencial de por lo menos una sustancia adicional antitumor a dicho animal de sangre caliente, en el que las cantidades del compuesto de la Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la sustancia adicional antitumor son efectivas conjuntamente en la producción de un efecto anticáncer.

En cualquier realización, la sustancia adicional antitumor es un taxano. En una realización el taxano es paclitaxel. En una realización el taxano es docetaxel.

25 En cualquier realización, la sustancia adicional antitumor es una terapia de platino. En una realización la terapia de platino es cis-platino, oxaliplatino, o carboplatino.

En una realización se suministra una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I) y por lo menos una sustancia adicional antitumor. En una realización la composición farmacéutica comprende también por lo menos un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables.

30 En una realización se suministra una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I) y por lo menos una sustancia adicional antitumor, para uso en el tratamiento de cáncer. En una realización la composición farmacéutica comprende también por lo menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.

En una realización la sustancia adicional antitumor es un taxano. En una realización el taxano es paclitaxel. En una realización el taxano es docetaxel.

35 En una realización la sustancia adicional antitumor es una terapia de platino. En una realización la terapia de platino es -platino, oxaliplatino, o carboplatino.

En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

De acuerdo con una realización adicional, se suministra un kit que comprende:

40 a) un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una primera forma de unidad de dosificación;

b) otra sustancia adicional antitumor en una forma de unidad de dosificación adicional;

c) medios de contención para contener dichas formas primera y adicional de dosificación unitaria; y opcionalmente

d) instrucciones para el uso.

45 En una realización la sustancia adicional antitumor es un taxano. En una realización el taxano es paclitaxel. En una realización el taxano es docetaxel.

En una realización la sustancia adicional antitumor es una terapia de platino. En una realización la terapia de platino es cis-platino, oxaliplatino, o carboplatino.

50 En una realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En una realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Los compuestos de la Fórmula (I), y sales farmacéuticamente aceptables de ellos, pueden ser administrados como composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Por ello, en una realización se suministra una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.

En una realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En una realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para uso oral (por ejemplo como comprimidos, pastillas, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas o aceitosas, emulsiones, polvos o gránulos dispersables, jarabes o elixires), para uso tópico (por ejemplo como cremas, ungüentos, geles, o soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas), para administración por inhalación (por ejemplo como un polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para administración mediante insuflación (por ejemplo como un polvo finamente dividido) o para administración parenteral (por ejemplo como una solución acuosa o aceitosa estéril para dosificación intravenosa, subcutánea, intramuscular o intramuscular), o como un supositorio para dosificación rectal. Las composiciones de la invención pueden ser obtenidas mediante procedimientos convencionales, usando excipientes farmacéuticos convencionales, bien conocidos en la técnica. Así, las composiciones destinadas al uso oral pueden contener, por ejemplo, uno o más agentes colorantes, edulcorantes, saborizantes y/o conservantes.

En una realización se suministra una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables, para uso en terapia.

En una realización se suministra una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de cáncer. En una realización dicho cáncer es seleccionado de cáncer de mama (por ejemplo cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de célula no pequeña), cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.

En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de entre los Ejemplos. En cualquier realización el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

El compuesto de la Fórmula (I) será administrado normalmente a un animal de sangre caliente, a una dosificación unitaria dentro del intervalo de 5-5000 mg/m² de área corporal del animal, o por ejemplo aproximadamente 0.1-100 mg/kg, y esto suministra normalmente una dosificación terapéuticamente efectiva. Una forma de dosificación unitaria tal como un comprimido o cápsula contendrá usualmente, por ejemplo 1-250 mg de ingrediente activo. Necesariamente, la dosificación diaria variará dependiendo del huésped tratado, la ruta particular de administración, cualquier terapia que esté siendo coadministrada, y la severidad de la enfermedad que está en tratamiento. De acuerdo con ello, el profesional médico que está tratando cualquier paciente particular, puede determinar la dosificación óptima.

Ejemplos

Mediante los siguientes Ejemplos se ilustran las diversas realizaciones. La invención no debe ser interpretada como limitada a los Ejemplos. Durante la preparación de los Ejemplos, generalmente:

i. las operaciones fueron llevadas 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 establezca de otro modo;

ii. las evaporaciones fueron llevadas a cabo mediante evaporación rotativa o utilizando equipo Genevac al vacío, y los procedimientos de puesta a punto fueron llevados a cabo después del retiro mediante filtración de residuos sólidos;

iii. Se ejecutaron purificaciones de cromatografía instantánea en un Isco Combiflash Companion automatizado usando columnas Grace Resolve de sílice preempacadas, e Isco Combiflash Rf (instantánea en fase inversa) usando columnas Redisep Gold C18;

iv. los rendimientos, cuando se obtuvieron, no son necesariamente el máximo obtenible;

v. las estructuras de productos finales de la Fórmula (I) fueron confirmadas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), con valores de desplazamiento químico por RMN medidos sobre la escala delta. se determinaron espectros de resonancia magnética de protón, usando un instrumento Bruker Advance 700 (700MHz), Bruker Avance 500 (500 MHz), Bruker 400 (400 MHz) o Bruker 300 (300 MHz); se determinaron ¹⁹F RMN a 282 MHz o 376 MHz; se determinaron ¹³C RMN a 75 MHz o 100 MHz; las mediciones fueron tomadas a alrededor de 20 - 30°C, a menos que se especifique de otro modo; se han usado 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 tripletes; bs, señal amplia;

vi. los productos finales de la Fórmula (I) fueron caracterizados también mediante espectroscopía de masas después

de cromatografía líquida (LCMS), usando un sistema HPLC basado en un sistema Waters 2790/95 LC con un 2996 PDA y un espectrómetro de masas de cuadrupolo 2000 amu ZQ individual. Los solventes usados fueron A= agua, B= acetonitrilo, C= 50:50 acetonitrilo: agua con 0.1% ácido fórmico y D= 50:50 acetonitrilo: agua con 0.1% de hidróxido de amonio. A una tasa de flujo de 1.1ml/min se inyectaron 5µl de muestra sobre una columna 50 x 2.1 5µm Phenomenex Gemini NX. El gradiente evolucionó de 95% de A a 95% de B por 4.0 min con una infusión constante al 5% de C (para análisis de ácido, D es usado para análisis de base). El flujo fue mantenido a 95% B por 0.5 min antes de retornar a las condiciones iniciales. Los datos fueron adquiridos de 150 a 850 amu modo positivo y negativo sobre el espectrómetro de masas y 220 -320nm sobre el PDA. La LCMS fue ejecutada también sobre un sistema UPLC utilizando una bomba binaria Waters Aquity con manejador de muestra, Aquity PDA y un espectrómetro de masas SQD. Los solventes usados fueron A1= 0.1% de ácido fórmico (aq), B1 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo, A2 = 0.1% de hidróxido de amonio (aq) y B2 0.1% de hidróxido de amonio en acetonitrilo. A una tasa de flujo de 1ml/min se inyectó 1 µL de muestra sobre una columna 50 x 2.1 1.7µm Waters BEH (a 40°C). El gradiente evolucionó de 97% de A1 a 97% de B1 en un periodo de 1.30 min, antes de ser mantenido por 0.2 min y volviendo a las condiciones iniciales (sustituye A1 y B1 por A2 y B2 para análisis de base). Los datos fueron adquiridos de 150 - 1000 amu en modo de ion positivo y negativo, sobre el espectrómetro de masas y 245 -320 amu sobre el PDA;

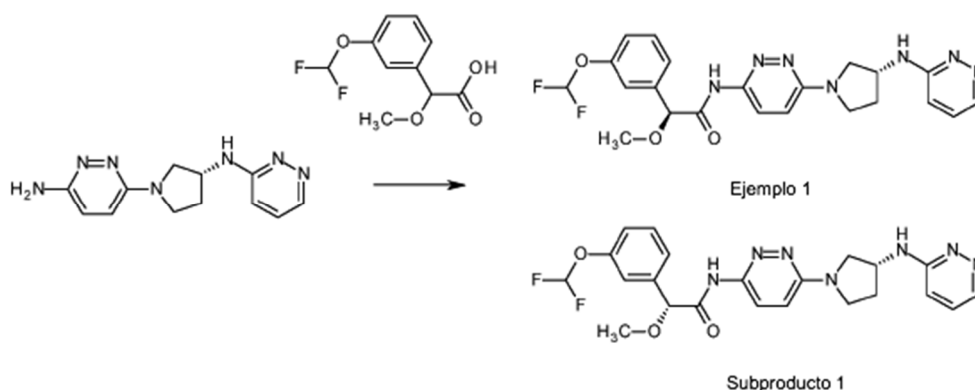
vii. en general las sustancias intermedias no fueron completamente caracterizadas y la pureza fue evaluada mediante análisis por cromatografía en capa delgada, espectro de masas, HPLC y/o RMN;

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

ix. los valores IUPAC fueron generados usando 'SmiToSd', un programa de propiedad construido alrededor de la herramienta OpenEye Lexichem (<http://www.eyesopen.com/lexichem-tk>).

Ejemplo 1

(2*S*)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[6-[(3*R*)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida



Se añadió HATU (931 mg, 2.45 mmol) a 6-[(3*R*)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (sustancia 1 intermedia, 525 mg, 2.04 mmol), ácido 2-(3-(difluorometoxi)fenil)-2-metoxiacético (sustancia 6 intermedia, 521 mg, 2.24 mmol) y DIPEA (1.066 ml, 6.12 mmol) en DMF (12 ml). La solución resultante fue agitada a 0°C por 5 minutos y luego a r.t. por 3 h. Se diluyó esta solución con MeOH (7 ml) y se pasó a través de un cartucho 20 g SCX-2, enjuagando con MeOH para retirar las impurezas, seguido por una solución IN de amoníaco en MeOH para obtener el producto. El solvente fue evaporado bajo presión reducida para dar el producto crudo. El residuo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 0 a 6% MeOH en DCM. Las fracciones que contenían producto fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar 2-(3-(difluorometoxi)fenil)-2-metoxi-*N*-[6-[(3*R*)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (490 mg, 50%) como un sólido. El producto crudo fue purificado mediante HPLC preparativa (columna Chiralpak IF, 20 µm de sílice, diámetro de 50 mm, longitud de 250 mm), realizando elución con MeOH 100% a 150 ml/min. Las fracciones que contenían los compuestos deseados fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar:

(2*S*)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-*N*-[6-[(3*R*)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (Ejemplo 1) como el primer isómero eluido (169 mg, 18%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2.0 - 2.1 (1H, m), 2.29 - 2.39 (1H, m), 3.37 (3H, s), 3.39 - 3.45 (1H, m), 3.51 - 3.66 (2H, m), 3.83 (1H, dd), 4.58 - 4.67 (1H, m), 5.02 (1H, s), 6.81 (1H, dd), 6.98 (1H, d), 7.04 - 7.48 (7H, m), 7.91 (1H, d),

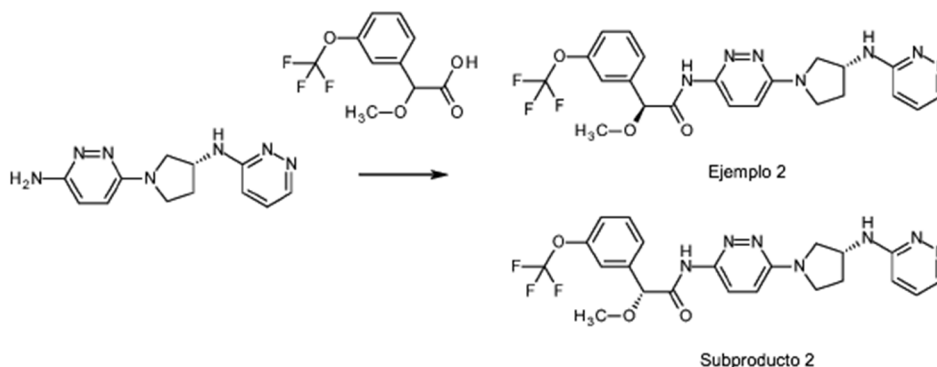
8.46 (1H, dd), 10.58 (1H, s); m/z : ES+ [M+H]⁺ 472.

(2R)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (subproducto 1) como el segundo isómero eluido (178 mg, 19%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2.04 - 2.15 (1H, m), 2.32 - 2.44 (1H, m), 3.41 (3H, s), 3.46 (1H, dd), 3.55 - 3.71 (2H, m), 3.87 (1H, dd), 4.62 - 4.72 (1H, m), 5.07 (1H, s), 6.86 (1H, d), 7.02 (1H, d), 7.09 - 7.53 (7H, m), 7.95 (1H, d), 8.50 (1H, d), 10.65 (1H, s); m/z : ES+ [M+H]⁺ 472.

Ejemplo 2

(2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida



Se añadió HATU (355 mg, 0.93 mmol) a ácido 2-metoxi-2-(3-(trifluorometoxi)fenil)acético (sustancia 7 intermedia, 214 mg, 0.86 mmol), 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (sustancia 1 intermedia, 200 mg, 0.78 mmol), y DIPEA (0.406 ml, 2.33 mmol) en DMF (4 ml) a 21°C. Se agitó luego la solución resultante a temperatura ambiente por 1 h. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía de intercambio iónico, usando una columna SCX. El producto crudo fue eluido de la columna usando amoníaco 1M/MeOH y adsorbido sobre sílice. El producto crudo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 0 a 7% MeOH (con amoníaco 7M /MeOH) en DCM. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar la mezcla de diastereoisómeros como una goma (150mg). Se separó luego la mezcla usando HPLC quiral preparativa (sílice de 20 µm, 50 diámetro de mm, longitud de 250 mm) usando MeOH como eluyente. Las fracciones que contenían los compuestos deseados fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar:

(2R)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (subproducto 2) como el primer isómero eluido (47.0 mg, 12%).

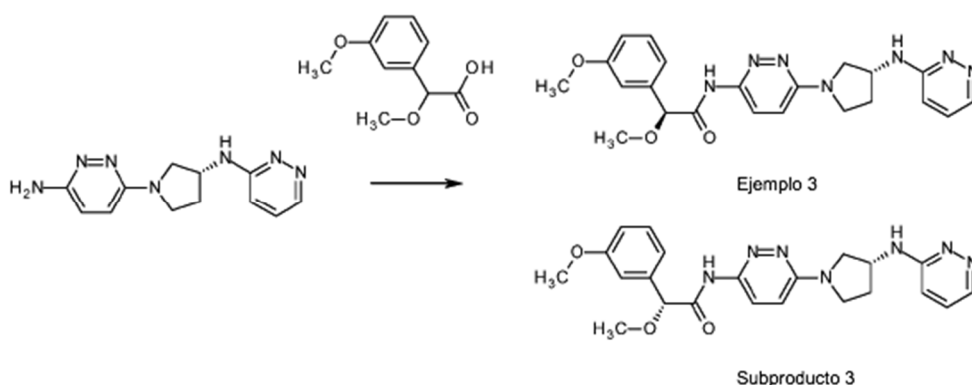
¹H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2 - 2.14 (1H, m), 2.26 - 2.43 (1H, m), 3.38 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.51 - 3.66 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.53 - 4.71 (1H, m), 5.07 (1H, s), 6.81 (1H, dd), 6.97 (1H, d), 7.08 (1H, d), 7.24 (1H, dd), 7.3 - 7.4 (1H, m), 7.48 (1H, s), 7.52 - 7.59 (2H, m), 7.90 (1H, d), 8.45 (1H, dd), 10.63 (1H, s); m/z : ES+ [M+H]⁺ 490.

(2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (Ejemplo 2) como el segundo isómero eluido (178 mg, 19%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2 - 2.14 (1H, m), 2.26 - 2.43 (1H, m), 3.38 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.51 - 3.66 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.53 - 4.71 (1H, m), 5.07 (1H, s), 6.81 (1H, dd), 6.97 (1H, d), 7.08 (1H, d), 7.24 (1H, dd), 7.3 - 7.4 (1H, m), 7.48 (1H, s), 7.52 - 7.59 (2H, m), 7.90 (1H, d), 8.45 (1H, dd), 10.63 (1H, s); m/z : ES+ [M+H]⁺ 490.

Ejemplo 3

(2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida



Se añadió HATU (355 mg, 0.93 mmol) a ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético (sustancia 8 intermedia, 168 mg, 0.86 mmol), 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (sustancia 1 intermedia, 200 mg, 0.78 mmol), y DIPEA (0.406 ml, 2.33 mmol) en DMF (4 ml) a 21°C. Se agitó luego por 1 h la solución resultante a temperatura ambiente. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía de intercambio iónico, usando una columna SCX. El producto deseado fue eluido de la columna usando amoníaco 1M/MeOH y las fracciones puras fueron adsorbidas sobre sílice. El producto crudo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 0 a 7% MeOH (con amoníaco 7M/MeOH) en DCM. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar una mezcla de diastereoisómeros como un sólido. El producto crudo fue purificado mediante HPLC preparativa quiral (columna Phenomenex Lux C2, sílice de 20 µm, diámetro de 50 mm, longitud de 250 mm), EtOH/MeOH 50/50 a 100 ml/min. Las fracciones que contenían los compuestos deseados fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar:

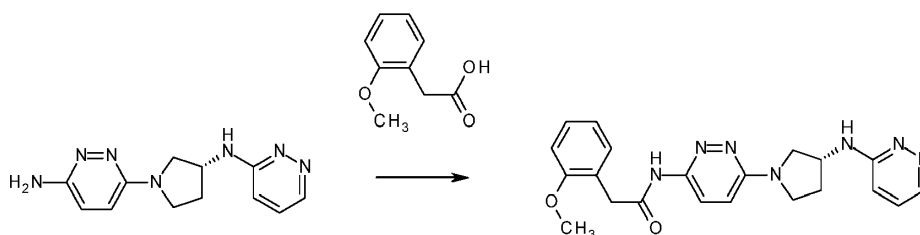
(2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (Ejemplo 3) como el primer isómero eluido (80 mg, 24%).

¹H RMN (500 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.95 - 2.16 (1H, m), 2.21 - 2.42 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.52 - 3.68 (2H, m), 3.76 (3H, s), 3.82 (1H, m), 4.55 - 4.7 (1H, m), 4.95 (1H, s), 6.82 (1H, d), 6.86 - 6.93 (1H, d), 6.98 (1H, d), 7.04 - 7.15 (3H, m), 7.25 (1H, dd), 7.28 - 7.32 (1H, dd), 7.91 (1H, d), 8.46 (1H, dd), 10.47 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]⁺ 436.

(2R)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (subproducto 3) como el segundo isómero eluido (75 mg, 22%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.95 - 2.16 (1H, m), 2.21 - 2.42 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.52 - 3.68 (2H, m), 3.76 (3H, s), 3.82 (1H, m), 4.55 - 4.7 (1H, m), 4.95 (1H, s), 6.82 (1H, d), 6.86 - 6.93 (1H, d), 6.98 (1H, d), 7.04 - 7.15 (3H, m), 7.25 (1H, dd), 7.28 - 7.32 (1H, dd), 7.91 (1H, d), 8.46 (1H, dd), 10.47 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]⁺ 436.

Ejemplo 4

2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida

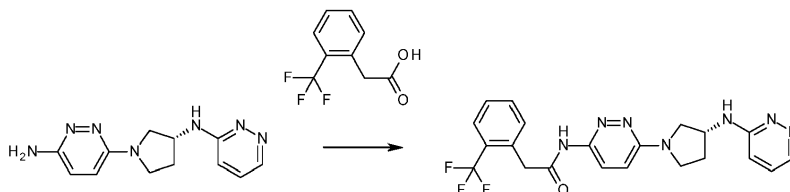


Se disolvieron 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (sustancia 1 intermedia, 0.03 g, 0.117 mmol) y ácido (2-metoxifenil)acético (0.02 g, 0.117 mmol) en DMF (1 ml). A continuación, se añadió HATU (0.04 g, 0.117 mmol) y se agitó la reacción por 5 min. Se añadió luego DIPEA (0.04 g, 0.291 mmol) en una porción y se dejó en agitación la mezcla a r.t. por 15 h. Se retiró el solvente bajo presión reducida y el producto crudo fue adsorbido sobre sílice y purificado mediante FCC con un gradiente de solvente de 100% DCM a 10% MeOH 90% DCM. Se combinaron las fracciones y se concentraron bajo presión reducida para suministrar una goma incolora (30 mg). La LCMS de este material mostró que era impura, por lo cual se disolvió el sólido en DMSO y se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters C18 SunFire, tamaño de poro 5µm, diámetro de 4.60 mm, longitud de 50 mm) usando como eluyentes mezclas con polaridad decreciente de agua (que contenía 0.1% de ácido fórmico) y acetonitrilo (que contenía 0.1% de ácido fórmico). Las fracciones que contenían el compuesto deseado fueron evaporadas hasta sequedad, disueltas en MeOH y pasadas a través de una columna SCX, descargando con MeOH y luego realizando elución del producto con amoníaco 2M en MeOH. Se evaporó el solvente bajo presión reducida para suministrar 2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida (17 mg, 47%) como un sólido de

color crema. ^1H RMN (400 MHz, DMSO, 21.8°C) δ 2.04 - 2.12 (1H, m), 2.32 - 2.41 (1H, m), 3.44 - 3.47 (m, 1H), 3.56 - 3.68 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.85 (dd, 1H), 4.62 - 4.69 (m, 1H), 6.85 (dd, 1H), 6.93 (td, 1H), 7.01 (d, 2H), 7.17 (d, 1H), 7.23 - 7.30 (m, 3H), 8.01 (d, 1H), 8.49 (dd, 1H), 10.65 (s, 1H); m/z : ES+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 406.3.

Ejemplo 5

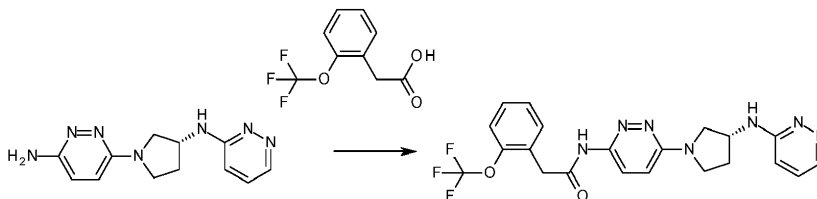
5 N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometil)fenil]acetamida



A una mezcla agitada de 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (sustancia 1 intermedia, 0.041 g, 0.159 mmol), ácido 2-[2-(trifluorometil)fenil]acético (0.032 g, 0.159 mmol) y HATU (0.061 g, 0.159 mmol) en DMF seco (1 ml) se añadió DIPEA (0.052 g, 0.398 mmol) y se dejó la mezcla en agitación bajo una atmósfera de nitrógeno por 15 h. Se retiró el solvente por evaporación bajo presión reducida, para dar una goma marrón, que fue disuelta en DMSO y purificada mediante HPLC preparativa (columna Waters C18 SunFire, tamaño de poro 5 μm , diámetro de 4.60 mm, longitud de 50 mm) usando como eluyentes mezclas de agua (que contenía 0.1% de ácido fórmico) y acetonitrilo (que contenía 0.1% de ácido fórmico) con polaridad decreciente. Las fracciones que contenían el compuesto deseado fueron evaporadas hasta sequedad para dar N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometil)fenil]acetamida como un polvo incoloro (0.065 g, 41%). ^1H RMN (400 MHz, DMSO, 21.8°C) δ 2.07 - 2.12 (1H, m), 2.30 - 2.38 (1H, m), 3.48 - 3.51 (m, 1H), 3.55 - 3.66 (m, 2H), 3.83 (dd, 1H), 4.00 (s, 2H), 4.59 - 4.61 (m, 1H), 7.01 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.43 (br s, 1H), 7.47 - 7.53 (m, 2H), 7.63 - 7.66 (m, 1H), 7.70 - 7.73 (m, 2H) 8.00 (d, 1H), 8.53 (br s, 1H), 10.95 (s, 1H); m/z : ES+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 444.

Ejemplo 6

20 N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometoxi)fenil]acetamida

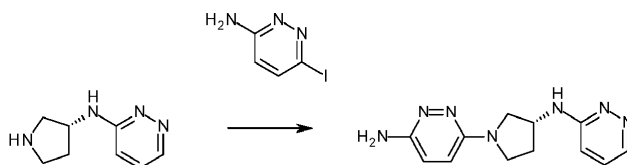


En un matraz de fondo redondo se pesaron ácido 2-[2-(trifluorometoxi)fenil]acético (0.04 g, 0.159 mmol) y 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (sustancia 1 intermedia, 0.04 g, 0.159 mmol). Se añadieron DMF (1 ml) y HATU (0.06 g, 0.159 mmol) y se agitó por 5 min para realizar la disolución. Luego se añadió en una porción DIPEA (0.05 g, 0.398 mmol) y se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente por 15 horas. Se retiró el solvente bajo presión reducida y fue absorbido sobre sílice y purificado mediante gradiente en cromatografía instantánea en columna, eluyendo con DCM 100% hasta de amoníaco 10% metanólico:DCM 90% para eluir el compuesto del título, como un sólido amarillo pálido (50 mg). El análisis por LCMS mostró que hubo una impureza de 5% de hidroxibenzotriazol (HOBt). Se disolvió el sólido en DMSO (1 ml) y se purificó mediante LCMS dirigida por masa (columna Waters C18 SunFire, tamaño de poro de 5 μm , diámetro de 4.60 mm, longitud de 50 mm). La tasa de flujo fue de 25 ml/min y la fase móvil de agua y acetonitrilo contenía 0.1% de ácido fórmico. La elución fue iniciada a 95% de agua:5% de acetonitrilo, que fue mantenida por 1.5 minutos con rampa hasta 5% de agua:95% de acetonitrilo por 10 minutos. Esto se mantuvo entonces por 30 segundos, tal que la longitud completa de la carrera fue de 12 minutos. Se añadieron las fracciones apropiadas a un cartucho SCX y se lavó con metanol, y luego el compuesto del título fue eluido con amoníaco 2M en metanol. Se evaporó el solvente bajo presión reducida para suministrar N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometoxi)fenil]acetamida como un sólido blanco (0.038 g, 51%).

^1H RMN (400 MHz, DMSO, 21.8°C) δ 2.01 - 2.08 (1H, m), 2.28 - 2.37 (1H, m), 3.42 (dd, 1H), 3.52 - 3.64 (m, 2H), 3.81 (dd, 1H), 3.85 (s, 2H), 4.60 - 4.63 (m, 1H), 6.81 (dd, 1H), 6.98 (d, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.24 (dd, 1H), 7.32 - 7.43 (m, 3H), 7.47 - 7.49 (m, 1H) 7.95 (d, 1H), 8.45 (dd, 1H), 10.90 (s, 1H); m/z : ES+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 460.

Sustancia 1 intermedia

6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina

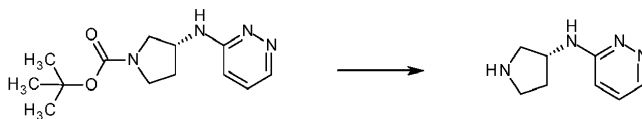


Se añadió ácido (2S,4R)-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (0.240 g, 1.83 mmol) a una solución de (R)-N-(pirrolidin-3-il)piridazin-3-amina (sustancia 2 intermedia, 1.5 g, 9.13 mmol) en DMSO seco (12 ml). Luego, de uno en uno se añadieron yoduro de cobre (I) (0.174 g, 0.91 mmol) seguido por 6-iodopiridazin-3-amina (sustancia 3 intermedia, 2.62 g, 11.88 mmol) y luego fosfato de potasio (5.82 g, 27.40 mmol). Se dejó luego la mezcla de reacción en agitación a temperatura ambiente bajo nitrógeno por 24 h. Se diluyó la mezcla con MeOH (12 ml) y agua (12 ml). Se neutralizó la mezcla con ácido acético, causando la precipitación de un sólido, el cual fue recolectado. Se decantó la capa líquida para uso en el paso de SCX y se lavó el sólido con MeOH (2 x 5 ml), combinándose las capas de lavado con la capa líquida del paso anterior y pasando a través de un cartucho SCX de 20g, descargando con MeOH para retirar impurezas, seguido por una solución 1N de amoníaco en MeOH, para obtener el producto. Se evaporó el solvente bajo presión reducida y el residuo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 0 a 10% (amoníaco 7N en MeOH) en DCM. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar 6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-amina (1.220 g, 52%) como una goma.

^1H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.99 (1H, m), 2.22 - 2.37 (1H, m), 3.44 (1H, m), 3.53 (1H, m), 3.73 (1H, m), 4.05 (1H, m), 4.55 - 4.66 (1H, m), 5.43 (2H, s), 6.75 (1H, d), 6.79 - 6.88 (2H, m), 7.04 (1H, d), 7.23 (1H, dd), 8.44 (1H, dd); m/z : ES+ [M+H]⁺ 258.

Sustancia 2 intermedia

N-[(3R)-pirrolidin-3-il]piridazin-3-amina

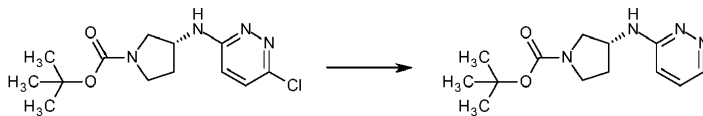


Se añadió TFA (12.00 ml) a tert-butil (3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-carboxilato (sustancia 3 intermedia, 2.2 g, 8.32 mmol) en DCM (80 ml) y se dejó la solución amarilla en agitación a temperatura ambiente por 1 h. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía de intercambio iónico, usando una columna SCX. El producto deseado fue eluido de la columna usando amoníaco 7M/MeOH y las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar N-[(3R)-pirrolidin-3-il]piridazin-3-amina (1.39 g, 102%) como una goma amarilla.

^1H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.57 (1H, m), 1.91 - 2.1 (1H, m), 2.61 (1H, m), 2.78 (1H, m), 2.89 (1H, m), 3.04 (1H, m), 4.14 - 4.38 (1H, m), 6.76 (2H, m), 7.20 (1H, d), 8.40 (1H, d); m/z : ES+ [M+H]⁺ 165.

Sustancia 3 intermedia

Tert-butil (3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-carboxilato

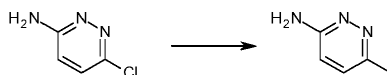


Se añadió paladio al 10% sobre C (0.810 g, 7.61 mmol) a tert-butil(3R)-3-[(6-cloropiridazin-3-il)amino]pirrolidin-1-carboxilato (sustancia 5 intermedia, 7g, 15.23 mmol) y formiato de amonio (14.40 g, 228.44 mmol) en etanol (200 ml) a 21°C bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla resultante en reflujo por 3 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de celita y se lavó con MeOH/DCM. El producto crudo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 0 a 15% MeOH en DCM. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar tert-butil(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-carboxilato (2.230 g, 55%) como un sólido amarillo.

^1H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.40 (9H, s), 1.86 (1H, m), 2.16 (1H, m), 3.29 - 3.46 (3H, m), 3.60 (1H, m), 4.43 (1H, m), 6.81 (1H, dd), 7.00 (1H, d), 7.24 (1H, dd), 8.45 (1H, dd); m/z : ES+ [M+H]⁺ 265.

Sustancia 4 intermedia

6-iodopiridazin-3-amina.

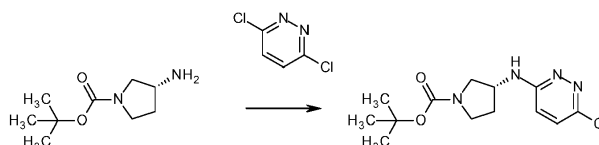


Se cargó 6-cloropiridazin-3-amina (3.7 g, 28.56 mmol) a un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador de reflujo y barra para agitación magnética. A esto se añadió luego yoduro de hidrógeno (solución al 57 % en peso en agua, 20 ml, 265.96 mmol), y se calentó la solución marrón oscuro resultante, hasta reflujo suave y se dejó agitando por 6 h. Se enfrió la mezcla a r.t. y se separó por filtración el sólido crudo, enjuagando el recipiente de reacción sobre la torta de filtro con un volumen adicional de agua fría con hielo (2 x ~30ml). El sólido resultante fue repartido entre etil acetato e hidróxido de sodio acuoso 2N, se lavó la capa orgánica con salmuera acuosa, se secó, se filtró y evaporó bajo presión reducida para dar 6-iodopiridazin-3-amina (4.10 g, 65%) como un sólido.

^1H RMN (400 MHz, DMSO, 27°C) δ 6.52 (2H, s), 6.55 (1H, d), 7.54 (1H, d).

Sustancia 5 intermedia

10 Tert-butil (3R)-3-[(6-cloropiridazin-3-il)amino]pirrolidin-1-carboxilato

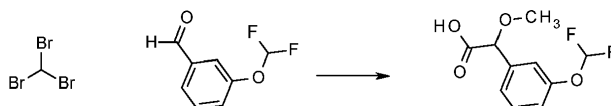


Se añadió DIPEA (22.44 ml, 128.86 mmol) a 3,6-dicloropiridazina (6.40 g, 42.95 mmol), tert-butil(3R)-3-aminopirrolidin-1-carboxilato (8 g, 42.95 mmol) en NMP (150 ml) a 21°C bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla a 150°C por 24 h. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (400 ml), y se lavó dos veces con agua (200 ml). Se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y adsorbió sobre sílice. El producto crudo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 20 a 70% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar tert-butil(3R)-3-[(6-cloropiridazin-3-il)amino]pirrolidin-1-carboxilato (7.10 g, 55%) como sólido rosa/rojo.

^1H RMN (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.40 (9H, s), 1.86 (1H, m), 2.15 (1H, m), 3.16 (1H, m), 3.33 - 3.49 (2H, m), 3.59 (1H, m), 4.38 (1H, m), 6.91 (1H, d), 7.31 (1H, d), 7.38 (1H, d); m/z : ES- [M-h]- 297.

Sustancia 6 intermedia

Acido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxiacético

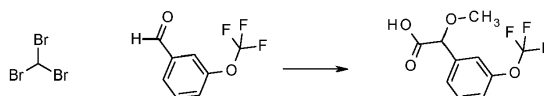


Se añadió en porciones hidróxido de potasio sólido (5.38 g, 95.86 mmol) en un periodo de 1 h a una solución agitada de 3-(difluorometoxi)benzaldehído (3 g, 17.43 mmol), bromoformo (1.829 ml, 20.91 mmol) y MeOH anhidro (25 ml) a 0°C. Se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la reacción a temperatura ambiente (se inició una reacción fuertemente exotérmica). Se dejó la reacción con agitación durante la noche. Se separó por filtración el sólido inorgánico y se lavó con MeOH. Se concentró el filtrado al vacío hasta un volumen pequeño, se diluyó con agua (100 ml) y se lavó dos veces con Et_2O (2x50 ml) y se acidificó hasta pH 2 mediante adición lenta de HCl 37%. Se realizó extracción a la mezcla con etil acetato (3 x 50 ml). Se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y evaporó para suministrar el producto crudo. El producto crudo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 0 a 60% de etil acetato en heptano con 0.5% de ácido fórmico. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar ácido 2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxiacético (1.710 g, 42%) como una goma.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , 30°C) δ 3.33 (3H, s), 4.82 (1H, s), 7.16 (2H, dd), 7.28 (1H, d), 7.23 (1H, t), 7.42 - 7.47 (1H, m), 12.93 (1H, s); m/z : ES- [M-h]- 231.25.

Sustancia 7 intermedia

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

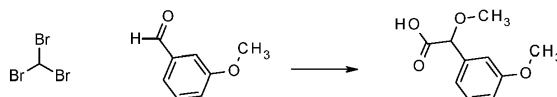


Se añadió una solución de hidróxido de potasio (1.851 g, 33.00 mmol) en MeOH (10 ml) en un periodo de 2 h en pequeñas porciones a una mezcla agitada de 3-(trifluorometoxi)benzaldehído (1.141 g, 6 mmol) y bromoformo (0.630 ml, 7.20 mmol) en MeOH (5.00 ml) a 0°C. Luego se dejó que la mezcla se calentara hasta r.t. y se dejó en agitación durante la noche. En la mezcla de reacción se había formado un precipitado blanco. Se dejó en reposo la reacción durante la noche. Se filtraron los sólidos bajo presión reducida, enjuagando con MeOH (15ml). Se evaporó la solución filtrada hasta una pasta blanca espesa, luego se disolvió nuevamente en agua (50 ml). Esto fue lavado luego con Et_2O

(50 ml) y luego se acidificó la fase acuosa hasta pH 2 (~5ml de solución 2M de HCl) dando una capa acuosa nubosa. Se realizó extracción a la fase acuosa con etil acetato (3 x 50 ml). Sobre sulfato de magnesio anhidro se secaron las fases orgánicas combinadas, y se filtraron, luego se evaporaron los solventes bajo presión reducida para dar un aceite claro. El producto crudo fue purificado mediante FCC, gradiente de elución 10 a 50% de etil acetato en heptano. Las fracciones puras fueron evaporadas hasta sequedad para suministrar ácido 2-metoxi-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]acético (0.832 g, 55%) como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 3.47 (3H, s), 4.81 (1H, s), 7.2 - 7.24 (1H, m), 7.33 (1H, s), 7.37 - 7.46 (2H, m); m/z: ES- [M-h]- 249.4.

Sustancia 8 intermedia

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



En pequeñas porciones se añadió una solución de hidróxido de potasio (2.267 g, 40.40 mmol) en MeOH (10 ml) en un periodo de 2 h a una mezcla agitada de 3-metoxibenzaldehído (1 g, 7.34 mmol) y bromoformo (0.771 ml, 8.81 mmol) en MeOH (5.00 ml) a 0°C. Se permitió entonces que la mezcla se calentara hasta r.t. y se dejó en agitación durante la noche. Se filtraron los sólidos bajo presión reducida, se enjuagaron los sólidos con MeOH (15 ml). Se evaporó el filtrado hasta una pasta blanca espesa, luego se disolvió nuevamente en agua (50 ml). Esto fue lavado luego con Et₂O (50 ml) y entonces se acidificó la porción acuosa hasta pH=2 (~5 ml de solución 2M de HCl). Se realizó extracción a la fase acuosa con etil acetato (3x, 50 ml). Sobre sulfato de magnesio anhidro se secaron las fases orgánicas combinadas y se filtró, luego se evaporaron los solventes bajo presión reducida para dar ácido 2-metoxi-2-(3-metoxifenil)acético como un aceite amarillo (1.4 g, 97%) que fue usado sin purificación adicional.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 30°C) δ 3.18 (3H, s), 3.75 (3H, s), 4.74 (1H, s), 6.82 - 7.05 (3H, m), 7.29 (1H, m), 12.78 (1H, s).

Se usaron los siguientes ensayos para medir los efectos de los compuestos de la presente invención: a) ensayo de potencia de enzima GLS; b) ensayo de potencia de GLS celular; c) ensayo de proliferación celular GLS. En general, durante la descripción de los ensayos:

i. Se han usado las siguientes abreviaturas: CO₂ = dióxido de carbono; DMEM = medio Aguila modificado de Dulbecco; DMSO = dimetil sulfóxido; EDTA = ácido etilenediaminatetraacético; EGTA = ácido etilen glicol tetraacético; FCS = suero fetal de ternero; h = hora(s); NBS = superficie no enlazante; SDS = dodecil sulfato de sodio; TRIS = tris(hidroximetil)aminometano.

ii. Los valores IC₅₀ fueron calculados usando un modelo de ajuste inteligente en Genedata. El valor IC₅₀ fue la concentración del compuesto de prueba que inhibió 50% de actividad biológica.

Ensayo a): ensayo de potencia de la enzima GLS

Se usó un ensayo acoplado Glutamato Oxidasa/AmplexRed, para medir la habilidad de los compuestos para enlazarse a e inhibir la actividad de GLS1 *in vitro*. Se purificó proteína (amino ácidos 63-669) GLS marcada con 6His expresada en *E. coli* y se almacenó a -80°C en alícuotas. Se diluyó GLS1 a una concentración de trabajo 2 x y se incubó a temperatura ambiente para permitir que las formas tetraméricas/diméricas alcanzaran un estado estable. Las mediciones del ensayo fueron ejecutadas en amortiguador que comprende TRIS 50mM con pH 7.8, NaPO₄ 100mM con pH 7.8, Tween 20 al 0.001% v/v. Se diluyó proteína GLS1 purificada recombinante, en amortiguador de ensayo hasta 12nM y se preincubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se prepararon compuestos de prueba mediante disolución en DMSO 100% para dar el intervalo correcto de dosificación, para respuesta de concentración de 12 puntos y se dispensó un volumen apropiado (2.5-60nl) en placas de microensayo de 384 pozos (producto Greiner código 784900) usando un dispensador acústico Labcyte Echo 555. La concentración de DMSO fue mantenida en 2% mediante retrolenado con solución de DMSO. Se dispensaron entonces 3μL de proteína GLS1 diluida (12nM), dentro de cada pozo usando un dispensador automático BioRaptr (Beckman-Coulter) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron luego 3μl de glutamina 100mM diluida con amortiguador de ensayo y se incubó la reacción a temperatura ambiente por 60 minutos. Se detuvo luego la reacción mediante adición de 6-(2-bromoetil)-2,3-dimetil-quinazolin-4-ona 45μM, Amplex Red 75μM, 0.375 unidades/ml de peroxidasa de rábano picante, 0.12 unidades/ml de Glutamato Oxidasa en TRIS 100mM pH de 7.5. Después de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se leyeron las placas en un Perkin Elmer En Vision usando filtros ópticos de 535/590nm y los datos brutos fueron analizados usando Genedata para generar valores IC₅₀. Se usó también una versión de artefacto del ensayo, en la que la proteína GLS marcada con 6His y glutamina fueron reemplazadas con amortiguador del ensayo, para descartar efectos no específicos de los componentes del ensayo.

Ensayo b): ensayo en célula de potencia de GLS

Los compuestos fueron evaluados respecto a su potencial para inhibir la actividad de GLS celular, mediante el uso de un ensayo de PC3 acoplado, midiendo la disminución del glutamato celular. Se prepararon los compuestos de prueba

mediante dilución en DMSO 100%, para dar el intervalo correcto de dosificación para respuesta de concentración de 12 puntos y se dispensó un volumen apropiado (5-120 nl) en placas de microensayo de 384 pozos (producto Corning código 3712) usando un dispensador acústico Labcyte Echo 555. La concentración de DMSO fue mantenida en 0.3% mediante retrolleado con solución de DMSO. Se cultivaron células PC3 en DMEM libre de fenol, FCS dializado 10%, glutamina 2mM y siguiendo dispersión mediante tripsinización fueron sembradas a 5.6×10^3 células por pozo en 40µl de medio de crecimiento, directamente sobre las placas de ensayo de 384 pozos, que contenían el compuesto dispensado. Después de la incubación por 6 h a 37°C, se aspiró el medio de crecimiento de 5% de CO₂ y se lisaron las células en 15µl de amortiguador que contenía TRIS 10mM de pH 7.4, NaCl 100mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, NaF 1mM, Na₄P₂O₇ 20mM, Na₃VO₄ 2mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, SDS 0.1% y desoxicolato 0.5%. Se transfirieron entonces 4µl de lisado celular a una placa NBS de 384 pozos (producto Corning código 3575) y se añadieron 35µl de Amplex Red 27.5 µM, 0.1375 U/ml de peroxidasa de rábano picante, 0.044U/ml de glutamato oxidasa, TRIS 100mM de pH 7.5. Después de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se leyeron las placas en un Perkin Elmer EnVision usando filtros ópticos de 535/590nm y los datos brutos fueron analizados usando software de propietario para generar valores IC₅₀.

Ensayo c): ensayo de GLS en proliferación celular

Se midió la habilidad de los compuestos para inhibir el crecimiento celular, usando una placa de 384 pozos para ensayo de proliferación de células NCI-H1703. Las células NCI-H1703 fueron cultivadas en RPMI1640 libre de rojo de fenol, FCS 10% y glutamina 2mM y se inocularon a una densidad de 750 células por pozo en 40µl de medio de crecimiento en placas de ensayo de fondo claro de 384 pozos (producto Corning código 3712) y se incubaron por 24 h a 37°C, 5% de CO₂. Se prepararon los compuestos de prueba mediante dilución en DMSO 100% para dar el intervalo correcto de dosificación para respuesta de concentración de 12 puntos y un 33 40µl de medio de crecimiento en las placas de ensayo de fondo claro de 384 pozos (producto Corning código 3712) y se incubó por 24 h a 37°C, 5% de CO₂. Se prepararon los compuestos de prueba mediante dilución en DMSO 100% para dar el intervalo correcto de dosificación para respuesta de concentración de 12 puntos y se dispensó un volumen apropiado (5-120nl) directamente en las placas de ensayo que contenían las células inoculadas. Se mantuvo la concentración de DMSO en 0.3% mediante retrolleado con solución de DMSO. Se incubaron las placas por 5 días a 37°C, 5% de CO₂, se añadieron Sytox Green y Saponin a una concentración final de 2µM y 0.25% respectivamente, y se incubó por 6 h antes del análisis. Se leyeron las placas en un Acumen eX3 (TTP Labtech) usando excitación a 488nm y conjunto de filtro FITC (500-530nm) para emisión. Se calcularon los valores IC₅₀ mediante ajuste de la curva a la inhibición máxima del día de crecimiento cero, usando análisis de software GeneData.

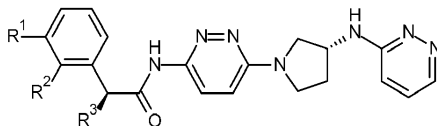
En la tabla 1 se muestra la potencia de los Ejemplos de la invención en los ensayos a) - c). Los resultados pueden ser un promedio de pruebas múltiples, y diferentes Ejemplos pueden haber sido probados en diferentes números de pruebas. Los resultados están redondeados a un cierto número de lugares decimales.

Tabla 1: Datos de potencia para los Ejemplos 1 - 4 en ensayos a) - c)

Ejemplo	Ensayo a) ensayo de potencia de la enzima GLS IC ₅₀ (µM)	Ensayo b) ensayo en célula de potencia de GLS IC ₅₀ (µM)	Ensayo c) ensayo de GLS en proliferación celular (µM)
1	0.0247	0.001	0.009
2	0.0957	0.001	0.011
3	0.0298	0.001	0.003
4	0.0309	0.007	0.043
5	0.0306	0.001	0.003
6	0.0252	0.001	0.012

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

5

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

R¹ es H, metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi;

R² es H, metoxi, trifluorometoxi o trifluorometil; y

R³ es H o metoxi.

10

2. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la reivindicación 1, en la que R¹ es metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi.

3. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la reivindicación 2, en la que R¹ es metoxi.

15

4. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que R² es H.

5. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que R² es metoxi.

6. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que R³ es metoxi.

20

7. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que R³ es H.

8. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la reivindicación 1, en la que:

R¹ es metoxi, difluorometoxi o trifluorometoxi;

25

R² es H; y

R³ es metoxi.

9. El compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la reivindicación 1, en la que:

R¹ es H;

30

R² es metoxi, trifluorometoxi o trifluorometil; y

R³ es H.

10. El compuesto de la Fórmula (I), de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto de la Fórmula (I) es seleccionado de:

(2S)-2-[3-(difluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il] acetamida;

35

(2S)-2-[3-(trifluorometoxi)fenil]-2-metoxi-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il] acetamida;

(2S)-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]acetamida;

2-(2-metoxifenil)-N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il] acetamida;

N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometil)fenil]acetamida; y

N-[6-[(3R)-3-(piridazin-3-ilamino)pirrolidin-1-il]piridazin-3-il]-2-[2-(trifluorometoxi)fenil] acetamida.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y por lo menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 12. Un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en terapia.
13. Un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en el tratamiento de cáncer.
14. Compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el cáncer es seleccionado de entre cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer hepatocelular.