

COMPUESTO AGONISTA DE RECEPTOR THRB Y MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DEL MISMO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente China No. 201811527414.4, presentada el 13 de diciembre de 2018, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

CAMPO TÉCNICO

10 [002] La presente invención se refiere al campo de síntesis farmacéuticas y particularmente a un compuesto que puede servir como un agonista novedoso de receptores THRB y un método de preparación y uso de los mismos.

ANTECEDENTES

15 [003] La hormona tiroidea (TH) se sintetiza en la glándula tiroides en respuesta a la hormona estimulante de tiroides (TSH) secretada por la pituitaria. La tiroxina juega un papel bastante importante en la regulación del crecimiento corporal, desarrollo, metabolismo y equilibrio corporal. Las hormonas tiroideas incluyen principalmente dos tipos: 3,5,3'-triiodo-L-tiroxina (T3) y tiroxina (T4). Los cuerpos humanos secretan principalmente T4. En los órganos periféricos, T4 se transforma por desyodinasas en T3 que tiene mayor actividad. T3 y T4 producidas por la glándula tiroides están bajo control de retroalimentación negativa. La tirotropina (TSH) es responsable de la función tiroidea normal y secreción de hormona tiroidea. La tirotropina se sintetiza en la glándula pituitaria anterior y su secreción se controla por la hormona de liberación de tiroides (TRH) sintetizada en el hipotálamo.

20

[004] Las hormonas tiroideas funcionan al unirse a los receptores de hormona tiroidea (THR). El receptor de hormona tiroidea pertenece a una familia de receptores nucleares y regula las expresiones de gen diana. Los receptores de hormona tiroidea incluyen dos subtipos diferentes, es decir, THR α y THR β . THR α se distribuye principalmente en tejidos

cardíacos y juega un papel importante al regular la función cardíaca. El subtipo de $THR\beta$ se expresa principalmente en el hígado y la pituitaria, y regula el metabolismo de colesterol y secreción de tiotropina.

5 **[005]** A niveles normales, las hormonas tiroideas TH mantienen el peso corporal, tasa metabólica, temperatura corporal y estado de ánimo y son responsables de regular el colesterol sérico. Se han realizado intentos para usar hormonas tiroideas para regular el colesterol sérico. Sin embargo, dados los posibles efectos secundarios en el corazón de tomar hormona tiroidea natural (por ejemplo, taquicardia y arritmia, insuficiencia cardíaca y función de eje tiroideo, metabolismo muscular y osteoporosis), las hormonas tiroideas no son adecuadas para tratar colesterol alto y obesidad. Los resultados de investigación con
10 respecto al estudio de animales con inactivación selectiva del gen THR, y los resultados de investigación de algunos ligandos THR selectivos muestran que los efectos secundarios en el corazón provocados por estas hormonas tiroideas se pueden atribuir a $THR\alpha$.

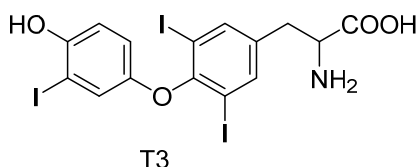
[006] La ruta del receptor de hormona tiroidea regula el metabolismo de lípidos, incluido el colesterol, triglicéridos y lipoproteína. Se ha demostrado clínicamente que disminuir el
15 colesterol de baja densidad puede reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

[007] La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) también es un tipo de enfermedad de trastorno metabólico provocada por acumulación excesiva de triglicéridos en el hígado, que puede provocar además daño e inflamación de células hepáticas, que conduce a esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Los pacientes con NASH usualmente
20 tienen diabetes tipo 2, colesterol alto, hiperlipemia y obesidad junto con NASH. Además, son más propensos a desarrollar hepatocirrosis, insuficiencia hepática y finalmente, cáncer de hígado. En el campo, actualmente los fármacos que tratan de manera efectiva NASH son limitados. Dada la función de la hormona tiroidea de regular el metabolismo de lípidos, la ruta de receptor tiroideo se convierte en una diana potencial para el tratamiento de NASH y NAFLD. Se ha probado en cuerpos de animales que los análogos de hormona tiroidea

pueden reducir significativamente los niveles de grasa en hígados de animales.

[008] Los agonistas selectivos de $\text{THR}\beta$ se pueden usar para evitar efectos secundarios en el corazón que resultan de agonistas de receptor THR convencionales, y selectivamente solo para activar $\text{THR}\beta$, mejorando de este modo el metabolismo de lípidos celulares, y lograr la función de disminuir el colesterol y grasa sanguínea. Sin embargo, los agonistas selectivos de $\text{THR}\beta$ también pueden inhibir el eje tiroideo, conduciendo a depresión, fatiga, osteoporosis y otros efectos secundarios. Por lo tanto, se desea desarrollar un agonista selectivo de $\text{THR}\beta$ para activar $\text{THR}\beta$, pero también para reducir la inhibición del eje tiroideo, para evitar los efectos secundarios que acompañan la inhibición de eje tiroideo.

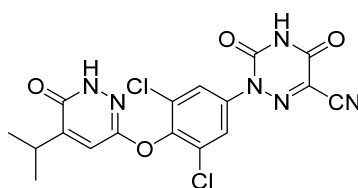
[009] Las patentes tal como WO03094845, WO2007009913, WO2010122980 y WO2011038207 revelan algunos agonistas de receptor THR. Las estructuras de estos agonistas están casi todas diseñadas y desarrolladas con base en el ligando natural T3 del receptor THR. Con base en estos antecedentes, todavía se desea desarrollar agonistas selectivos de receptor $\text{THR}\beta$ que no solo tienen los efectos terapéuticos beneficiosos de las hormonas tiroideas, sino que también evitan efectos secundarios que afectan el corazón.



[0010] La modificación estructural se lleva a cabo en la presente invención también con base en el ligando natural T3 del receptor THR. Los presentes inventores encontraron inesperadamente que, la mayoría de los compuestos modificados mantienen buena actividad agonista hacia el receptor $\text{THR}\beta$ y algunos compuestos también tienen selectividad mejorada hacia $\text{THR}\alpha$ en comparación con el compuesto comparativo 53 en los documentos de referencia ("Discovery of 2-[3,5-Dichloro-4-(5-isopropyl-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yloxy)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro[1,2,4]triazine-6-carbonitrile (MGL-3196), a Highly Selective Thyroid Hormone Receptor β Agonist in Clinical Trials for

20

the Treatment of Dyslipidemia,” Martha et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 3912-3923). Al mismo tiempo, algunos compuestos de la presente invención también muestran propiedades farmacocinéticas muy deseables. Las propiedades farmacocinéticas de algunos compuestos preferidos son significativamente mejores que las de aquel compuesto comparativo, mejorando de este modo las propiedades del fármaco terminado.

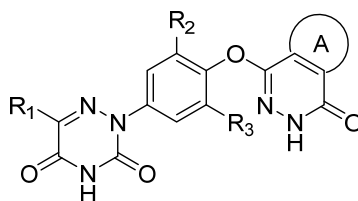


Compuesto comparativo 53

BREVE DESCRIPCIÓN

[0011] A fin de resolver el problema técnico anterior, la presente invención emplea las siguientes soluciones técnicas:

[0012] De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un compuesto representado por la siguiente fórmula (I) y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



(I)

en donde,

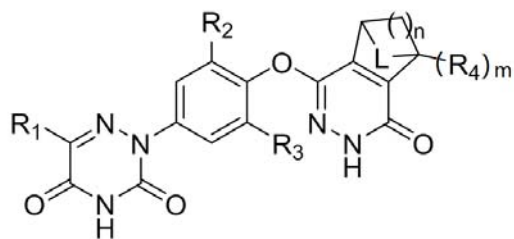
R₁ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, ciano, C₁₋₆ alquilo sustituido o no sustituido, o C₃₋₆ cicloalquilo sustituido o no sustituido, el sustituyente que se selecciona del grupo que consiste de átomos de halógeno, hidroxilo y C₁₋₆ alcoxi;

R₂ y R₃ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de átomos de halógeno o C₁₋₆ alquilo sustituido o no sustituido, el sustituyente que se selecciona del grupo que consiste de átomos de halógeno, hidroxilo y C₁₋₆ alcoxi;

el anillo A es un C₅₋₁₀ anillo alifático saturado o insaturado sustituido o no sustituido, o un C₅₋₁₀ anillo aromático sustituido o no sustituido, el sustituyente que es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste de hidrógeno, átomos de halógeno, hidroxilo, -OCF₃, -NH₂, -NHC₁₋₄ alquilo, -N(C₁₋₄ alquilo)₂, -CONH₂, -CONHC₁₋₄ alquilo, -CON(C₁₋₄ alquilo)₂, -NHCOC₁₋₄ alquilo, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi o C₃₋₆ cicloalquilo, y cuando se contienen dos sustituyentes, los dos sustituyentes pueden formar una estructura de anillo junto con el carbono conectado a los mismos; y

los átomos de halógeno se seleccionan del grupo que consiste de F, Cl o Br.

[0013] El compuesto de acuerdo con la presente invención tiene una estructura como se muestra en la siguiente fórmula (II):



(II)

en donde,

R₁ a R₃ se definen como se describe en la fórmula anterior (I);

L no está presente o se selecciona del grupo que consiste de -CH₂- y -CH₂CH₂-;

R₄ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, átomos de halógeno, hidroxilo, -OCF₃, -NH₂, -NHC₁₋₄ alquilo, -N(C₁₋₄ alquilo)₂, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi o C₃₋₆ cicloalquilo;

n es un número entero del intervalo 1 a 4;

m es un número entero del intervalo 1 a 4; y

cuando L no está presente, el anillo puede tener dos o más sustituyentes R₄ en el mismo; y

los átomos de halógeno se seleccionan del grupo que consiste de F, Cl o Br.

Preferentemente, en la estructura como se muestra en la fórmula (II), R_4 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, átomos de halógeno, hidroxilo, C_{1-3} alquilo, C_{1-3} alcoxi o C_{3-6} cicloalquilo;

L no está presente o se selecciona del grupo que consiste de $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$;

n es 1, 2 o 3; y

m es 1 o 2.

Preferentemente, además, en la estructura como se muestra en la fórmula (II), R_4 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno o C_{1-3} alquilo;

L es $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$;

n es 1, 2 o 3; y

m es 1 o 2.

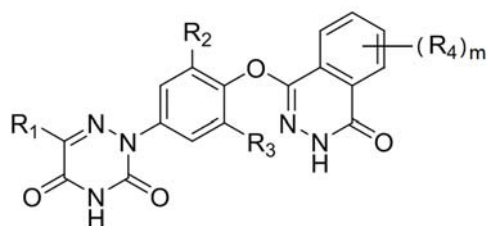
Preferentemente, además, en la estructura como se muestra en la fórmula (II), R_4 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno o C_{1-3} alquilo;

L no está presente;

n es 1, 2 o 3; y

m es 1 o 2.

[0014] El compuesto de acuerdo con la presente invención tiene una estructura como se muestra en la siguiente fórmula (III):



en donde,

R_1 a R_3 se definen como se describe en la fórmula anterior (I);

R_4 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, átomos de halógeno, hidroxilo, $-OCF_3$, $-NH_2$, $-NHC_{1-4}$ alquilo, $-N(C_{1-4}$ alquilo) $_2$, $-CONH_2$, $-CONHC_{1-4}$ alquilo, $-CON(C_{1-4}$

alquilo)₂, -NHCOC₁₋₄ alquilo, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi o C₃₋₆ cicloalquilo;

m es un número entero del intervalo 1 a 4; y

los átomos de halógeno se seleccionan del grupo que consiste de F, Cl o Br.

5 **[0015]** Preferentemente, en la estructura como se muestra en la fórmula (III), R₄ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, átomos de halógeno, hidroxi, -OCF₃, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi o C₃₋₆ cicloalquilo; y m es un número entero del intervalo 1 a 3.

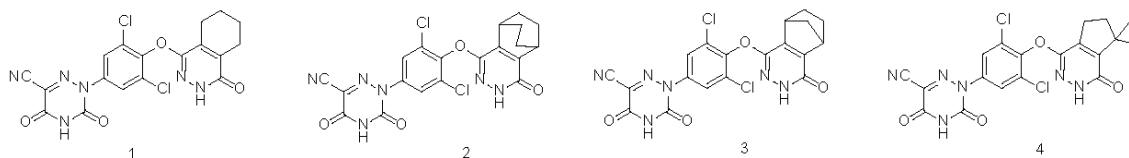
[0016] Preferentemente, en la estructura como se muestra en la fórmula (III), R₄ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, átomos de halógeno o C₁₋₃ alquilo; y m es 1 o 2.

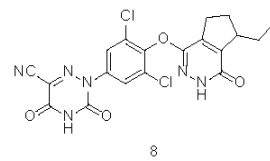
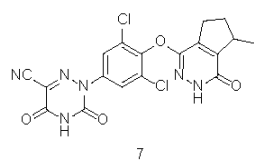
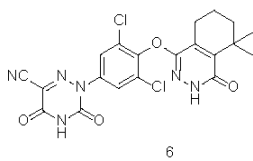
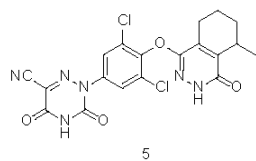
10 **[0017]** Preferentemente, en el compuesto anterior que tiene la estructura de la fórmula (I), (II) o (III) de acuerdo con la presente invención, R₁ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, ciano, C₁₋₆ alquilo sustituido o no sustituido; además preferentemente, R₁ se selecciona del grupo que consiste de ciano o C₁₋₃ alquilo; y aún más preferentemente, R₁ es ciano.

15 **[0018]** Preferentemente, en el compuesto anterior que tiene la estructura de la fórmula (I), (II) o (III) de acuerdo con la presente invención, R₂ y R₃ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de F, Cl o Br, y además preferentemente, tanto R₂ como R₃ son Cl.

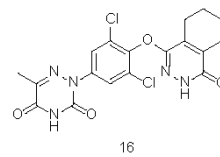
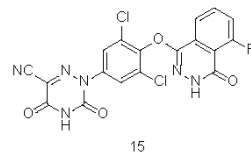
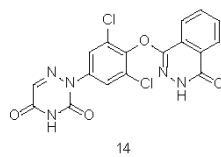
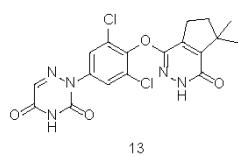
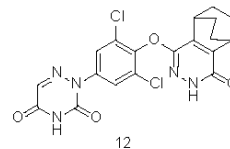
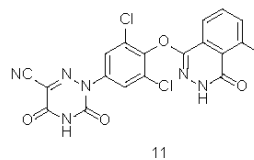
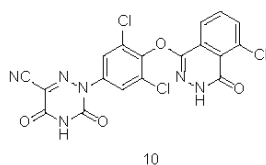
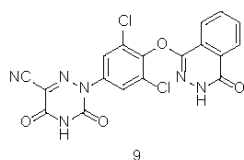
[0019] Preferentemente, el compuesto y sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la invención son uno de los siguientes compuestos:

20

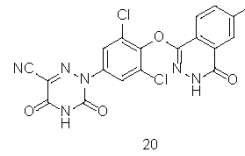
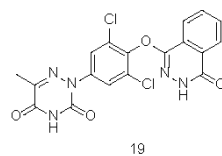
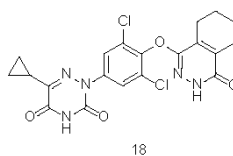
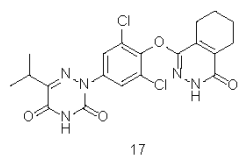




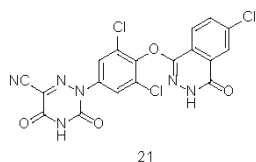
5



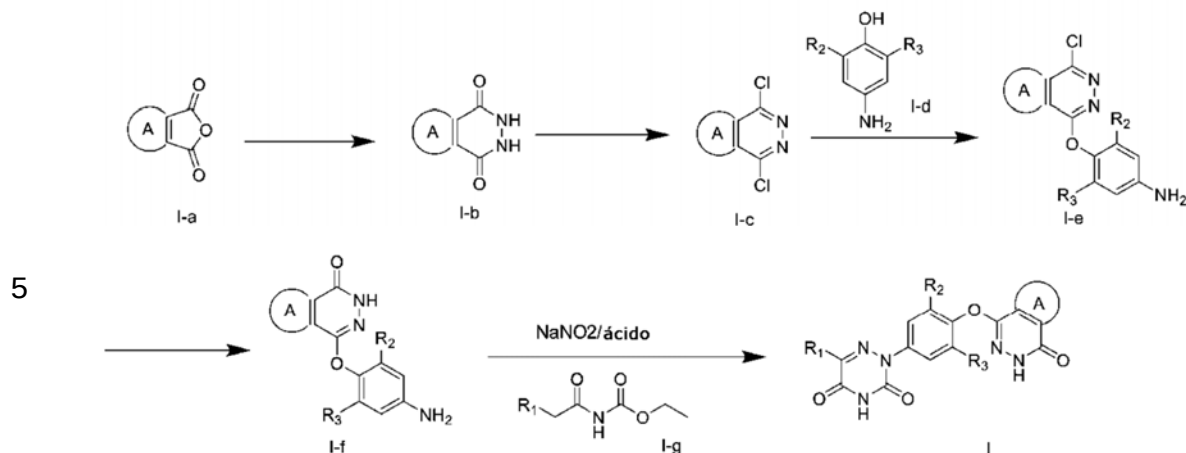
10



15



[0020] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para preparar el compuesto, el método de preparación comprende los siguientes pasos:



1) hacer reaccionar el compuesto I-a de anhídrido interno con clorhidrato de hidrazina, para obtener un compuesto de la fórmula general I-b;

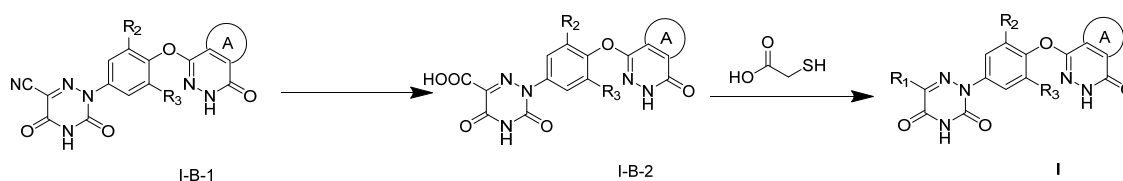
2) calentar el compuesto obtenido de la fórmula general I-b en oxiclورو de fósforo, para formar un compuesto de la fórmula general I-c;

3) someter el compuesto obtenido de la fórmula general I-c y el compuesto I-d a reacción de acoplamiento a alta temperatura, para obtener un compuesto de la fórmula general I-e, donde el catalizador en esta condición es preferentemente yoduro cuproso;

4) hacer reaccionar el compuesto obtenido de la fórmula general I-e a alta temperatura ácida o alcalina, para obtener un compuesto de la fórmula general I-f; y

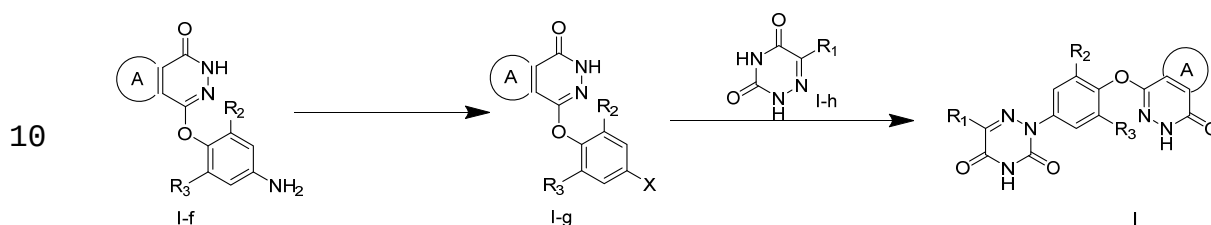
5) hacer reaccionar el compuesto obtenido de la fórmula general I-f con nitrito de sodio en una solución ácida acuosa, seguido por la adición de un compuesto I-g para reacción adicional y cierre de anillo a alta temperatura, para obtener un compuesto de la fórmula general I, donde el ácido es preferentemente ácido clorhídrico bajo esta condición.

[0021] El compuesto de la fórmula general I de acuerdo con la presente invención también se puede preparar como sigue:



[0022] El compuesto de la fórmula general I-B-1 se somete a hidrólisis de alta temperatura en una solución ácida acuosa, para obtener un compuesto de la fórmula general I-B-2, donde el ácido es preferentemente ácido clorhídrico bajo esta condición; y el compuesto obtenido de la fórmula general I-B-2 se hace reaccionar en la presencia de ácido mercaptoacético a una temperatura alta para eliminar carboxi, para obtener el compuesto de la fórmula general I.

[0023] El compuesto de la fórmula general I de acuerdo con la presente invención también se puede preparar a través del siguiente método:



[0024] El compuesto de la fórmula general I-f se hace reaccionar con nitrito de sodio bajo una condición ácida, para formar un compuesto de sal de diazonio, seguido por la adición de un anión de haluro, para obtener un compuesto de la fórmula general I-g; y bajo la catálisis de un metal de transición, el compuesto obtenido de la fórmula general I-g se acopla con el compuesto intermedio I-h, para obtener el compuesto de la fórmula general I.

[0025] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona el uso del compuesto en la preparación de un fármaco terapéutico para una enfermedad relacionada con el metabolismo.

[0026] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de acuerdo con la presente invención y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0027] Preferentemente, la enfermedad relacionada con el metabolismo se selecciona del

grupo que consiste de obesidad, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), esteatosis de hígado, aterosclerosis, hipotiroidismo y cáncer de tiroides; y preferentemente, la enfermedad relacionada con el metabolismo se selecciona del grupo que consiste de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), hipotiroidismo y cáncer de tiroides.

[0028] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad relacionada con el metabolismo, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica que comprende el compuesto y sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo.

[0029] Preferentemente, de acuerdo con el método para tratar la enfermedad relacionada con el metabolismo, la enfermedad relacionada con el metabolismo se selecciona del grupo que consiste de: obesidad, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), esteatosis de hígado, aterosclerosis, hipotiroidismo y cáncer de tiroides; y preferentemente, la enfermedad relacionada con el metabolismo se selecciona del grupo que consiste de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), hipotiroidismo y cáncer de tiroides.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] La presente invención se describe más adelante en detalle. Antes de la descripción, se debe entender que, los términos usados en la especificación y las reivindicaciones anexas no se deben interpretar que se limitan al significado general y significado de diccionario, sino que se deben interpretar de acuerdo con el correspondiente significado y conceptos en los aspectos técnicos de la presente invención con base en el principio de que se permite al inventor definir adecuadamente los términos para la mejor interpretación. Por lo tanto, la descripción propuesta aquí es solo un ejemplo preferido para el propósito de ilustración y no se propone que limite el alcance de la invención. Por lo tanto, se debe

entender que se pueden obtener otros equivalentes o mejoras de la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención.

[0031] De acuerdo con la presente invención, todos los términos citados en la presente tienen el mismo significado como aquellos expertos en la técnica que entienden la invención, a menos que se especifique de otro modo.

[0032] Como se usa en la presente, el término “sal” se refiere a un compuesto que contiene cationes y aniones, que se puede formar por protonación de un sitio que puede aceptar protones y/o abstracción de protones de un sitio que puede suministrar protones. Cabe señalar que la protonación del sitio que puede aceptar protones conduce a la formación de una sustancia catiónica, y la carga de la misma se equilibra por la presencia de aniones fisiológicos, en tanto que la abstracción de protones del sitio que puede suministrar protones conduce a la formación de una sustancia aniónica, y la carga de la misma se equilibra por la presencia de cationes fisiológicos.

[0033] El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a que la sal es farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácido inorgánico, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; o formadas con ácido orgánico, por ejemplo, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietano sulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-paratoluenosulfónico, ácido canfónico, ácido dodecilsulfónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido salicílico y ácido cis-mucónico; o (2) sales de adición alcalinas, formadas con cualquier base de conjugado de los ácidos inorgánicos anteriores, donde la base de conjugado comprende un componente catiónico seleccionado del grupo

que consiste de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , y $\text{NH}_x\text{R}_{4-x}^+$, donde $\text{NH}_x\text{R}_{4-x}^+$ (R es C_{1-4} alquilo y el subíndice es un número entero seleccionado del grupo que consiste de 0, 1, 2, 3 o 4) representa el catión en la sal de amonio cuaternario. Se debe entender que, todas las sales farmacéuticamente aceptables implicadas incluyen la forma de adición de solvente (solvato) o forma cristalina (sustancia polimórfica) como se define en la presente para la misma sal de adición de ácido.

[0034] El término " C_{1-M} alquilo" se refiere a alquilo que comprende 1 a M átomos de carbono, por ejemplo, donde M es un número entero que tiene el siguiente valor numérico: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. Por ejemplo, el término " C_{1-6} alquilo" se refiere a alquilo que contiene 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a alquilo inferior, incluido metilo, etilo, propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo o amilo, i-amilo, neopentilo, hexilo, heptilo y octilo.

[0035] El término "grupo aromático" se refiere a un sistema aromático, que puede ser un anillo monocíclico, o un anillo poliaromático originalmente fusionado o unido conjuntamente de modo que al menos una parte de los anillos fusionados o unidos forma un sistema aromático conjugado. Los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a: fenilo, naftilo y tetralilo. El arilo puede estar opcionalmente sustituido por, por ejemplo, 1 a 4 grupos arilo o anillos heterocíclicos sustituidos por un grupo seleccionado del grupo que consiste de: halógeno, -CN, -OH, -NO₂, amino, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, alcoxi sustituido, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, alquilamino o ariltio.

[0036] El término "sustituto" se refiere a que el grupo de referencia se puede sustituir por uno o una pluralidad de grupos adicionales, donde los grupos adicionales se seleccionan por separado e independientemente del grupo que consiste de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidrocarburo heteroalíclico, hidroxilo, alcoxi, alquiltiol, ariltio, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, nitro, haloalquilo,

fluoroalquilo y amino, incluidos grupos amino monosustituídos y disustituídos y derivados protegidos por los mismos.

5 **[0037]** El compuesto representado por la fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo proporcionada por la presente invención, y las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto pueden estar en diferentes formas, tal como tabletas, cápsulas, polvos, jarabes, soluciones, suspensiones y aerosoles, etc., y pueden existir en un portador o diluyente sólido o líquido adecuado y en un desinfectante adecuado para inyección o infusión.

10 **[0038]** Se pueden preparar diferentes formas de dosis de la composición farmacéutica de la presente invención de acuerdo con métodos de preparación convencionales en el campo de farmacia. Por ejemplo, la dosis unitaria de la fórmula de preparación contiene 0.05 a 200 mg del compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y preferentemente, la dosis unitaria de la fórmula de preparación contiene 0.1 a 100 mg del compuesto de la fórmula (I).

15 **[0039]** El compuesto representado por la fórmula general (I) o composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención se puede usar clínicamente en mamíferos, incluidos humanos y animales, a través de rutas de dosis tal como rutas de tracto oral, nasal, transdérmico, transpulmonar o gastrointestinal. La administración oral es la más preferida. La dosis diaria más preferida es 0.01 a 200 mg/kg de peso por administración individual, o 0.01 a 100 mg/kg de peso por administración separada. Independientemente del método de administración, la mejor dosis para un individuo se debe
20 decidir con base en el tratamiento específico. Usualmente, la administración comienza con una dosis pequeña e incrementa gradualmente hasta que se encuentra la dosis más adecuada.

[0040] En la presente invención, el término “cantidad efectiva” puede referirse a la cantidad efectiva para la dosis y período de tiempo requeridos para lograr el efecto esperado. Esta

dosis efectiva puede variar de manera diferente debido a ciertos factores, tal como el tipo de enfermedad, síntomas de la enfermedad en el momento del tratamiento; la estructura del órgano diana específico que se va a administrar; la altura y peso individual del paciente, o la severidad de la enfermedad o síntoma. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar, por experiencia, la cantidad efectiva de un compuesto específico sin llevar a cabo experimentos innecesarios.

[0041] Una fórmula habitual se prepara al mezclar el compuesto representado por la fórmula general (I) de la invención y un portador, un diluyente o un excipiente. Los portadores, diluyentes o excipientes adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, incluidas sustancias tal como carbohidratos, ceras, polímeros solubles en agua y/o expandibles, sustancias hidrófilas o hidrófobas, gelatina, aceite, solventes y agua.

[0042] El portador, diluyente o excipiente específico que se va a usar se debe decidir de acuerdo con el uso y propósito del compuesto de la presente invención. En general, el solvente se selecciona con base en los solventes que se pueden dosificar de manera segura y de manera efectiva a mamíferos de acuerdo con aquellos expertos en la técnica. En general, los solventes seguros son solventes acuosos no tóxicos tal como agua y otros solventes no tóxicos que son solubles en o miscibles con agua. Los solventes acuosos adecuados incluyen uno o una pluralidad de agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicol (tal como PEG400 y PEG300) y similares. La fórmula también pueden incluir uno o una pluralidad de amortiguadores, estabilizadores, agentes tensioactivos, agentes humectantes, lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservadores, antioxidantes, agentes de examen de luz, auxiliares de flujo, auxiliares de procesamiento, colorantes, edulcorantes, fragancias, agentes saborizantes u otros aditivos conocidos, para permitir que el fármaco se fabrique o use en una forma aceptable.

[0043] Cuando el compuesto de la fórmula (I) de la presente invención se usa en combinación con al menos otro fármaco, los dos o más fármacos se pueden usar por

separado o en combinación, preferentemente en la forma de una composición farmacéutica. El compuesto de la fórmula (I) o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede dosificar al sujeto por separado o conjuntamente, en cualquier forma de dosis oral, intravenosa, rectal, vaginal, transdérmica, otras formas de dosis tópica o sistémica conocidas.

[0044] Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener uno o una pluralidad de amortiguadores, estabilizadores, agentes tensioactivos, agentes humectantes, lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservadores, antioxidantes, agentes de detección de luz, auxiliares de flujo, auxiliares de procesamiento, colorantes, edulcorantes, fragancias, agentes saborizantes u otros aditivos conocidos, para permitir que las composiciones farmacéuticas se fabriquen o usen en una forma aceptable.

[0045] Se prefiere la ruta de dosis oral para el fármaco de la presente invención. La forma de dosis sólida para dosis oral puede incluir cápsulas, tabletas, polvos o formulaciones de partículas. En la forma de dosis sólida, el compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se mezcla con al menos un excipiente, diluyente o portador inerte. Los excipientes, diluyentes o portadores adecuados incluyen sustancias tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, o almidón, lactosa, sacarosa, manitol, ácido silícico y similares; adhesivos tal como carboximetilcelulosa, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma Arabia; agentes humectantes tal como glicerol; agentes desintegrantes tal como agar, carbonato de calcio, almidón de papa o yuca, ácido algínico, silicato de complejo específico y carbonato de sodio; bloqueadores de soluciones tal como parafina; promotores de absorción tal como compuestos de amonio cuaternario; adsorbentes tal como caolín y bentonita; y lubricantes tal como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol sólido y laurilsulfato de sodio. En el caso de cápsulas y tabletas, la forma de dosis también puede incluir amortiguadores. Los tipos similares de composiciones sólidas también se pueden usar como agentes de relleno en cápsulas de

gelatina rellenas duras y blandas, que usan lactosa y polietilenglicol de alto peso molecular como excipientes.

5 **[0046]** Las formas de dosis líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones y jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del compuesto o la composición farmacéutica del mismo de acuerdo con la presente invención, la forma de dosis líquida puede contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tal como agua u otros solventes; solubilizantes y emulsionantes tal como etanol, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butanodiol, dimetilformamida; aceites (por ejemplo, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y
10 aceite de sésamo); glicerol; alcohol tetrahidrofurfurílico; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y sorbitán; o mezclas de varias de estas sustancias, etc.

[0047] Además de estos diluyentes inertes, la composición también puede incluir un excipiente, tal como uno o una pluralidad de agentes humectantes, emulsionantes, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes saborizantes y fragancias.

15 **[0048]** En términos de la suspensión, además del compuesto representado por la fórmula general (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica que comprende el mismo de acuerdo con la presente invención, la suspensión puede contener además portadores tal como agentes de suspensión, por ejemplo, isoestearol etoxilado, sorbitol de polioxietileno, éster de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, goma tragacanto y agar, o mezclas de varias de estas sustancias, etc.

20 **[0049]** El compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica que comprende el mismo de acuerdo con la presente invención se puede dosificar usando otras formas de dosis tópicas, que incluyen ungüentos, polvos, aerosoles e inhalantes. Este fármaco se puede mezclar bajo condiciones estériles con excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente

aceptables y cualquier conservador, amortiguador o propulsor requerido. También se propone que las fórmulas oftálmicas, ungüentos oftálmicos, polvos y soluciones se incluyan en el alcance de la presente invención.

5 **[0050]** Además, la presente descripción comprende además kits (por ejemplo, envases farmacéuticos). El kit proporcionado puede comprender la composición farmacéutica o el compuesto descrito en la presente y recipientes (por ejemplo, botellas de fármacos, ampollas, botellas, jeringas y/o subenvases u otros recipientes adecuados). En algunas modalidades, el kit proporcionado puede incluir opcionalmente además un segundo recipiente que comprende un excipiente farmacéutico para diluir o suspender la composición farmacéutica o el compuesto descrito en la presente. En algunas modalidades, 10 la composición farmacéutica o el compuesto descrito en la presente proporcionado en el primer y segundo recipientes se combinan para formar una forma de dosis unitaria.

[0051] En algunas modalidades, el kit descrito en la presente incluye además instrucciones de uso del compuesto o la composición farmacéutica comprendida en el kit. El kit descrito en la presente también puede incluir información requerida por agencias reguladoras tal 15 como la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA). En algunas modalidades, la información incluida en el kit es información de fórmula. En algunas modalidades, el kit y las instrucciones se proporcionan para el tratamiento de una enfermedad proliferativa en sujetos en necesidad del mismo y/o prevención de una enfermedad proliferativa de sujetos en necesidad del mismo. El kit descrito en la presente puede comprender una o una pluralidad de preparaciones farmacéuticas adicionales como 20 composiciones separadas.

[0052] La presente invención se describirá adicionalmente más adelante en detalle en combinación con modalidades particulares, pero la presente invención no se limita a las siguientes modalidades que sirven para el propósito de explicar mejor modalidades específicas de la presente invención y no se deben interpretar como que limitan el alcance

de la invención de ninguna manera. Las condiciones no señaladas en las modalidades son condiciones convencionales. A menos que se señale particularmente, los reactivos y aparatos usados en las siguientes modalidades son todos productos comercialmente disponibles.

5 **[0053]** Las estructuras de los compuestos en las siguientes modalidades se determinan por resonancia magnética nuclear (RMN) o/y espectrometría de masas (MS). El desplazamiento de RMN (δ) se da en la unidad de 10^{-6} (ppm). Para la determinación por RMN, se usa un instrumento magnético nuclear Bruker AVANCE-400. Los solventes son dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y metanol deuterado (CD_3OD) y la norma interna es tetrametilsilano (TMS).

10 **[0054]** Para determinación por MS, se usa un espectrómetro de masas FINNIGAN LCQAd (ESI) (fabricante: Thermo, modelo: Finnigan LCQ advance max).

[0055] Las placas de gel de sílice Yantai Huanghai HSGF254 o Qingdao GF254 se usan como las placas de gel de sílice para la cromatografía de capa fina. La especificación de la placa de gel de sílice para la cromatografía de capa fina (TLC) es 0.15 mm a 0.2 mm, y la
15 especificación para eso en la cromatografía de capa fina para separación y purificación de productos es 0.4 mm a 0.5 mm.

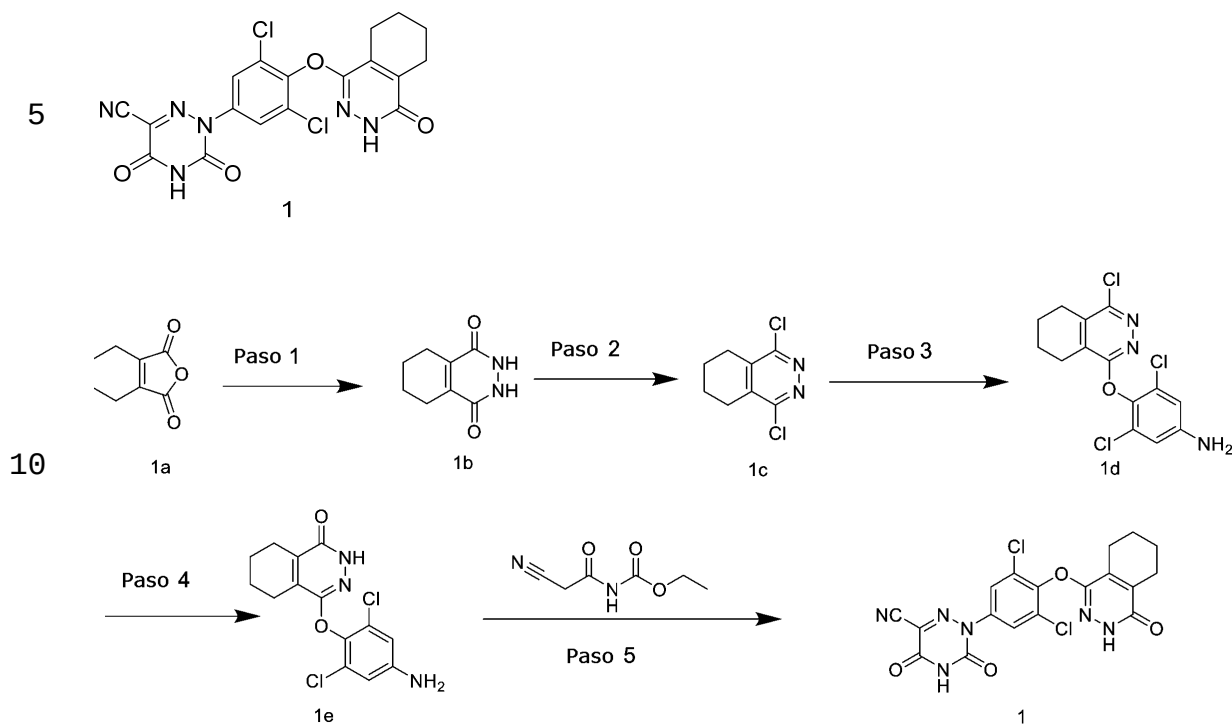
[0056] La cromatografía en columna en general usa gel de sílice Yantai Huanghai, gel de sílice de malla 200-300 como el portador.

[0057] Cuando no existe descripción especial en las modalidades, la temperatura de reacción es temperatura ambiente, es decir, 20°C a 30°C.

20 **[0058]** La cromatografía de capa fina (TLC) se emplea para detectar el proceso de reacción en las modalidades. El sistema revelador usado y el sistema de eluyente de cromatografía en columna empleado para purificar el compuesto incluyen: A: un sistema de diclorometano y metanol; B: un sistema de acetato de etilo y n-hexano; C: un sistema de éter de petróleo y acetato de etilo; D: un sistema de acetona y éter de petróleo, donde la relación en volumen

de los solventes se ajusta de acuerdo con diferentes polaridades de los compuestos.

[0059] Modalidad 1: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo



[0060] Paso 1: Preparación de 2,3,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1,4-diona (compuesto 1b)

15 **[0061]** Se adicionaron sucesivamente acetato de sodio (3.69 g, 45 mmol) y clorhidrato de hidrazina (3.08 g, 45 mmol) en una solución de un compuesto anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico 1a (4.56 g, 30 mmol) en ácido acético (50 ml) y agua (100 ml). Después de la adición, la mezcla se calentó a una temperatura de 100°C y se agitó durante 3 h. La reacción se detuvo y se enfrió naturalmente a temperatura ambiente. Un sólido se precipitó

20 y filtró para obtener un compuesto 1b (4.2 g), y el producto se usó directamente en la siguiente reacción.

[0062] RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 11.26 (s, 2H), 2.36 (s, 4H), 1.65 (s, 4H).

[0063] Paso 2: Preparación de 1,4-dicloro-5,6,7,8-tetrahidroftalazina (compuesto 1c)

[0064] El compuesto 1b (1 g, 6.02 mmol) se disolvió en oxocloruro de fósforo (8 ml). El aire

en el sistema se reemplazó 3 veces con gas nitrógeno. El sistema se calentó a una temperatura de 110°C y se agitó durante 3 h. La reacción se detuvo y entonces se enfrió naturalmente. La solución de reacción se goteó lentamente a agua con hielo. La mezcla se ajustó a pH 10 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1N y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y la fase orgánica se lavó con salmuera saturada y se concentró para secar, para obtener un compuesto 1c (1.1 g). El producto se usó directamente en la siguiente reacción.

[0065] Paso 3: Preparación de 3,5-dicloro-4-((4-cloro-5,6,7,8-tetrahidroftalazin-1-il)oxi)anilina (compuesto 1d)

[0066] Se adicionó dimetilsulfóxido (8 ml) en la mezcla del compuesto 1c (1.0 g, 5.0 mmol), 2,6-dicloro-4-aminofenol (0.93 g, 6 mmol), carbonato de potasio (2.76 g, 20 mmol) y CuI (0.57 g, 3 mmol). El aire en el sistema se reemplazó 3 veces con gas nitrógeno. El sistema se calentó a una temperatura de 100°C y se agitó durante 3 h. Después de que la reacción se detuvo, se enfrió. El sólido en la solución de reacción se filtró primero y el residuo de filtro se lavó repetidamente con acetato de etilo. Se adicionaron 80 ml de agua en el filtrado y entonces la fase acuosa se extrajo con reacción de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera saturada. Un compuesto 1d (450 mg) se obtuvo por cromatografía en columna después de filtración y concentración de solvente.

[0067] Paso 4: Preparación de 4-(4-amino-2,6-diclorofenoxi)-5,6,7,8-tetrahidroftalazin-1(2H)-ona (compuesto 1e)

[0068] El compuesto 1d (100 mg, 0.3 mmol) se disolvió en ácido acético (4 ml) y se adicionó acetato de sodio (200 mg, 2.5 mmol) en el mismo. La mezcla se calentó a una temperatura de 120°C y se agitó durante 12 h. Después de que la reacción se detuvo, el solvente se removió bajo presión reducida. Se adicionaron 10 ml de agua en el mismo y entonces se adicionó una solución acuosa de hidróxido de sodio 1N para ajustar el pH a 8. Entonces, la extracción se llevó a cabo con acetato de etilo (10 ml × 3) y las fases orgánicas se

combinaron. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y salmuera saturada respectivamente, y se concentró bajo presión reducida para obtener un sólido gris. Se adicionaron 10 ml de metanol y 10 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 1N en el sólido obtenido y la mezcla se calentó a una temperatura de 120°C y se agitó durante 12 h. Después de que la reacción se detuvo, el metanol se concentró bajo presión reducida. La fase acuosa restante se extrajo 3 veces con acetato de etilo repetidamente y las fases orgánicas se combinaron. Después de que el solvente se concentró bajo presión reducida, el compuesto 1e (80 mg) se obtuvo por separación y purificación a través de cromatografía de capa fina.

[0069] Paso 5: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 1)

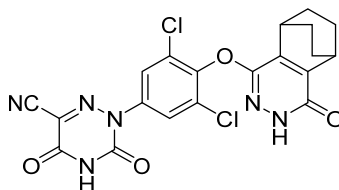
[0070] Se disolvió nitrito de sodio (16 mg) en agua (0.5 mL). Bajo condiciones de baño de hielo, esta solución se adicionó lentamente gota a gota en una mezcla de un compuesto 1e (60 mg, 0.185 mmol), agua (2.5 mL) y una solución de ácido clorhídrico acuoso saturado (1.25 mL), y se agitó durante 0.5 h con las condiciones de baño de hielo mantenidas, hasta que la solución se volvió clara. A esta temperatura, se adicionó adicionalmente gota a gota una solución mezclada de N-cianoacetiluretano (32 mg) en agua (4,2 ml) y piridina (1,3 ml) y se agitó durante la noche después de la adición gota a gota. Después de que la reacción se detuvo, un sólido amarillo se filtró y se lavó con agua y éter de petróleo. Se adicionaron ácido acético (5 ml) y acetato de sodio (160 mg, 2 mmol) en el sólido obtenido. La mezcla se calentó a una temperatura de 120°C y se agitó durante 6 h, entonces se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 ml de agua en el mismo para precipitar un sólido amarillo claro. Después de la separación y purificación a través de cromatografía de capa fina (DCM:MeOH=8:1), se obtuvo el compuesto 1 (12.0 mg).

[0071] RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.03 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 2.68-2.63 (m, 2H), 2.45-2.39 (m, 2H), 1.80-1.67 (m, 4H).

[0072] MS m/z (ESI): 447.4 [M+1].

[0073] Modalidad 2: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5,8-etanoftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 2b)

5



2

10

[0074] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico 1a en el paso 1 se reemplazó con anhídrido biciclo[2.2.2]oct-2-eno-2,3-dicarboxílico, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5,8-etanoftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 2).

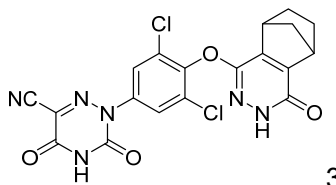
[0075] RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 12.13 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 1.88-1.73 (m, 4H), 1.39-1.17 (m, 6H).

15

[0076] MS m/z (ESI): 473.2 [M+1].

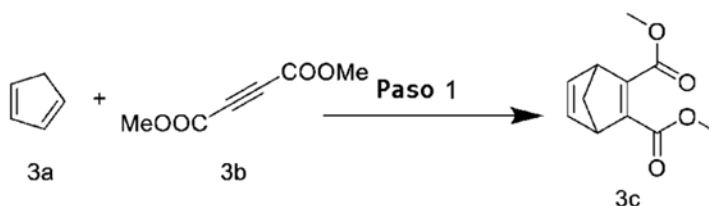
[0077] Modalidad 3: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5,8-metanoftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 3)

20



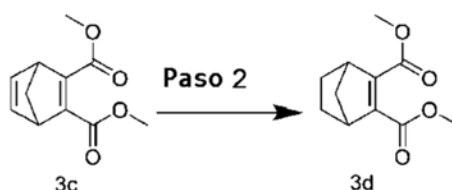
3

[0078] Paso 1: Preparación de dimetil-biciclo[2.2.1]hepta-2,5-dieno-2,3-dicarboxilato



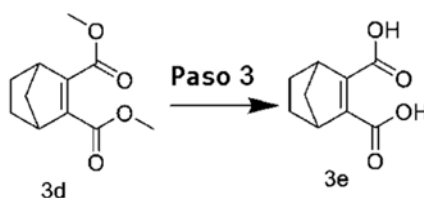
5 **[0079]** Se goteó acetilenodicarboxilato de dimetilo (compuesto 3b) (2.75 ml, 22.3 mmol) lentamente en ciclopentadieno (compuesto 3a) (1.475 g, 22.3 mmol) y se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente después de la adición. La reacción se detuvo y se obtuvo un producto aceitoso 3c (4.0 g). El producto crudo se usó directamente en la siguiente reacción sin purificación.

10 **[0080]** Paso 2: Preparación de dimetil-biciclo[2.2.1]hepta-2-eno-2,3-dicarboxilato:



15 **[0081]** El compuesto 3c (1.0 g, 4.8 mmol), carbono de paladio (0.05 g) y 15 ml de acetona se colocaron en un matraz de reacción y el reemplazo se realizó 3 veces bajo un balón de hidrógeno. El sistema se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La filtración se llevó a cabo y el solvente se concentró para secar bajo presión reducida, para obtener un producto líquido verde claro 3d (0.9 g).

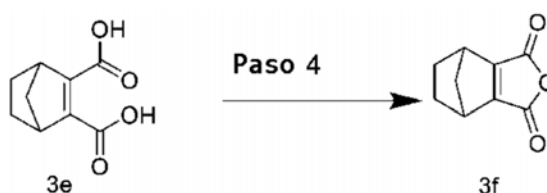
20 **[0082]** Paso 3: Preparación de biciclo[2.2.1]hepta-2-eno-2,3-diácido:



[0083] Se adicionaron tetrahidrofurano (20 ml) y agua (20 ml) en una mezcla del compuesto 3d (3.0 g, 14.3 mmol) e hidróxido de litio monohidratado (1.54 g, 35.8 mmol), y se agitaron

durante 2 h a temperatura ambiente. La solución se ajustó a pH 1 con ácido clorhídrico diluido 2N, se extrajo 3 veces con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró bajo presión reducida para obtener un compuesto sólido blanco 3e (2.0 g).

5 **[0084]** Paso 4: Preparación de 4,5,6,7-tetrahydro-4,7-metanoisofenilfuran1,3-diona:



10 **[0085]** Se adicionó anhídrido acético (10 mL) en el compuesto 3e (200 mg, 1.1 mmol). La mezcla se calentó a una temperatura de 100°C y se agitó durante 2 h. El solvente se removió por concentración bajo presión reducida, para obtener un producto crudo de un compuesto sólido 3f (200 mg).

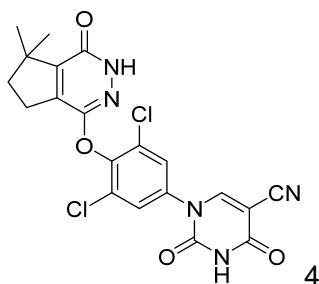
[0086] Paso 5: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5,8-metanoftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazina-6-nitrilo:

15 **[0087]** Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima 4,5,6,7-tetrahydroisobenzofuran-1,3-diona (compuesto 1a) en el paso 1 se reemplazó con 4,5,6,7-tetrahydro-4,7-metanoisofenilfuran1,3-diona (compuesto 3f), para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,6,7,8-hexahidro-5,8-metanoftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 3).

20 **[0088]** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.08 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 2.75-2.65 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 4H), 1.55-1.50 (m, 2H).

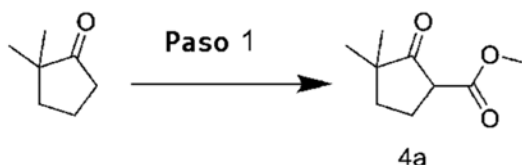
[0089] MS *m/z* (ESI): 459.0 [M+1].

[0090] Modalidad 4: Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((7,7-dimetil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahydro-1H-ciclopentano[d]piridazin-4-il)oxi)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 4)



5

[0091] Paso 1: Preparación de 3,3-dimetil-2-oxociclopentil-1-carboxilato de metilo



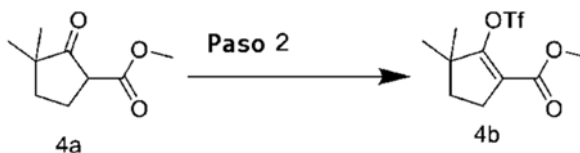
10

[0092] Se adicionó NAH (480 mg, 12 mmol) en una solución de un compuesto 2,2-dimetilciclopentano-1-ona (1.12 g, 10 mmol) y MeOH (0.5 ml) en DMC (11 ml). La mezcla se calentó a una temperatura de 82°C , se agitó durante 3 h y se enfrió. Se adicionaron metanol (0.5 ml) y ácido acético (1 ml) sucesivamente en el sistema, entonces el sistema se vertió en agua helada, se extrajo con diclorometano, se secó y se sometió a remoción del solvente bajo presión reducida, para obtener un compuesto aceitoso incoloro 4a (1.7 g)

15

usado directamente en el siguiente paso.

[0093] Paso 2: Preparación de 3,3-dimetil-2-(((trifluorometil)sulfo)oxo)ciclopent-1-eno-1-carboxilato de metilo

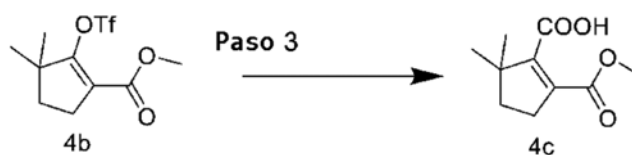


20

[0094] A -60°C , se adicionó anhídrido trifluoroacético (2 ml, 12 mmol) gota a gota en una solución del compuesto 4a (1.7 g, 10 mmol) y diisopropiletilamina (8.2 ml, 50 mmol) en diclorometano (17 ml). Después de la adición, la mezcla se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Se adicionaron 50 ml de agua en la misma,

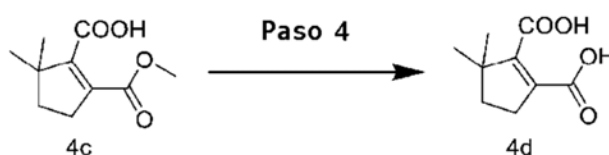
y la mezcla se extrajo con acetato de etilo, se sometió a remoción del solvente bajo presión reducida y se purificó a través de cromatografía en columna (PE:EA=50:1), para obtener un compuesto aceitoso incoloro 4b (1.8 g).

[0095] Paso 3: Preparación de ácido 2-(metoxicarbonil)-5,5-dimetilciclopent-1-eno-1-carboxílico



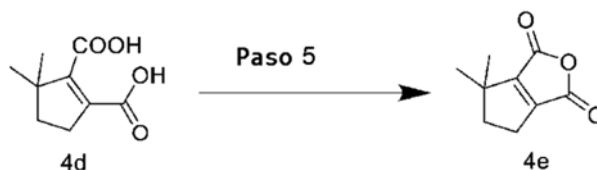
[0096] Bajo la atmósfera de un balón de gas nitrógeno, se adicionó DMF (25 ml) en una mezcla de 4b (1.8 g, 5.96 mmol), diisopropiletilamina (1.97 ml, 11.92 mmol), anhídrido acético (1.13 ml, 11.92 mmol), formiato de sodio (1.22 g, 5.96 mmol), diacetato de paladio (66.9 mg, 0.30 mmol) y cloruro de litio (758 mg, 17.88 mmol). El sistema se agitó durante 16 h a temperatura ambiente después de la adición y se adicionaron 300 ml de acetato de etilo en el sistema. El sistema se lavó con agua y salmuera saturada una vez cada uno. El solvente se removió bajo presión reducida, para obtener un aceite incoloro 4c (1.2 g).

[0097] Paso 4: Preparación de ácido 3,3-dimetilciclopent-1-eno-1,2-dicarboxílico



[0098] Se adicionaron metanol (6 ml) y agua (6 ml) en una mezcla de 4c (1.2 g, 6 mmol) e hidróxido de litio monohidratado (756 mg, 18 mmol), y se agitaron durante 3 h a temperatura ambiente. El metanol se removió bajo presión reducida, entonces la solución se ajustó a pH 1 con ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con acetato de etilo y el solvente se removió bajo presión reducida, para obtener un compuesto sólido blanco 4d (1.0 g).

[0099] Paso 5: Preparación de 4,4-dimetil-5,6-dihidro-1H-ciclopentil[c]furan-1,3(4H)-diona



[00100] Se adicionó anhídrido acético (10 ml) en el compuesto 4d (1.0 g, 5.43 mmol).

5

La mezcla se calentó hasta una temperatura de 100°C, se agitó durante 3 h y se enfrió. El anhídrido acético superfluo se removió bajo presión reducida, para obtener un compuesto líquido marrón claro 4e (875 mg), que se usó directamente en la siguiente síntesis.

[00101] Paso 6: Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((7,7-dimetil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentano[d]piridazin-4-il)oxi)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-

10 5-nitrilo

[00102] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido 3,4,5,6 -tetrahidroftálico (compuesto 1a) en el paso 1 se reemplazó con 4,4-dimetil-5,6-dihidro-1H-ciclopentil[c]furan-1,3(4H)-diona (compuesto 4e), para producir el producto de título 1-(3,5-dicloro-4-((7,7-dimetil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentano[d]piridazin-4-il)oxi)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo

15

(compuesto 4).

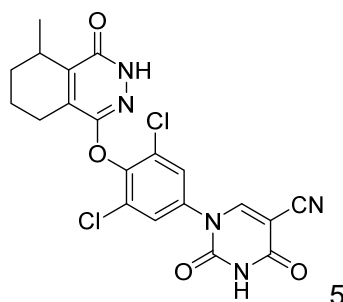
[00103] RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.09 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 2.97-2.93 (m, 2H), 2.01-1.98 (m, 2H), 1.34-1.20 (m, 6H).

[00104] MS m/z (ESI): 460.9 [M+1].

[00105] **Modalidad 5:** Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((5-metil-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto

20

5)



5

[00106] Paso 1: Preparación de 3-metil-2-oxociclohexano-1-carboxilato de metilo 5b:

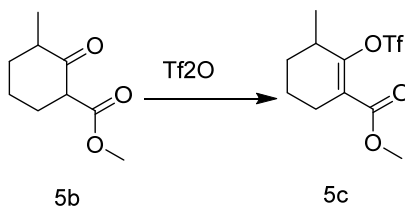


10

[00107] Se adicionó NaH (60% de contenido, 1.92 g, 48 mmol) en una solución de 2-metilciclohexanona (compuesto 5a) (4.48 g, 40 mmol) en diclorometano (50 ml). La mezcla se calentó a reflujo, se agitó durante 3 h y se enfrió. La mezcla se extinguió bruscamente con metanol (0.5 ml) y ácido acético (1 ml). El sistema de reacción se adicionó en un baño de hielo y se extrajo con diclorometano. El solvente se removió bajo presión reducida y se obtuvo un aceite (compuesto 5b) (5.6 g) por purificación a través de cromatografía en columna.

15

[00108] Paso 2: Preparación de 3-metil-2-(((trifluorometil)sulfo)oxo)ciclohexil-1-eno-1-carboxilato de metilo

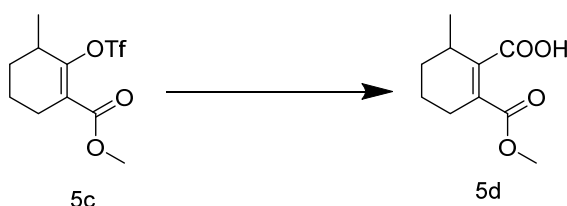


20

[00109] Bajo condiciones de baño de hielo, se adicionó NaH (60% de contenido, 600 mg, 25 mmol) en el compuesto 5b (0.85g, 5 mmol) en éter etílico (20 ml) y se agitó durante 0.5 h. Entonces se adicionó anhídrido trifluorometanosulfónico (2.8 g, 10 mmol) gota a gota en el sistema y se agitó adicionalmente durante 1 h a una temperatura de 0°C. El sistema

se extinguió con H₂O (50 ml) adicionado, se ajustó a pH 1 con HCl 1N adicionado y se extrajo con diclorometano. El solvente se removió bajo presión reducida y se obtuvo un compuesto aceitoso incoloro 5c (1.04 g) por purificación a través de cromatografía en columna (PE:EA=20:1).

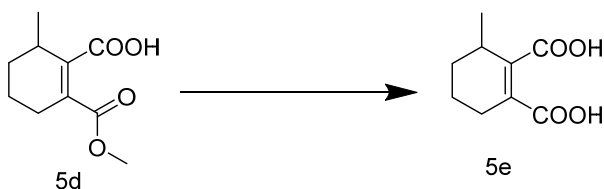
5 **[00110]** Paso 3: Preparación de ácido 2-(metoxycarbonil)-6-metilciclohexil-1-eno-1-carboxílico



10 **[00111]** Bajo una atmósfera de nitrógeno, se adicionaron diisopropiletilamina (0.714 g, 7.00 mmol) y anhídrido acético (0.903 g, 7.00 mmol) sucesivamente gota a gota en una solución del compuesto 5c (0.714 g, 10.5 mmol) y formiato de sodio (0.714 g, 10.50 mmol) en N,N-dimetilformamida (15 ml), y se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se adicionaron acetato de paladio (40 mg, 0.18 mmol) y cloruro de litio (445 mg, 10.50 mmol) y el sistema se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se adicionó acetato de etilo (30 ml) en el mismo y la mezcla se lavó con agua. El solvente se removió bajo presión reducida, para obtener un compuesto aceitoso amarillo claro 5d (590 mg).

15

[00112] Paso 4: Preparación de 3-metilciclohexil-1-eno-1,2-diácido 5e

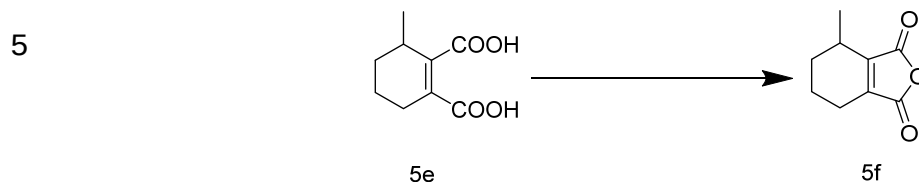


20

[00113] Se adicionó hidróxido de litio monohidratado (0.375 g, 8.94 mmol) en una solución del compuesto 5d (0.590 g, 2.98 mmol) en metanol (3 ml) y agua (3 ml), y se agitaron durante 3 h a temperatura ambiente. Entonces el metanol se removió bajo presión reducida. El sistema se ajustó a pH 1 con una solución de ácido clorhídrico acuoso 1N

adicionada y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y concentraron bajo presión reducida para remover el solvente, para obtener un compuesto aceitoso 5e (0.550 g).

[00114] Paso 5: Preparación de 4-metil-4,5,6,7-tetrahidroisofenilfuran-1,3-diona 5f



[00115] Se adicionó anhídrido acético (6 ml) en el compuesto 5e (0.550 g, 2.99 mmol). La mezcla se calentó a una temperatura de 100°C y se agitó durante 2 h. El sistema se enfrió y el solvente se removió bajo presión reducida, para obtener un compuesto aceitoso marrón 5f (0.34 g) usado directamente en la siguiente síntesis.

10

[00116] Paso 6: Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((5-metil-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 5)

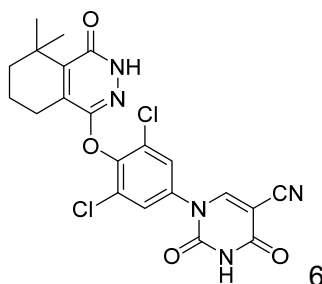
[00117] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido 3,4,5,6 -tetrahidroftálico (compuesto 1a) en el paso 1 se reemplazó con 4-metil-4,5,6,7-tetrahidroisofenilfuran-1,3-diona (compuesto 5f), para producir el producto de título 1-(3,5-dicloro-4-((5-metil-4-oxo-3,4,5,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 5).

15

[00118] MS m/z (ESI): 460.1 [M+1]

[00119] **Modalidad 6:** Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((5,5-dimetil-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo

20



5

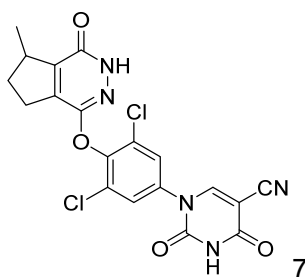
[00120] Se empleó la ruta sintética de la modalidad **5**, excepto que la materia prima 2-metilciclohexanona (compuesto 5a) en el paso 1 se reemplazó con 2,2-dimetilciclohexanona, para producir el producto de título 1-(3,5-dicloro-4-((5,5-dimetil-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 6).

10

[00121] MS m/z (ESI): 474.1 [M+1]

[00122] **Modalidad 7:** Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((7-metil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentil[d]piridazin-4-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 7)

15



20

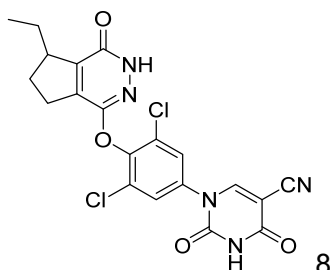
[00123] Se empleó la ruta sintética de la modalidad **5**, excepto que la materia prima 2-metilciclohexanona (compuesto 5a) en el paso 1 se reemplazó con 2-metilciclopentanona, para producir el producto de título 1-(3,5-dicloro-4-((7-metil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentil[d]piridazin-4-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 7).

[00124] MS m/z (ESI): 446.0 [M+1]

[00125] **Modalidad 8:** Preparación de 1-(3,5-dicloro-4-((7-etil-1-oxo-2,5,6,7-

tetrahidro-1H-ciclopentano[d]piridazin-4-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 8)

5



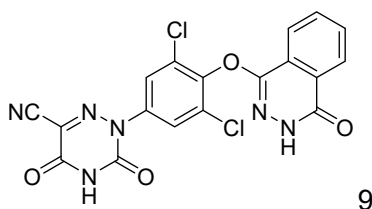
10

[00126] Se empleó la ruta sintética de la modalidad **5**, excepto que la materia prima 2-metilciclohexanona (compuesto 5a) en el paso 1 se reemplazó con 2-etilciclopentanona, para producir el producto de título 1-(3,5-dicloro-4-((7-etil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentano[d]piridazin-4-il)oxo)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 8).

[00127] MS m/z (ESI): 460.1 [M+1]

[00128] **Modalidad 9:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 9)

15



20

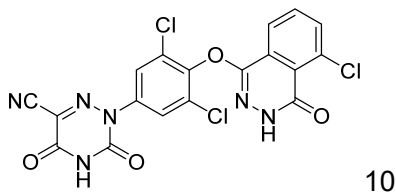
[00129] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima 1,4-dicloro-5,6,7,8-tetrahidroftalazina (compuesto 1c) en el paso 3 se reemplazó con 1,4-dicloro-5,6,7,8-tetrahidroftalazina, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 9).

[00130] RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 12.00(s, 1H), 8.31(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.26 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.09 (t, $J=12.0\text{Hz}$ 1H), 8.03 (t, $J=16.0\text{Hz}$ 1H), 7.81 (s, 2H).

[00131] MS m/z (ESI): 443.0 [M+1].

[00132] **Modalidad 10:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((5-cloro-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 10)

5



10

[00133] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido 3,4,5,6 -tetrahidroftálico (compuesto 1a) en el paso 1 se reemplazó con anhídrido 3-cloroftálico, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((5-cloro-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 10).

10

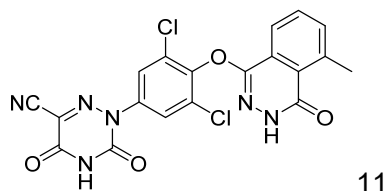
[00134] RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 12.00(s, 1H), 8.30 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.15 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.80 (s, 2H).

[00135] MS m/z (ESI): 477.0 [M+1].

15

[00136] **Modalidad 11:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((5-metil-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 11):

20



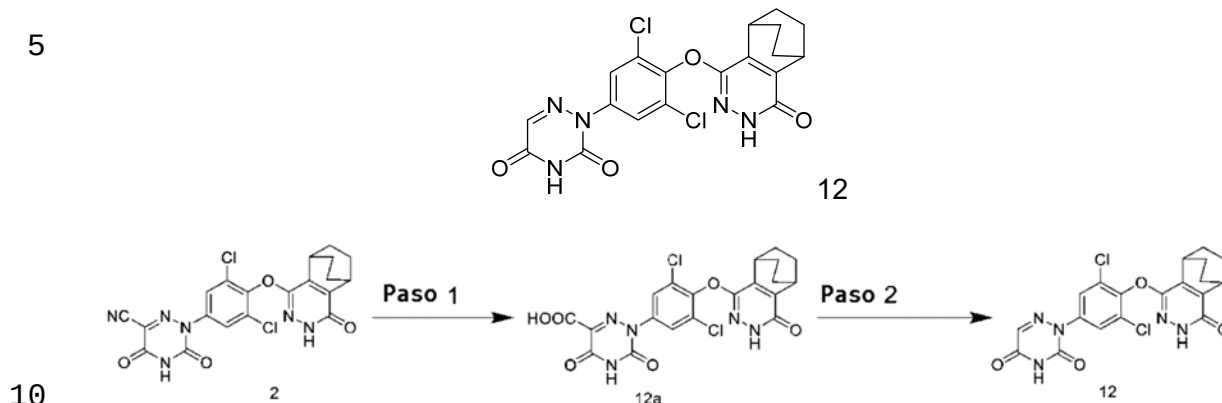
11

[00137] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido 3,4,5,6 -tetrahidroftálico (compuesto 1a) en el paso 1 se reemplazó con anhídrido 3-metilftálico, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((5-metil-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto

11).

[00138] MS m/z (ESI): 456.9 [M+1].

[00139] **Modalidad 12:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,6,7,8-hexahidro-5,8-etanoftalazin-1-il)oxo)fenil)-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 12):



[00140] Paso 1: Preparación de ácido 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5,8-etanoftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazina-6-carboxílico

[00141] Se adicionaron ácido acético (4 ml) y ácido clorhídrico concentrado (1 ml) respectivamente en el compuesto 2 (77 mg), se calentaron a una temperatura de 120°C, se agitaron durante 5 h y se enfriaron. La solución de reacción se diluyó con agua. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua y se lavó con éter de petróleo, para obtener un compuesto sólido 12a (35 mg) usado directamente en la siguiente reacción.

15

[00142] Paso 2: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,6,7,8-hexahidro-5,8-etanoftalazin-1-il)oxo)fenil)-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona

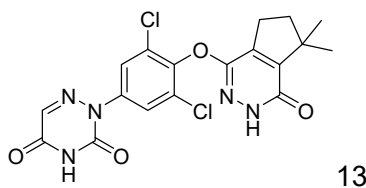
[00143] Se adicionó ácido mercaptoacético (2 ml) en el compuesto 12a (35.0 mg) y la mezcla se calentó a una temperatura de 170°C y se agitó durante 2 h. La mezcla se enfrió, se ajustó a pH 8 con una solución de hidróxido de sodio acuoso 1N y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron. El solvente se removió bajo presión reducida y se obtuvo un compuesto 12 (10.0 mg) por separación y purificación a través de cromatografía de capa fina (DCM:MeOH=8:1).

20

[00144] RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 12.10 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 7.33 (s, 1H), 2.01 (m, 2H), 1.93-1.75 (m, 4H), 1.39-1.27 (m, 4H).

[00145] MS m/z (ESI): 448.0 [M+1].

[00146] **Modalidad 13:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((7,7-dimetil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentil[d]piridazin-4-il)oxo)fenil)-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 13)



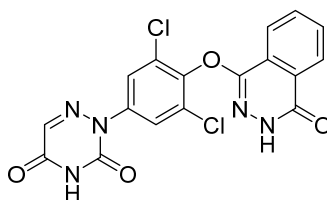
13

[00147] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 12, excepto que la materia prima 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5,8-etanofalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 2) en el paso 1 se reemplazó con 1-(3,5-dicloro-4-((7,7-dimetil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentano[d]piridazin-4-il)oxi)fenil)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-nitrilo (compuesto 4), para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((7,7-dimetil-1-oxo-2,5,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentil[d]piridazin-4-il)oxo)fenil)-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 13).

[00148] RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 12.02 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 7.35 (s, 1H), 2.94-2.90 (m, 2H), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.32 (d, 6H).

[00149] MS m/z (ESI): 436.0 [M+1].

[00150] **Modalidad 14:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-1,2,4-triazina-3,5-(2H,4H)diona (compuesto 14)



14

[00151] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 12, excepto que la materia prima

2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,6,8-hexahidro-5,8-etanofthalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 2) en el paso 1 se reemplazó con 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 9), para producir el producto del título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-

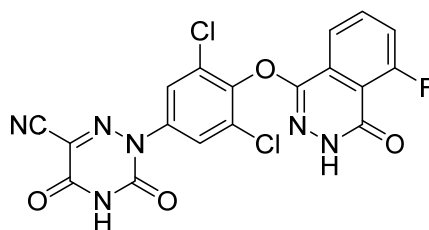
5

[00152] RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 12.00 (s, 1H), 8.30-8.23 (m, 2H), 8.09-7.99 (m, 2H), 7.18 (s, 1H).

[00153] MS m/z (ESI): 418.0 [M+1].

[00154] **Modalidad 15:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((5-fluoro-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 15)

10



15

15

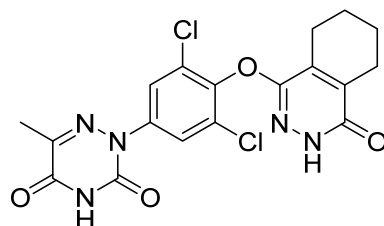
[00155] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido 3,4,5,6 -tetrahidroftálico (compuesto 1a) en el paso 1 se reemplazó con anhídrido 3-fluoroftálico, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((5-fluoro-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 15).

20

[00156] MS m/z (ESI): 461.0 [M+1].

[00157] **Modalidad 16:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-metil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 16)

38

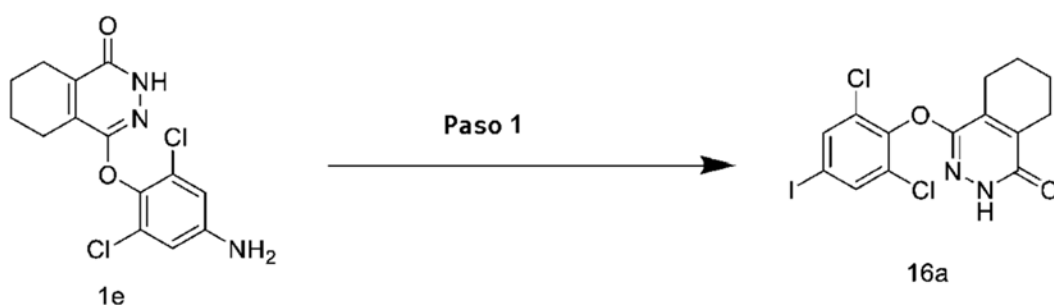


16

5

[00158] Paso 1: Preparación de 4-(2,6-dicloro-4-yodofenoxi)-5,6,7,8-tetrahidroftalazin-1 (2H)-ona (compuesto 16a)

10



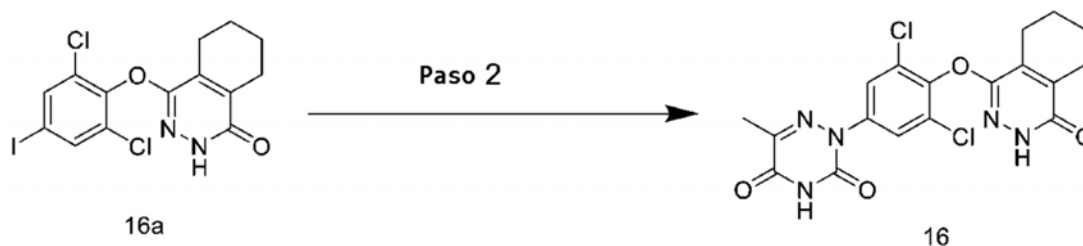
16a

15

[00159] Bajo condiciones de baño de hielo, se adicionaron agua (4 ml) y ácido clorhídrico concentrado (2 ml) sucesivamente en 1e (100 mg), seguido por la adición gota a gota de una solución de nitrito de sodio (30 mg) en agua (2 ml). La reacción se agitó durante 1 h bajo las condiciones de baño de hielo mantenidas. Se adicionó yoduro de potasio (104 mg) gota a gota y la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. La mezcla se extrajo con diclorometano y el solvente se removió bajo presión reducida, para obtener un sólido amarillo 16a (100 mg), usado directamente en la siguiente reacción.

20

[00160] Paso 2: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-metil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 16)



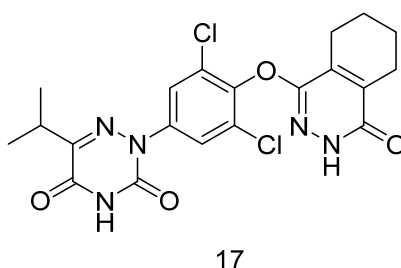
5 **[00161]** Se adicionó N,N-dicarbonamida (2.0ml) en una mezcla del compuesto 16a (20 mg), 6-azatrimina (6.6 mg), yoduro cuproso (8.9 mg) y carbonato de potasio (30 mg), y el sistema se calentó a una temperatura de 120°C y se agitó durante 12 h. El sistema se enfrió, filtró y separó del agua a través de la adición de acetato de etilo. El solvente se removi6 de la fase orgánica bajo presión reducida y se obtuvo un compuesto 16 (5.0 mg)

10 por separación y purificación a través de cromatografía de capa fina (DCM:MeOH=8:1).

[00162] MS m/z (ESI): 436.1 [M+1].

[00163] **Modalidad 17:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-isopropil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 17)

15



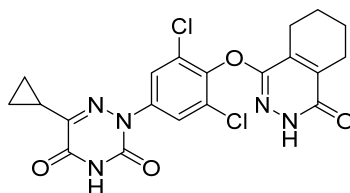
20

[00164] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 16, excepto que la materia prima 6-azatrimina en el paso 2 se reemplazó con 6-isopropil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (preparada al emplar el método bien conocido “*Chemistry and Biodiversity*, 2012, 9(3) 536-556”), para producir el producto del título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-isopropil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 17).

[00165] MS m/z (ESI): 464.1 [M+1].

[00166] **Modalidad 18:** Preparación de ciclopropilo 6-ciclopropil-2-(3,5-dicloro-4-((4-

oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona
(compuesto 18)

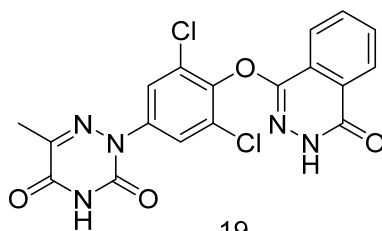


18

[00167] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 16, excepto que la materia prima 6-azatimina en el paso 2 se reemplazó con 6-ciclopropil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (preparada al emplear el método bien conocido encontrado en “*Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1975, 40, 1038-1041”), para producir el producto del título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4,6,7-hexahidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-ciclopropil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 18).

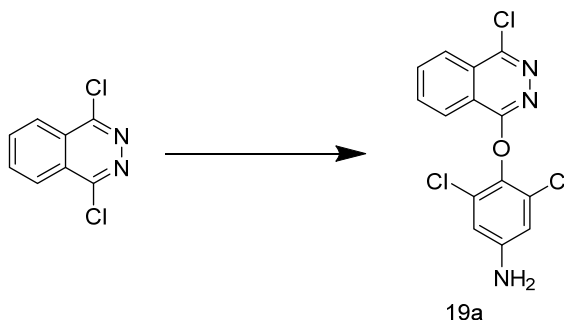
[00168] MS m/z (ESI): 462.1 [M+1].

[00169] **Modalidad 19:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-metil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 19)



19

[00170] Paso 1: Preparación de 3,5-dicloro-4-((4-cloroftalazin-1-il)oxo)anilina (compuesto 19a)

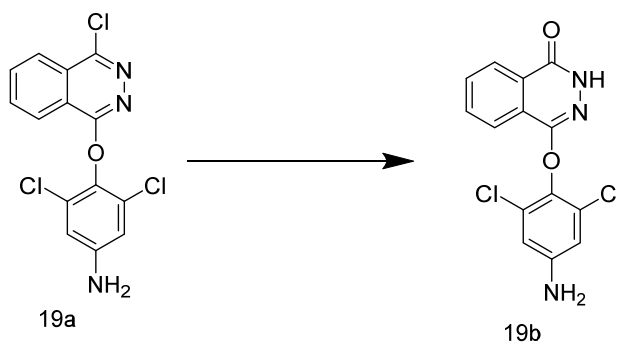


5

[00171] Se empleó la ruta sintética del compuesto intermedio 1d en el paso 3 de la modalidad 1, excepto que 1,4-dicloro-5,6,7,8-tetrahydroftalazina (compuesto 1c) se reemplazó con 1,4-diclorofthalazina, para producir el producto de título 3,5-dicloro-4-((4-clorofthalazin-1-il)oxo)anilina (compuesto 19a).

10

[00172] Paso 2: Preparación de 4-(4-amino-2,6-diclorofenoxi)ftalazin-1(2H)-ona (compuesto 19b)



15

[00173] Se empleó la ruta sintética del compuesto intermedio 1e en el paso 4 de la modalidad 1, excepto que 3,5-dicloro-4-((4-cloro-5,6,7,8-tetrahydroftalazin-1-il)oxi)anilina (compuesto 1d) se reemplazó con 3,5-dicloro-4-((4-clorofthalazin-1-il)oxo)anilina (compuesto 19a), para producir el producto de título 4-(4-amino-2,6-diclorofenoxi)ftalazin-1(2H)-ona (compuesto 19b).

20

[00174] Paso 3: Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-metil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 19)

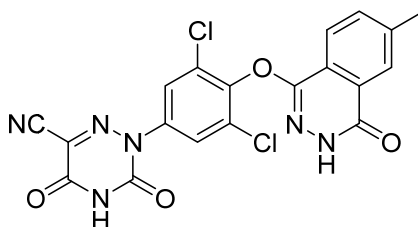
[00175] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 16, excepto que 4-(2,6-dicloro-4-

yodofenoxi)-5,6,7,8-tetrahydroftalazin-1(2H)-ona (compuesto 16a) se reemplazó en el paso 1 con el compuesto 4-(4-amino-2,6-diclorofenoxi)ftalazin-1(2H)-ona (compuesto 19b), para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxo)fenil)-6-metil-1,2,4-triazina-3,5(2H,4H)-diona (compuesto 19).

5 **[00176]** MS m/z (ESI): 432.0 [M+1].

[00177] **Modalidad 20:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((6-metil-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 20):

10



20

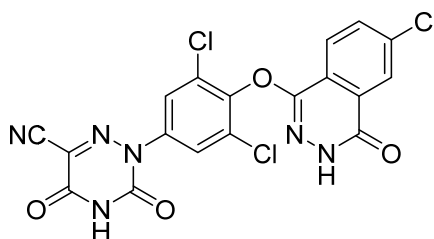
15

[00178] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido tetrahydroftálico (1a) en el paso 1 se reemplazó con anhídrido 4-metilftálico, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((6-metil-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 20).

[00179] MS m/z (ESI): 457.0 [M+1].

[00180] **Modalidad 21:** Preparación de 2-(3,5-dicloro-4-((6-cloro-4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 21):

20



21

[00181] Se empleó la ruta sintética de la modalidad 1, excepto que la materia prima anhídrido tetrahydroftálico (1a) en el paso 1 se reemplazó con anhídrido 4-cloroftálico, para producir el producto de título 2-(3,5-dicloro-4-((6-cloro-4-oxo-3,4-dihydroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazina-6-nitrilo (compuesto 21).

5 **[00182]** MS m/z (ESI): 477.0 [M+1].

[00183] Modalidad de prueba 1: Fuerza de unión del compuesto a prueba de TR α :

1. Aparatos y materiales experimentales principales:

Lector de microplacas Envision 2104;

Péptido coactivador Biotin-SRC2-2, comercialmente disponible de Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.;

10 TR α LBD, GST, comercialmente disponible de ThermoFisher (Art. No. PV4762);

Anticuerpo anti-glutación de unión a europio, comercialmente disponible de Cisbio (Art. No. 61GSTKLB); y

Estreptavidina-D2, comercialmente disponible de Cisbio (Art. No. 610SADAB)

2. Preparación y tratamiento de compuestos

15 2.1 Preparación de solución madre del compuesto en dimetilsulfóxido

Todos los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido para preparar una solución madre 10 mmol.

2.2 Almacenamiento de compuestos

Después de que los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido, la solución se puede almacenar durante 3 meses en un desecador a temperatura ambiente. Para
20 almacenamiento a largo plazo, los compuestos se deben colocar en un refrigerador a -20°C.

3. Pasos experimentales

3.1 Preparación de amortiguador de reacción 1x

3.2 Examen de compuestos:

a) se usó dimetilsulfóxido al 100% para diluir el fármaco positivo triyodotironina (T3)

a partir de 10 mmol (100x) o el compuesto que se va a probar a partir de 1 mmol (100x), en una relación igual de 1:3, para un total de 10 concentraciones.

b) se preparó un compuesto diluido de gradiente de concentración 4x con un amortiguador de reacción 1x.

5 c) se adicionaron 5 μ l del compuesto diluido de gradiente de concentración 4x en una placa de prueba de 384 concavidades.

d) se prepararon TR α LBD 4X y RXR α 4X con el amortiguador de reacción 1x.

e) se adicionaron 5 μ l de TR α LBD 4x y RXR α 4X en la placa de prueba de 384 concavidades.

10 f) se prepararon biotina-RC2-2 2X, anticuerpo anti-glutación de unión a europio 2X y estreptavidina-d2 2X con el amortiguador de reacción 1x.

g) se adicionaron 10 μ l de una solución mezclada 2X (con referencia al paso f) en la placa de prueba de 384 concavidades.

h) La placa de prueba de 384 concavidades se centrifugó durante 1000 revoluciones dentro de 1 min en una centrífuga.

15 i) La incubación a temperatura ambiente se realizó durante 1 h en tanto que se protegió de la luz.

j) Los valores de señal de fluorescencia de cada concavidad de la placa de prueba de 384 concavidades a la longitud de onda de 665 nm y 615 nm se registraron con el lector de microplacas Envision 2104, y se calculó la relación de fluorescencia de 665 nm/615 nm.

4. Análisis de datos

20

4.1 Cálculo de relación relativa (relación_{665 nm/615 nm} - relación_{en blanco}) de cada concavidad

4.2 El porcentaje de actividad se calculó como sigue:

$$\text{Actividad (\%)} = \left[\frac{\overline{\text{Relación}}_{\text{compuesto}} - \overline{\text{Relación}}_{\text{en blanco}}}{\overline{\text{Relación}}_{\text{positiva}} - \overline{\text{Relación}}_{\text{en blanco}}} \right] * 100$$

$\overline{\text{Relación}}_{\text{compuesto}}$: promedio de relaciones relativas de concavidades de compuestos

5 de modalidad

$\overline{\text{Relación}}_{\text{positiva}}$: promedio de relaciones relativas de todas las concavidades de control positivo

$\overline{\text{Relación}}_{\text{en blanco}}$: promedio de relaciones relativas de todas las concavidades de control negativo

10 4.3 Gráfica de curvas y cálculo de EC50:

Se calculó EC50 al usar Graphpad 5.0 a través del método de regresión no lineal para ajustar la relación entre la actividad (%) y la concentración logarítmica del compuesto.

$$Y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) \times \text{pendiente})})$$

X: Concentración logarítmica del compuesto Y: Porcentaje de actividad

15 Los datos de prueba particulares se muestran en la tabla 1 como sigue.

[00184] Modalidad de prueba 2: Evaluación de la actividad agonista del compuesto hacia TR α

1. Aparatos y materiales experimentales principales:

Lector de microplacas Envision 2104

Línea celular HEK293T, comercialmente disponible de ATCC (Art. No.: CRL-3216)

20 pGL4.35[luc2P/9XGAL4 UAS/Hygro], comercialmente disponible de Promega (Art. No.: E1370)

plásmido pBIND-TR α , de Pharmaron

plásmido pBIND- RXR α , de Pharmaron

Agente de transfección LipoLTX, comercialmente disponible de ThermoFisher (Art.

No.: 15338-100)

2. Preparación de compuesto

2.1 Disolución de compuesto

5 El polvo de compuesto se preparó en una solución madre 10 mmol en dimetilsulfóxido de acuerdo con el esquema estándar.

2.2 Almacenamiento de compuestos

Todos los compuestos disueltos en dimetilsulfóxido se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente durante un corto plazo, o se almacenaron a -20°C durante un largo plazo.

2.3 Preparación de compuestos experimentales

10 2.3.1 Todos los compuestos que se van a probar se diluyeron con dimetilsulfóxido en un gradiente de 3 veces, en 10 gradientes de dilución, comenzando de la concentración inicial de $10\text{ }\mu\text{mol}$.

2.3.2 La triyodotironina de control positivo (T3) se diluyó con dimetilsulfóxido en un gradiente de 3 veces, en 10 gradientes de dilución, comenzando de la concentración inicial de $16.67\text{ }\mu\text{mol}$.

15 2.3.3 Se prepararon un control positivo $166.7\times$ ($16.67\text{ }\mu\text{mol}$, triyodotironina (T3)) y un control negativo $166.7\times$ (dimetilsulfóxido al 100%).

2.4 La placa de compuesto se cerró y se agitó durante 5 min.

3 Proceso de experimento

3.1 Preparación de suspensión celular y siembra en placa

20 a) Se cultivaron todas las células de acuerdo con la operación estándar de ATCC y se probó HEK293T en el período de crecimiento exponencial;

b) El medio se desechó;

c) Las células se lavaron dos veces con un amortiguador de fosfato;

d) Se adicionó una solución de tripsinización para digerir las células y la digestión

se terminó con un medio completo;

e) Las células se recolectaron y contaron, y solo cuando la viabilidad celular fue mayor de 90% se pudo llevar a cabo el experimento;

5 f) 2.5×10^6 células HEK293-LUC se sembraron en una placa de cultivo celular de 60 mm; y

g) La placa de cultivo con células sembradas se colocó en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5% y se cultivó durante la noche.

3.2 Transfección celular

a) El agente de transfección LipoLTX se colocó a temperatura ambiente para equilibrio;

10 b) Se adicionaron 6 µl de agente Plus y 6 µg de ADN en 250 µl de medio Opti-MEM^{MR} sin entrar en contacto con la pared de tubo, y se mezclaron uniformemente a través de soplado y pipeteo por una pistola de pipeteo, y

Plásmido: Se adicionaron 2.5 µg de pBIND-TRα, 2.5 µg de pBIND-RXRα y 1 µg de plásmido pGL4.35 respectivamente en el mismo;

15 c) Se adicionaron 12 µl de Lipo LTX y 250 µl de medio Opti-MEM^{MR} sin entrar en contacto con la pared de tubo, y se mezclaron uniformemente a través de soplado y pipeteo por una pistola de pipeteo;

d) el agente mezclado con ADN Plus (ver paso 3.2.b) se adicionó en el agente de transfección LipoLTX diluido (ver paso 3.2.c) y se detuvo durante 15 min a temperatura ambiente;

20 e) el agente de transfección mezclado con ADN se adicionó a una placa de cultivo celular de 60 mm (ver paso 3.1); y

f) la placa de cultivo se colocó en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5% y se cultivó durante 5 h.

3.3 Tratamiento de compuesto

a) Se transfirieron 150 nl del compuesto diluido (ver paso 2.3) por Echo550 a una placa de cultivo celular (6007680-50, PE);

b) las células (ver paso 3.2) se sembraron en una placa de cultivo celular 384 (6007680-50, PE), con 15,000 células y 25 µl del medio que contiene suero fetal bovino al 5% por concavidad; y

c) las células se cultivaron durante la noche en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5%.

3.4 Detección de compuesto

a) El agente de detección Steady-Glo^{MR} se colocó a temperatura ambiente;

b) la placa celular 384 (ver paso 3.3) se colocó a temperatura ambiente;

c) Se adicionaron 25 µl del agente de detección Steady-Glo^{MR} por concavidad en la placa de cultivo celular (ver paso 3.4b);

d) la placa se colocó en un agitador y se agitó durante 5 min en tanto que se protegió de la luz; y

e) el valor de quimioluminiscencia se detectó con el lector de microplacas Envision 2104.

4. Análisis de datos

4.1 Cálculo de actividad (%):

$$\text{Actividad (\%)} = \left[\frac{\overline{\text{RLU}}_{\text{compuesto}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{en blanco}}}{\overline{\text{RLU}}_{\text{positiva}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{en blanco}}} \right] \times 100$$

RLU: Fluorescencia generada

$\overline{\text{RLU}}_{\text{compuesto}}$: Promedio de concavidades de compuestos de modalidad

$\overline{\text{RLU}}_{\text{positiva}}$: promedio de control positivo

$\overline{\text{RLU}}_{\text{en blanco}}$: promedio de control negativo

4.2 Cálculo de EC₅₀ y gráfica de curva de dosis-efecto del compuesto

Se calculó EC50 del compuesto al usar Graphpad 5.0 para ajustar la actividad (%) y la concentración logarítmica del compuesto.

$$Y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \times \text{pendiente})})$$

X: Concentración logarítmica del compuesto Y: Porcentaje de tasa de inhibición

5 **[00185]** Los datos de prueba particulares se muestran en la tabla 1 como sigue.

[00186] Modalidad de prueba 3: Fuerza de unión del compuesto a prueba de TR β

1. Aparato y material experimental principal:

Lector de microplacas Envision 2104,

Péptido coactivador Biotin-SRC2-2, comercialmente disponible de Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.

10 TR β LBD, GST, comercialmente disponible de ThermoFisher (Art. No. PV4762)

Anticuerpo anti-glutación de unión a europio, comercialmente disponible de Cisbio (Art. No. 61GSTKLB)

Estreptavidina-D2, comercialmente disponible de Cisbio (Art. No. 610SADAB)

2. Preparación y tratamiento de compuestos

15 2.1 Preparación de solución madre del compuesto en dimetilsulfóxido

Todos los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido para preparar una solución madre 10 mmol.

2.2 Almacenamiento de compuestos

Después de que los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido, la solución se puede almacenar durante 3 meses en un desecador a temperatura ambiente. Para
20 almacenamiento a largo plazo, los compuestos se deben colocar en un refrigerador a -20 °C.

3. Pasos experimentales

3.1 Preparación de amortiguador de reacción 1x

3.2 Examen de compuestos:

a) Se usó dimetilsulfóxido al 100% para diluir el fármaco positivo triyodotironina (T3) a partir de 10 μ mol (100x) o el compuesto que se va a probar a partir de 1 mmol (100x), en una relación igual de 1:3, totalmente en 10 concentraciones;

5 b) Se preparó un compuesto diluido de gradiente de concentración 4x con un amortiguador de reacción 1x;

c) Se adicionaron 5 μ l del compuesto diluido de gradiente de concentración 4x en una placa de prueba de 384 concavidades;

d) Se prepararon TR β LBD 4X y RXR β 4X con el amortiguador de reacción 1x;

e) Se adicionaron 5 μ l de TR β LBD 4x y RXR β 4X en la placa de prueba de 384 concavidades;

10 f) Se prepararon biotina-RC2-2 2X, anticuerpo anti-glutación de unión a europio 2X y estreptavidina-d2 2X con el amortiguador de reacción 1x;

g) Se adicionaron 10 μ l de una solución mezclada 2X (con referencia al paso f) en la placa de prueba de 384 concavidades;

15 h) La placa de prueba de 384 concavidades se centrifugó durante 1000 revoluciones dentro de 1 min en una centrífuga;

i) La incubación a temperatura ambiente se realizó durante 1 h en tanto que se protegió de la luz; y

j) Los valores de señal de fluorescencia de cada concavidad de la placa de prueba de 384 concavidades a la longitud de onda de 665 nm y 615 nm se registraron con el lector de microplacas Envision 2104, y se calculó la relación de fluorescencia de 665 nm/615 nm.

20

4. Análisis de datos

4.1 Cálculo de relación relativa (relación_{665 nm/615 nm} - relación_{en blanco}) de cada concavidad

4.2 El porcentaje de actividad se calculó como sigue:

$$\text{Actividad (\%)} = \left[\frac{\overline{\text{Relación}}_{\text{compuesto}} - \overline{\text{Relación}}_{\text{en blanco}}}{\overline{\text{Relación}}_{\text{positiva}} - \overline{\text{Relación}}_{\text{en blanco}}} \right] \times 100$$

5 $\overline{\text{Relación}}_{\text{compuesto}}$: promedio de relaciones relativas de concavidades de compuestos de modalidad

$\overline{\text{Relación}}_{\text{positiva}}$: promedio de relaciones relativas de todas las concavidades de control positivo

10 $\overline{\text{Relación}}_{\text{en blanco}}$: promedio de relaciones relativas de todas las concavidades de control negativo

4.3 Gráfica de curvas y cálculo de EC50:

Se calculó EC50 al usar Graphpad 5.0 a través del método de regresión no lineal para ajustar la relación entre la actividad (%) y la concentración logarítmica del compuesto.

$$Y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) \times \text{pendiente})})$$

X: Concentración logarítmica del compuesto Y: Porcentaje de actividad

15 [00187] Los datos de prueba particulares se muestran en la tabla 1 como sigue.

Tabla 1 La actividad de unión del compuesto al receptor de tiroxina β se muestra como sigue:

Modalidades	IC50		Selectividad de THR α / β (factor)
	Fuerza de unión a THR β (μ M)	Fuerza de unión a THR α (μ M)	
Modalidad 1	1.23	>10	> 8.1
Modalidad 2	2.33	>10	>4.29
Modalidad 3	5.2	>10	>1.92
Modalidad 4	0.36	4.3	>11.9
Modalidad 9	0.17	>10	>58.8
Modalidad 10	1.47	>10	>6.80

Modalidad 11	1.78	>10	5.61
Modalidad 12	0.80	0.2	0.25
Modalidad 13	0.17	1.22	7.17
Modalidad 14	0.262		
Compuesto comparativo 53	0.26	5.0	19.2
T3	0.00052	0.00026	

[00188] Conclusión: en comparación con el compuesto comparativo 53 descrito, algunos de los compuestos de acuerdo con la presente invención mostraron inesperadamente alta actividad de THR β (<0.2 μ M) y algunos de los compuestos mostraron mayor selectividad a THR α que el compuesto comparativo 53.

[00189] Modalidad de prueba 4: Evaluación de actividad agonista del compuesto hacia el receptor TR β

[00190] Resumen de experimento: Se insertaron secuencias codificadoras de TR β -LBD y RXR α -LBD en un plásmido pBIND (Promega, E1581) respectivamente. El vector de expresión y el vector indicador (pGL4.35 que porta un gen indicador de luciferasa activado por un promotor GAL4 integrado estable) se coexpresaron en la célula hospedadora. Cuando el agonista se une al correspondiente receptor quimérico, el receptor quimérico se une al sitio de unión a GAL4 en el vector de gen indicador y estimula la expresión de gen indicador. De acuerdo con la intensidad de las señales de quimioluminiscencia, se determinó la actividad agonista del compuesto hacia el receptor de TR β .

[00191] Aparatos y materiales experimentales:

Lector de microplacas Envision 2104

Línea celular HEK293T, comercialmente disponible de ATCC (Art. No.: CRL-3216)

pGL4.35[luc2P/9XGAL4 UAS/Hygro], comercialmente disponible de Promega (Art. No.: E1370)

plásmido pBIND-TR β , de Pharmaron

plásmido pBIND- RXR α , de Pharmaron

Agente de transfección LipoLTX, comercialmente disponible de ThermoFisher (Art. No.: 15338-100)

Kit de detección de luciferasa Steady-Glo^{MR}, comercialmente disponible de Promega (Art. No.: E2520)

5

2.3 Preparación de compuestos experimentales

Todos los compuestos que se van a probar se diluyeron con dimetilsulfóxido en un gradiente de 3 veces, en 10 gradientes de dilución, comenzando de la concentración inicial de 10 mmol.

10

La triyodotironina de control positivo (T3) se diluyó con dimetilsulfóxido en un gradiente de 3 veces, en 10 gradientes de dilución, comenzando de la concentración inicial de 16.67 μ mol.

Se prepararon un control positivo 166.7 $\times$ (16.67 μ mol, triyodotironina (T3)) y un control negativo 166.7 $\times$ (dimetilsulfóxido al 100%).

La placa de compuesto se cerró y se agitó durante 5 min.

15

Proceso de experimento

3.1 Preparación de suspensión celular y siembra en placa

a) Se cultivaron todas las células de acuerdo con la operación estándar de ATCC y se probó HEK293T en el período de crecimiento exponencial;

b) El medio se desechó;

20

c) Las células se lavaron dos veces con un amortiguador de fosfato;

d) Se adicionó una solución de tripsinización para digerir las células y la digestión se terminó con un medio completo;

e) Las células se recolectaron y contaron, y solo cuando la viabilidad celular fue mayor de 90% se pudo llevar a cabo el experimento;

f) 2.5 $\times$ 10⁶ células HEK293-LUC se sembraron en una placa de cultivo celular de 60

mm; y

g) La placa de cultivo con células sembradas se colocó en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5% y se cultivó durante la noche.

3.2 Transfección celular

5 a) El agente de transfección LipoLTX se colocó a temperatura ambiente para equilibrio;

b) Se adicionaron 6 µl de agente Plus y 6 µg de ADN en 250 µl de un medio Opti-MEM^{MR} sin entrar en contacto con la pared de tubo, y se mezclaron uniformemente a través de soplado y pipeteo por una pistola de pipeteo; plásmido: 2.5 µg de pBIND-TRβ, 2.5 µg de pBIND-RXRα y 1 µg de plásmido pGL4.35

10 c) Se adicionaron 12 µl de Lipo LTX y 250 µl de medio Opti-MEM^{MR} sin entrar en contacto con la pared de tubo, y se mezclaron uniformemente a través de soplado y pipeteo por una pistola de pipeteo;

d) el agente mezclado con ADN plus (ver paso 3.2.b) se adicionó en el agente de transfección LipoLTX diluido (ver paso 3.2.c) y se detuvo durante 15 min a temperatura ambiente;

15 e) el agente de transfección mezclado con ADN se adicionó a una placa de cultivo celular de 60 mm (ver paso 3.1); y

f) la placa de cultivo se colocó en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5% y se cultivó durante 5 h.

3.3 Tratamiento de compuesto

20 a) Se transfirieron 150 nl del compuesto diluido (ver paso 2.3) por Echo550 a una placa de cultivo celular (6007680-50, PE);

b) las células (ver paso 3.2) se sembraron en una placa de cultivo celular 384 (6007680-50, PE), con 15,000 células y 25 µl del medio por concavidad; y

c) las células se cultivaron durante la noche en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5%.

3.4 Detección de compuesto

- a) El agente de detección Steady-Glo^{MR} se colocó a temperatura ambiente;
- b) la placa celular 384 (ver paso 3.3) se colocó a temperatura ambiente;
- c) Se adicionaron 25 µl del agente de detección Steady-Glo^{MR} por concavidad en la placa de cultivo celular (ver paso 3.4b);
- d) la placa se colocó en un agitador y se agitó durante 5 min en tanto que se protegió de la luz; y
- e) el valor de quimioluminiscencia se detectó con el lector de microplacas Envision 2104.

Análisis de datos

4.1 Cálculo de actividad (%):

$$\text{Actividad (\%)} = \left[\frac{\overline{\text{RLU}}_{\text{compuesto}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{en blanco}}}{\overline{\text{RLU}}_{\text{positiva}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{en blanco}}} \right] \times 100$$

RLU: fluorescencia generada

$\overline{\text{RLU}}_{\text{compuesto}}$: Promedio de concavidades de compuestos de modalidad

$\overline{\text{RLU}}_{\text{positiva}}$: promedio de control positivo

$\overline{\text{RLU}}_{\text{en blanco}}$: promedio de control negativo

4.2 Cálculo de EC50 y gráfica de curva de dosis-efecto del compuesto

Se calculó EC50 del compuesto al usar Graphpad 5.0 para ajustar la actividad (%) y la concentración logarítmica del compuesto.

$$Y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \times \text{pendiente}))}$$

X: Concentración logarítmica del compuesto Y: Porcentaje de tasa de inhibición

Tabla 2: la actividad agonista del compuesto de la presente invención hacia el receptor de

tiroxina beta se muestra como sigue:

	Modalidades	EC ₅₀	
		Actividad agonista de THR β (μ M)	Actividad agonista de THR α (μ M)
5	Modalidad 4	2.45	4.25
	Modalidad 9	1.75	3.98
	Modalidad 12	0.79	1.08
	Modalidad 13	0.097	0.123
	Compuesto comparativo 53	2.48	4.57
10	T3	0.001	0.0005

[00192] Conclusión: el compuesto de la presente invención puede activar la señal corriente abajo del receptor de hormona tiroidea beta.

[00193] Modalidad de prueba 5: Evaluación farmacocinética:

15 **[00194]** Las ratas se usaron como animales de prueba. Después de la infusión intragástrica de los compuestos de la modalidad 4 y modalidad 9, se probaron las concentraciones de fármaco en el plasma de las ratas en diferentes momentos. Se estudiaron los comportamientos farmacocinéticos de los compuestos de la presente invención en ratas y se evaluaron las características de metabolismo farmacéutico de los

20 mismos. En cada grupo de la modalidad, se seleccionaron 3 ratas SD macho con un peso corporal similar y la dosis oral fue 2 mg/kg en una dosis individual. La sangre se recolectó en puntos de tiempo de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h y 24 h después de la administración de la dosis a los animales. Se empleó el método analítico LC-MS/MS para detectar el contenido de los compuestos en plasma y el límite inferior de cuantificación del

método fue 20 ng/ml. El software de análisis de datos metacineéticos WinNonlin 7.0 se usó para generar estadísticas en VT088 y datos de concentración del plasma. El método de modelo sin compartimento (NCA) se utilizó para calcular los parámetros farmacocineéticos, particularmente como se muestra en la tabla 2 más adelante.

- 5 **[00195]** Esquema de experimento:
- [00196]** Fármacos de experimento: compuestos de modalidad 4 y modalidad 9.
- [00197]** Animales de laboratorio:
- [00198]** Seis ratas SD macho sanas, comercialmente disponibles de Shanghai Sippr-Bk Laboratory Animal Co., Ltd., con una licencia de producción animal No.: SCXK(Shanghai) 2008-0016, se dividieron en 2 grupos, 3 en cada grupo.
- 10 **[00199]** Preparación de fármaco: se tomó una cierta cantidad del fármaco y se adicionó a una solución acuosa de Klucel LF al 2% + Tween 80 al 0.1%, para preparar una solución clara o una suspensión uniforme.
- [00200]** Dosis: Las ratas SD se ayunaron durante la noche y se les dio el fármaco por infusión intragástrica a una dosis administrada de 2 mg/kg y un volumen administrado de
- 15 10 mL/kg cada una.
- [00201]** Operación: las ratas se dosificaron por infusión intragástrica con los compuestos de la modalidad 4 y modalidad 9. Al menos 0.2 mL de sangre se recolectaron de la vena caudalis a 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h y 24 h antes y después de la dosis; la sangre entonces se colocó en tubos de muestra heparinizados, se centrifugó a 4°C y 3500 rpm durante 10 min para separar el plasma. Entonces, los tubos de muestra
- 20 heparinizados se almacenaron a -20°C y se permitió que las ratas comieran alimentos 2 h después de la dosis.
- [00202]** Determinación de contenidos de los compuestos que se van a probar en el plasma de ratas después de la infusión intragástrica de los fármacos a diferentes concentraciones: las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente, se

tomaron 50 μ L de cada una y se adicionaron a 130 μ L de una solución de trabajo estándar interna (1000 ng/mL, acetonitrilo, tolbutamida) y la mezcla se agitó durante aproximadamente 1 min y entonces se centrifugó a 4°C y 13000 rpm durante 10 min. Se tomaron 50 μ L del sobrenadante y se mezclaron con 100 μ L de agua de acetonitrilo al 50%, y entonces se introdujo para análisis LC/MS/MS.

[00203] Los resultados de los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Datos de metabolismo farmacéutico de ratas

Compuesto	Dosis	Tiempo al pico	Concentración pico de fármacos en sangre	Área de curva	Semivida
	(mg/kg)	(h)	(ng/mL)	(ng·h/mL)	(h)
Modalidad 4	2.0	5.33±1.15	727±183	9242±1245	5.14±0.83
Modalidad 9	2.0	4.67±1.15	2007±106	24790±3704	4.56±0.42
Compuesto comparativo 53	2.0	5.3±1.15	1163±97.1	12854 ±961	3.53±0.42

[00204] Conclusión: los compuestos de la presente invención poseen una buena absorción farmacocinética y ventajas farmacocinéticas significativas. En comparación con el compuesto comparativo 53 reportado, algunos de los compuestos de la presente invención muestran inesperadamente valores de $C_{\max}$ y cantidades de exposición mayores a la misma dosis y preparación. Todos los resultados de PK anteriores muestran que, los compuestos proporcionados en la presente invención tienen buenas propiedades de PK y

se pueden usar como un fármaco terapéutico para una enfermedad relacionada con el metabolismo.

5

10

15

20