

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 207**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2019** **PCT/US2019/016868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2019** **WO19157065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2019** **E 19750817 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3749355**

54 Título: **Inhibidores de la cinasa del complejo de activación transcripcional de Notch ("NACK") y métodos para el uso de los mismos**

30 Prioridad:

06.02.2018 US 201862626870 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1951 NW 7th Avenue
Miami, FL 33136, US

72 Inventor/es:

CAPOBIANCO, ANTHONY, J.;
SCHURER, STEPHAN, C.;
ZHU, XIAOXIA y
KELLEY, TANYA, T.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 984 207 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la cinasa del complejo de activación transcripcional de Notch ("NACK") y métodos para el uso de los mismos

Declaración de financiación gubernamental

La presente invención se realizó con financiación gubernamental en virtud de la subvención número 1R01CA169805-01, otorgada por el National Cancer Institute National Institutes of Health. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención. La invención también se realizó con financiación en virtud de la subvención número 7BC01, otorgada por el Bankhead-Coley Cancer Research Program.

Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. n.º 62/626.870, presentada el 6 de febrero de 2018.

Incorporación por referencia del material presentado electrónicamente

Se incorpora por referencia en su totalidad un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por ordenador presentado simultáneamente con el presente documento e identificado de la siguiente manera: 51617_Seqlisting.txt; Tamaño: 12.976 bytes; Creado: 6 de febrero de 2019.

Antecedentes

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a inhibidores de la cinasa del complejo de activación de Notch ("NACK", por sus siglas en inglés), y a métodos para usar los inhibidores para tratar y prevenir enfermedades, tales como el cáncer.

Descripción de tecnología relacionada

La vía Notch, un sistema de señalización celular altamente conservado presente en la mayoría de los organismos multicelulares, se usa ampliamente en el desarrollo para determinar la especificación del destino celular y para equilibrar la capacidad proliferativa y el estado de diferenciación. Notch impulsa una respuesta celular dependiente del contexto iniciando y manteniendo una cascada transcripcional. Véanse Tamura *et al.* Curr Biol 5, 1416-23 (1995); Aster *et al.* J Biol Chem 272, 11336-43 (1997). Notch media en esta respuesta transcripcional dirigiendo la formación de un complejo central de activación transcripcional de Notch ("NTC", por sus siglas en inglés), que está compuesto por la proteína de unión al ADN CSL, el dominio intracelular de Notch ("NICD", por sus siglas en inglés) y la proteína coactivadora Mastermind ("MAML1"). Jeffries *et al.*, Mol Cell Biol 22, 3927-41 (2002); Nam *et al.*, Cell 124, 973-83 (2006); Kovall *et al.*, EMBO J 23, 3441-51 (2004). La activación de la señalización de Notch se inicia mediante la unión de los ligandos de Notch (de tipo Jagged y Delta) al receptor Notch transmembrana a través del contacto de célula a célula. Este evento desencadena la escisión de las proteínas receptoras Notch que pasan a través de escisiones secuenciales, lo que da como resultado la liberación del NICD activo de la membrana plasmática y la translocación de NICD al núcleo. Véase Ranganathan *et al.*, Nat Rev Cancer 11, 338-351 (2011); Kovall, Oncogene 27, 5099-5109 (2008).

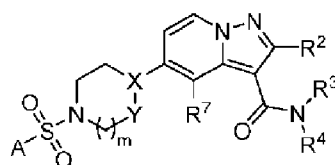
En el adulto, la vía Notch está restringida a pequeñas poblaciones de células progenitoras y madre de tejidos en regeneración, tales como el colon y el cerebro. Sin embargo, en muchos cánceres humanos, la vía Notch se reactiva. La pérdida de la regulación de la vía Notch es la base de muchos aspectos de la fisiología del cáncer, dependiendo del tipo de célula y el contexto. Se ha demostrado que la actividad aberrante de Notch desempeña una función en inicio y el mantenimiento del fenotipo neoplásico, además de desempeñar una función central en las células madre cancerosas, lo que puede ser la base de la metástasis y la resistencia a la terapia. Véase Ranganathan *et al.*, Nat Rev Cancer 11, 338-351 (2011).

Los compuestos actuales que regulan la vía Notch incluyen inhibidores de moléculas pequeñas que se dirigen a la γ -secretasa dependiente de presenilina, un complejo enzimático responsable de la escisión y activación de Notch inducida por ligando, y anticuerpos monoclonales que se dirigen y afectan a Notch-DSL. Véanse Takebe *et al.*, Pharmacol Ther 141, 140-9 (2014); Shih *et al.*, Cancer Res 67, 1879-82 (2007); Tiyanont *et al.*, J Mol Biol 425, 3192-204 (2013); Sharma *et al.*, Mol Cancer Ther 11, 77-86 (2012); Fischer *et al.*, Cancer Res 71, 1520-5 (2011); Berezovska *et al.*, J Neurochem 75, 583-93 (2000); De Kloe *et al.*, Methods Mol Biol 1187, 311-22 (2014). Ambos enfoques actúan en la parte superior de la cascada de señalización de Notch para bloquear la producción de NICD dependiente del ligando. Además, se sabe que la γ -secretasa tiene muchos sustratos además de la vía Notch, lo que podría contribuir a efectos no deseados. Véase Shih *et al.*, Cancer Res 67, 1879-82 (2007). El documento WO2016154255 divulga azoles sustituidos como inhibidores del complejo de activación transcripcional de Notch.

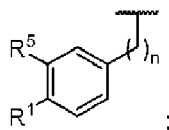
Por lo tanto, existe la necesidad de inhibidores que se dirijan directamente al complejo de transcripción de Notch (véanse Astudillo *et al.*, Cancer Research 76, 3593-3603 (2016); Moellering *et al.*, Nature 462, 182-8 (2009)), ya sea bloqueando el ensamblaje del complejo de activación transcripcional de Notch o inhibiendo la activación de la transcripción mediada por Notch.

Sumario de la divulgación

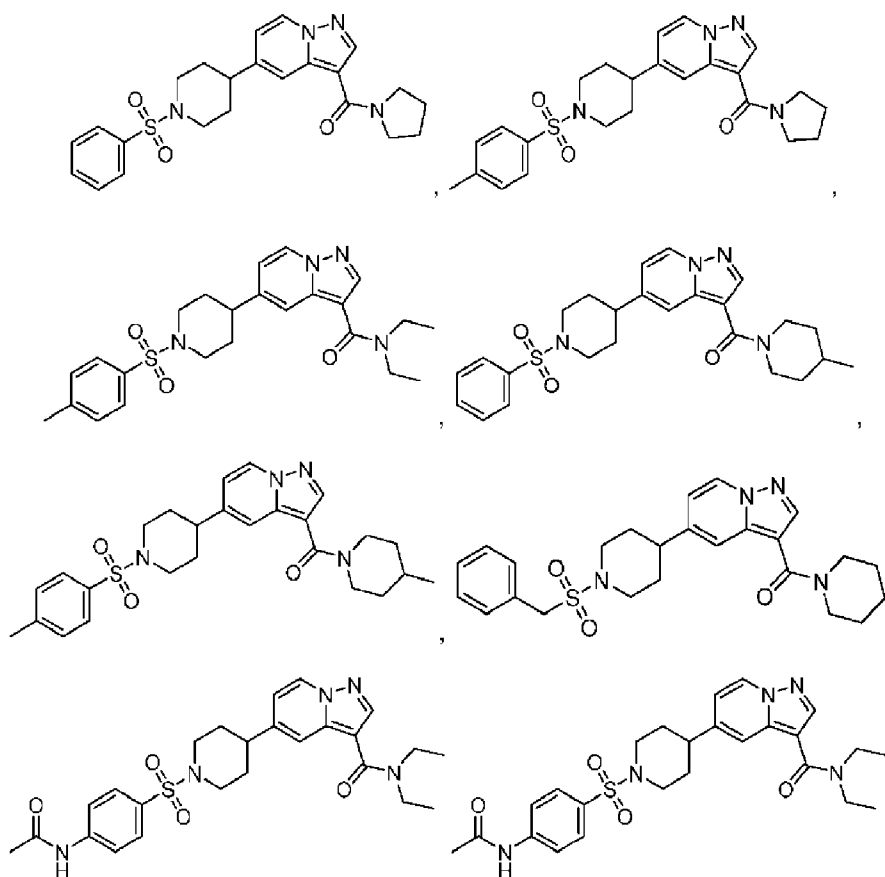
En un aspecto, la divulgación proporciona compuestos de Fórmula (Ia), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



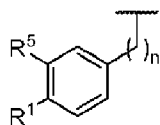
(Ia); en donde A es alquilo C₁₋₄ o



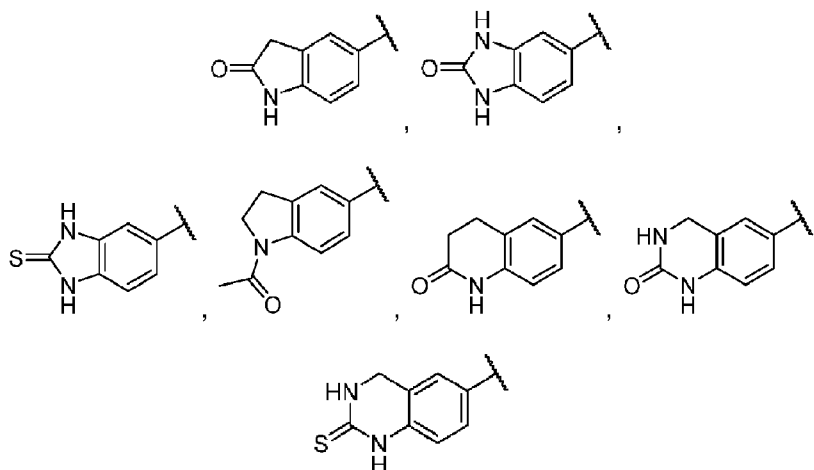
X es CH o N; Y es CH₂ o N, y cuando X es N, entonces Y es CH₂; m es 0 o 1, y cuando m es 1, entonces Y es CH₂; n es 0 o 1; R¹ es H, alquilo C₁₋₆, alquilenio C₀₋₆-C(=O)R⁶, halo, ciano, arilo, arioxi, amino, alquilenio C₀₋₃-amido, carbamilo, S-tiocarbamilo o ureido; R² es H, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ o heteroarilo; cada R³ y R⁴ es independientemente H, alquilo C₁₋₆ o aralquilo C₁₋₃, o R³ y R⁴ y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 3-6 miembros que comprende opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S; R⁵ es H, o R¹ y R⁵ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de N, O y S; R⁶ es OH, alquilo C₁₋₆ u Oalquilo C₁₋₆; y R⁷ es H, halo o amino; con la condición de que el compuesto no sea



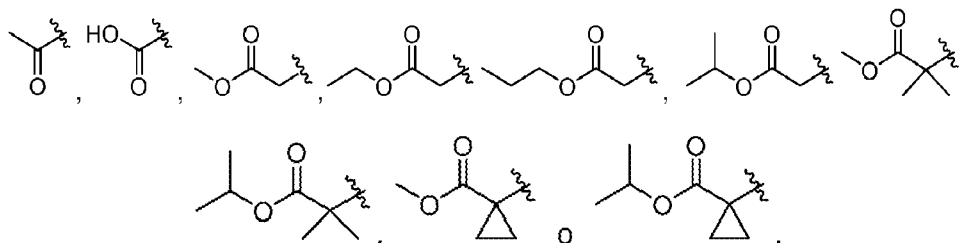
En algunas realizaciones, A es metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, isobutilo o t-butilo. En diversas realizaciones, A es metilo. En algunos casos, A es



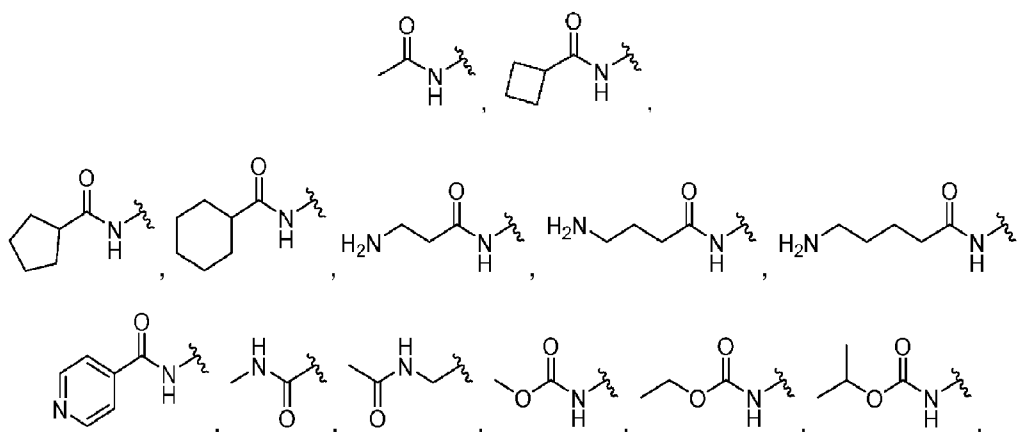
En diversos casos, n es 0. En algunas realizaciones, n es 1. En diversas realizaciones, R¹ y R⁵ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de N, O y S. En algunos casos, A se selecciona del grupo que consiste en

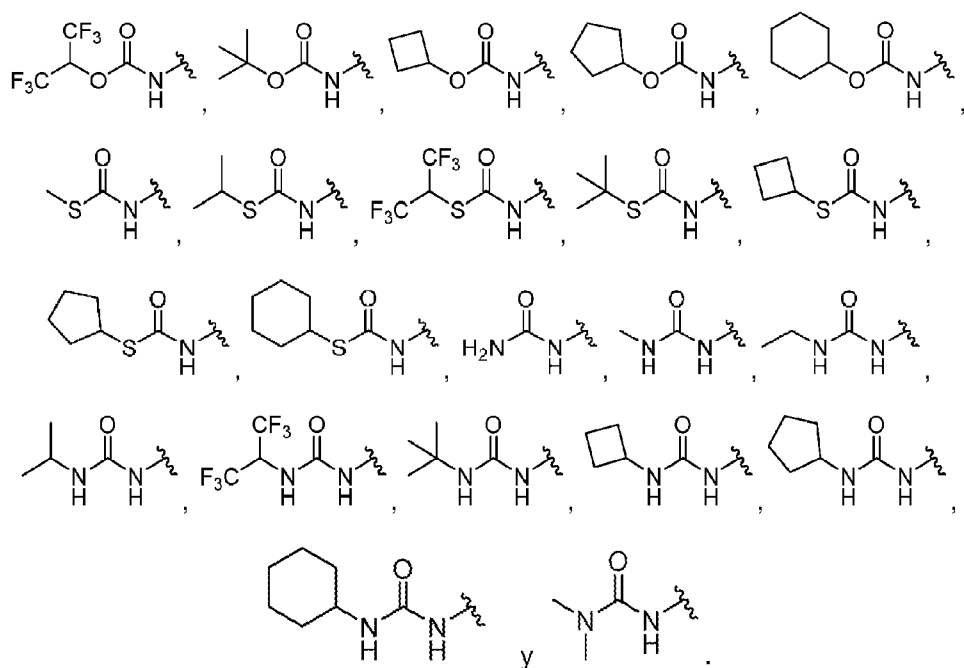


En diversos casos, R⁵ es H. En algunas realizaciones, R¹ es H. En diversas realizaciones, R¹ es alquilo C₁₋₆. En algunos casos, R¹ es metilo, etilo, fluorometilo o trifluorometilo. En diversos casos, R¹ es alqueno C₀₋₆-C(=O)R⁶. En algunas realizaciones, R¹ es

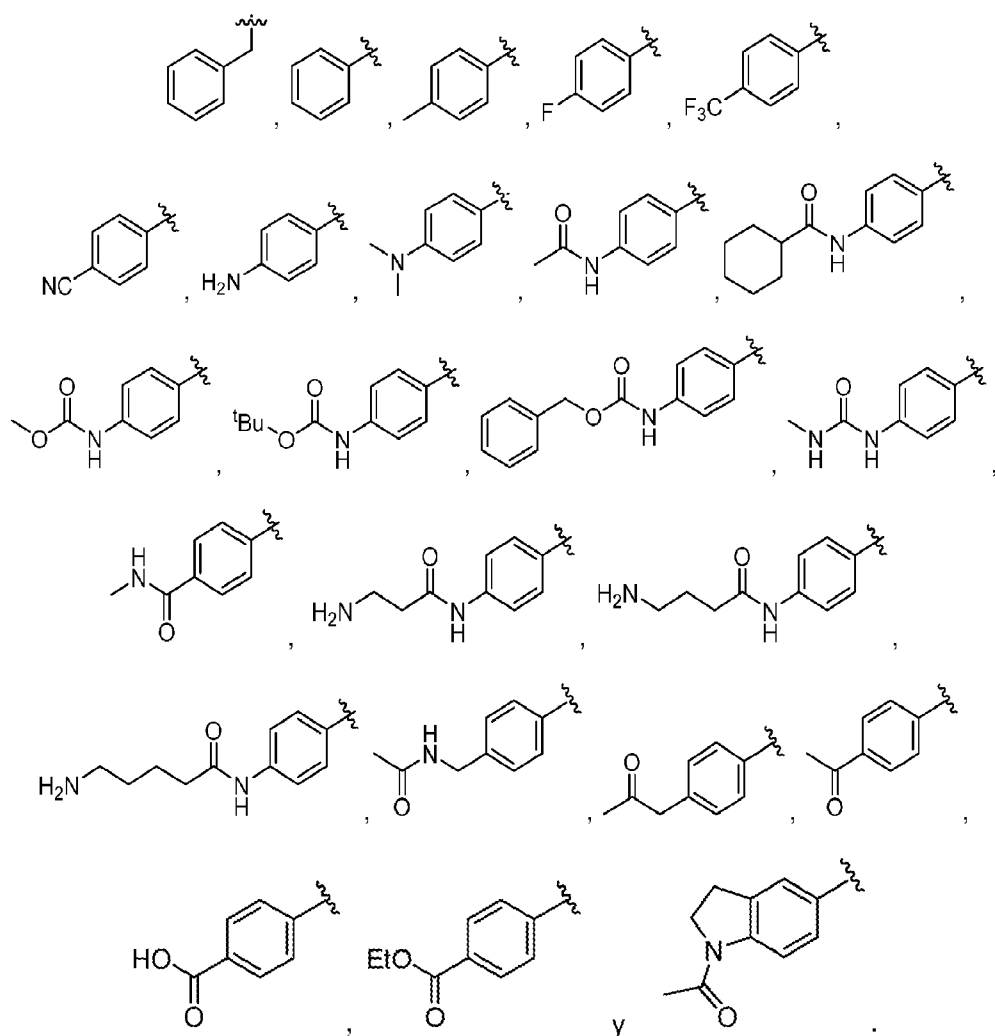


En diversas realizaciones, R¹ es halo. En algunos casos, R¹ es F. En diversos casos, R¹ es ciano o arilo. En algunas realizaciones, R¹ es CN u -OPh. En diversas realizaciones, R¹ es amino. En algunos casos, R¹ es -NH₂, -N(CH₃)₂ o -NH₂Ph. En diversos casos, R¹ es alqueno C₀₋₃-amido, carbamilo, S-tiocarbamilo o ureido. En algunas realizaciones, R¹ se selecciona del grupo que consiste en





En diversas realizaciones, A se selecciona del grupo que consiste en CH₃,

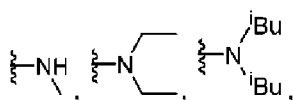


En algunos casos, X es CH. En diversos casos, X es N. En algunas realizaciones, Y es CH₂. En diversas realizaciones, Y es N. En algunos casos, m es 0. En diversos casos, m es 1.

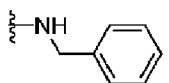
- 5 En algunas realizaciones, R² es H. En diversas realizaciones, R² es Br o Cl. En algunos casos, R² es CH₃, CF₃, CH₂OH o CH₂OCH₃. En diversos casos, R² es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En algunas realizaciones, R² es 3-furanilo. En diversas realizaciones, R² se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CF₃ y ciclopropilo.
- 10 En algunos casos, cada uno de R³ y R⁴ es independientemente H, alquilo C₁₋₆ o aralquilo C₁₋₃. En diversos casos, cada uno de R³ y R⁴ es independientemente H, CH₃, CH₂CH₃, ^tBu o CH₂Ph. En algunas realizaciones,



- 15 se selecciona del grupo que consiste en



- 20 y



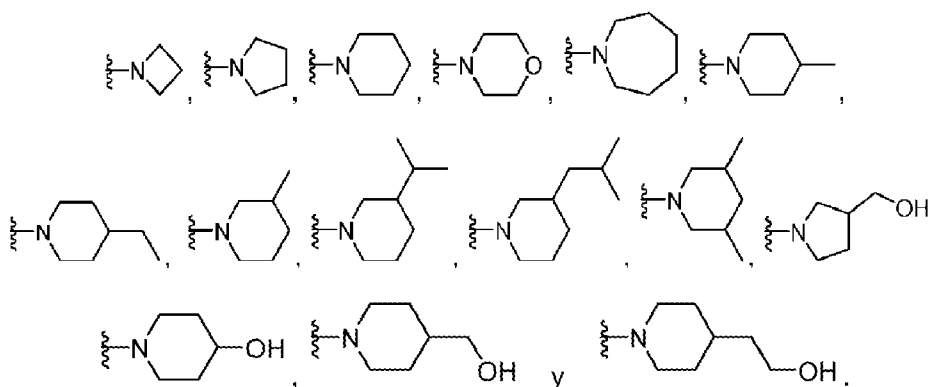
En diversas realizaciones, R³ y R⁴ y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 5-6 miembros. En algunos casos,

- 25



se selecciona del grupo que consiste en

- 30

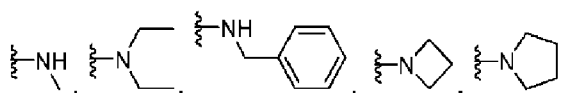


- 35

En diversos casos,



- 40 se selecciona del grupo que consiste en



5 En algunos casos, se proporciona en el presente documento un compuesto enumerado en la Tabla A, la Tabla B, la Tabla C o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

10 tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción debe interpretarse como referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

15 Notch ("NACK") en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto divulgado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para inhibir NACK. En algunas realizaciones, el compuesto o sal inhibe el reclutamiento de NACK en el complejo transcripcional de Notch ("NTC"). En diversas realizaciones, el contacto comprende la administración a un paciente que lo necesita. En diversos casos, el paciente padece una enfermedad asociada a la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch. En algunas realizaciones, la enfermedad es tetralogía de Fallot ("TOF", por sus siglas en inglés) o síndrome de Alagille. En algunos casos, la enfermedad es cáncer. En algunos casos, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T ("T-ALL"), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B ("B-ALL"), cáncer de mama, meduloblastoma, cáncer colorrectal, carcinoma de pulmón no microcítico ("NSCLC"), melanoma, ateriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía ("CADASIL"), leucemia linfocítica crónica ("CLL"), carcinoma hepatocelular ("HCC"), leucemia mielomonocítica ("CMML"), adenocarcinoma ductal pancreático ("PDAC"), carcinoma escamocelular de cabeza y cuello ("HNSCC"), adenocarcinoma de células renales y fibrosarcoma. En algunos casos, la enfermedad es esclerosis múltiple ("EM").

30 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad cinasa, la actividad ATPasa o ambas en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto descrito en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo), en una cantidad eficaz para inhibe la actividad cinasa y/o ATPasa en la célula.

35 Otros aspectos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos. Si bien los compuestos y métodos divulgados en el presente documento son susceptibles de realizaciones en diversas formas, la descripción a continuación incluye realizaciones específicas en el entendido de que la divulgación es ilustrativa y no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 demuestra que NACK es una nueva diana terapéutica en la vía Notch. La figura 1A muestra el ARNm de muestras clínicas procedentes de EAC primario resecado quirúrgicamente (tejido tumoral en comparación con su tejido normal correspondiente), y demuestra que los niveles de ARNm de NACK y Notch1 están elevados en la mayoría de los tejidos tumorales en comparación con sus correspondientes tejidos normales. La figura 1B muestra que se observan un alto nivel de NACK y expresión de Notch1 activado en muestras de adenocarcinoma de esófago sin tratamiento previo con quimioterapia procedentes de biopsias por ultrasonido endoscópico ("EUS", por sus siglas en inglés). La figura 1C muestra la expresión de NACK en líneas celulares de EAC (OE33, OE19, Flo-1 y JH-1) por qPCR. La figura 1D muestra que la atenuación de NACK fue verificada mediante Q-PCR. La figura 1E muestra que la atenuación de NACK fue verificada mediante transferencia de Western. La figura 1F muestra que la atenuación de NACK en células de EAC (OE33, OE19 y Flo-1) condujo a una inhibición drástica del potencial clonogénico de estas células.

La figura 2 muestra el modelado de homología y la simulación por MD del dominio cinasa de NACK. La figura 2A es una representación del modelo tridimensional para la secuencia del dominio cinasa de NACK usando el método IntFold, en comparación con el dominio cinasa de CASK (código PDB: 3C0I) y PLK3 (PDB: 4B6L). La imagen se mostró usando PyMol. La figura 2B muestra comparaciones entre los motivos clave de NACK, CASK y PLK3. La figura 2C muestra un gráfico que muestra los niveles de RMSD hasta ~0,1 nm, lo que indica que la estructura es muy estable. La figura 2D es una RMSF que muestra las regiones dinámicas de NACK (Cys1049-Asp1084 y Cys1154-Leu1205). La figura 2E representa la estructura más representativa de NACK.

La figura 3 muestra una simulación por MD de NACK acoplado con ATP que revela el dominio catalítico de NACK. La figura 3A es un gráfico de RMSD que demuestra que, durante la simulación, la estructura es muy estable. La figura 3B muestra que durante los últimos 50 ns de ejecución, el radio de giro de NACK mantiene un valor relativamente estable de Rg. La figura 3C es un gráfico que muestra que se formaron aproximadamente 5 enlaces de hidrógeno entre NACK y ATP durante una simulación de 50 a 100 ns. La figura 3D representa la estructura más representativa de NACK y ATP durante los últimos 50 ns de simulación. La figura 3E representa los residuos de NACK importantes para la unión de ATP.

La figura 4 demuestra que NACK se une al complejo de transcripción de Notch de manera dependiente de ATP. La figura 4A muestra mutaciones de NACK (K1002 o C979) en ratones. NACK bloquea el reclutamiento de NACK en el complejo Notch. La figura 4B muestra que se requiere la hidrólisis de ATP y GTP para el reclutamiento de NACK. La figura 4C muestra la unión entre NACK y el análogo de ATP AMP-PNP usando resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés). La figura 4D muestra que se detectaron cantidades equivalentes de ADP y Pi mediante el ensayo de cinasa *in vitro* ADP-Glo y el ensayo colorimétrico de fosfato después de incubar NACK con ATP. La figura 4E muestra que el mutante K1002A "catalíticamente inactivo" de NACK no logró hidrolizar ATP en ADP en el ensayo ADP-Glo.

La figura 5 muestra un ensayo basado en células para cribar inhibidores que inhiben selectivamente la viabilidad de líneas celulares dependientes de Notch/NACK. La figura 5A muestra que la atenuación de NACK afecta a la viabilidad de la línea celular OE33, pero no a HC11. La figura 5B muestra que los compuestos descritos en el presente documento inhiben selectivamente la viabilidad de la línea celular dependiente de Notch/NACK. La figura 5C muestra un resumen del ensayo de formación de colonias.

La figura 6 muestra ensayos bioquímicos *in vitro* para cribar los inhibidores de NACK (iNACK) descritos en el presente documento. La figura 6A muestra que los inhibidores de NACK descritos en el presente documento pueden inhibir selectivamente el reclutamiento de NACK en el complejo de transcripción de Notch. La figura 6B muestra que los inhibidores de NACK descritos en el presente documento provocan una regulación negativa de la actividad de transcripción de Notch. La figura 6C muestra la CE_{50} de Z271-0326 y Z271-0191 estimada mediante ensayo de valoración de formación de colonias.

La figura 7 muestra que los inhibidores de NACK descritos en el presente documento bloquean la formación de esferas secundarias. La figura 7A muestra que los inhibidores de NACK descritos en el presente documento pueden atenuar la formación de esferas secundarias en la línea celular OE33. La figura 7B muestra que el tratamiento de las esferas de OE33 con Z271-0326 afecta a la transcripción de los genes diana de Notch. La figura 7C muestra que un inhibidor de NACK puede atenuar la formación de esferas secundarias en HC11/N1ICD. La figura 7D muestra que el tratamiento de las esferas de HC11/N1ICD con Z271-0326 provoca una disminución en la expresión del gen HES1, así como varios otros genes marcadores de células madre. Las figuras muestran que las células HC11 son insensibles a la inhibición de Notch/NACK. Las células HC11 no pueden formar esferas por sí mismas, pero Notch las transforma de manera eficiente para formar esferas y son tumorigénicas en ratones. Las células HC11 transformadas con Notch son sensibles a la inhibición de NACK.

La figura 8 muestra que el inhibidor de NACK Z271-0326 bloquea la unión del complejo de transcripción de Notch al promotor Hes1. La figura 8A muestra los resultados de Q-PCR y transferencia de Western de la atenuación de NACK en líneas celulares estables OE33 que albergan construcciones de ARN en horquilla corta (ARNhc) inducible por doxiciclina (DOX). La figura 8B representa experimentos de ChIP para medir las ocupaciones de Notch1, NACK y Pol II activado en el promotor HES1 después del agotamiento de NACK en el clon 1A3. La figura 8C representa experimentos de ChIP para medir las ocupaciones de Notch 1, NACK y Pol II activado en el promotor HES1 después del tratamiento farmacológico en la línea celular OE33.

Figura 9. Demuestra que el inhibidor de NACK Z271-0326 induce apoptosis y senescencia celular. La figura 9A muestra que Z271-0326 induce apoptosis celular en la línea celular OE33. La figura 9B muestra que la tinción de β -galactosidasa de senescencia se midió después del tratamiento de las células OE33 con los fármacos o con DMSO (vehículo) durante 3 semanas.

La figura 10 muestra el análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la unión de Z271-0326 a NACK. La figura 10A representa el análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de Z271-0326 y la unión de AMP-PNP a la proteína NACK marcada con GST (GST como control). La figura 10B muestra interacciones entre Z271-0326 y NACK. La figura 10C muestra los residuos importantes responsables de la unión de Z271-0326. La figura 10D muestra que las mutaciones de NACK (Y999F o Q1024E) en NACK de ratón no lograron abolir la unión de NACK al complejo Notch en la condición de añadir Z271-0326.

La figura 11 demuestra que Z271-0326 inhibe el crecimiento tumoral de EAC47 PDX. La figura 11A muestra el crecimiento tumoral de EAC47 PDX después del tratamiento con vehículo (DMSO), DAPT o Z271-0326 durante 20 días. La figura 11B muestra el peso de los tumores recogidos al finalizar. La figura 11C muestra los tumores recogidos al finalizar. La figura 11D muestra los pesos corporales de EAC47 PDX durante el tratamiento. La

figura 11E muestra imágenes representativas de EAC47 PDX tratado con DMSO, DAPT y Z271-0326 con tinción con Ki67.

La figura 12 muestra el perfil farmacocinético de Z271-0326 en un ratón.

La figura 13 muestra el perfil de q-PCR de los análogos del inhibidor de NACK (7W, 7H, 7M). En comparación con el inhibidor de NACK Z271-0326 (figura 13A), el compuesto 7W no muestra ningún efecto en la regulación negativa de los genes diana de Notch (figura 13B). El compuesto 7H tuvo el mejor rendimiento en la regulación negativa de los genes diana de Notch, incluso mejor que Z271-0326, como se observa en los resultados de qPCR (figura 13C). El compuesto 7M también puede regular negativamente los genes diana de Notch, pero no tan bien como el compuesto 7H (figura 13D).

La figura 14A y la figura 14B muestran la inhibición de células OE33 por compuestos divulgados en el presente documento como número de colonias (figura 14A) o colonias con respecto a un control (figura 14B).

La figura 15 muestra la inhibición de células OE33 por compuestos divulgados en el presente documento con respecto al número de colonias tratadas con DMSO.

La figura 16 muestra el perfil de Q-PCR de análogos de inhibidores de NACK para la expresión de varios genes.

Las figuras 17A-17C muestran los resultados del ensayo de cinasa ADP-GLO usando Z271-0326 o inhibidores de las cinasas correspondientes: Ensayo MAP4K5 (figura 17A), ensayo de cinasa LCK (figura 17B) y ensayo de cinasa TNIK (figura 17C).

La figura 18 muestra los valores de CE₅₀ de varios compuestos divulgados en el presente documento según se estiman mediante un ensayo de valoración de formación de colonias en una línea celular OE33.

La figura 19 muestra los resultados de un ensayo de cinasa LCK usando Z271-0326, un inhibidor de cinasa específico, y compuestos divulgados en el presente documento a razón de 10 µM, normalizados con respecto a DMSO.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan compuestos que inhiben la cinasa del complejo de activación transcripcional de Notch ("NACK") y métodos para usar los compuestos para tratar y prevenir enfermedades asociadas con el complejo de activación transcripcional de Notch ("NTC"), tales como el cáncer. La "cinasa del complejo de activación de Notch" o "NACK" generalmente se refiere a una proteína asociada a Notch que funciona como coactivador de la actividad transcripcional de Notch. Las proteínas NACK pueden incluir una proteína que tiene una SEQ ID NO: 1; pseudocinasa activadora de cinasa relacionada con PEAK1; Sugen cinasa 223; Pragma, proteína efectora RND2; SGK223; tirosina-proteína cinasa SgK223; homólogo de Pragma de rata de Rnd2; EC 2.7.10.2; PRAGMINA; y PEAK2.

Los compuestos y métodos proporcionados en el presente documento pueden complementar las estrategias existentes proporcionando rescate a la resistencia de las terapias con mAb o GSI, lo que da como resultado una profundidad terapéutica en el ataque a una vía Notch activada. Al aprovechar múltiples dianas dentro de una vía de cáncer particular, pueden producirse resultados superiores en personas que padecen cáncer.

NACK actúa como un coactivador transcripcional de Notch y un regulador esencial de la tumorigénesis y el desarrollo mediados por Notch. Véase Weaver *et al.*, Cancer Research 74, 4741-4751 (2014). NACK funciona de manera dependiente de ATP para unirse al complejo de transcripción de Notch y activar la transcripción mediada por Notch. Debido al papel destacado de NACK en la vía Notch, puede actuar como una diana farmacológica adecuada.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, los compuestos descritos en el presente documento pueden interrumpir el reclutamiento de NACK en el complejo de transcripción de Notch, que inhibe la cascada transcripcional mediada por Notch y suprime el crecimiento tumoral en los pacientes. En algunos casos, los compuestos divulgados en el presente documento son inhibidores específicos de las células dependientes de Notch y, por lo tanto, no inhiben ni destruyen las células que no dependen de Notch.

La vía de señalización de Notch es una diana particularmente atractiva para el desarrollo de inhibidores. Antes de la activación y escisión del ligando, el dominio intracelular de Notch ("NICD") está unido a la membrana celular y, por lo tanto, es accesible a inhibidores potenciales. Además, el NTC se recicla constantemente, por lo que requiere una reforma constante de la cromatina para el mantenimiento de la cascada transcripcional de Notch que impulsa el fenotipo neoplásico. Por lo tanto, existe una amplia oportunidad para que una molécula pequeña se dirija a las superficies de interacción expuestas en los componentes de NTC y prevenga la formación de complejos.

En diversos casos, los compuestos de la divulgación pueden inhibir el reclutamiento de NACK en el NTC en

aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % o más del control positivo. En algunas realizaciones, los compuestos de la divulgación pueden inhibir el reclutamiento en aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % o más del control positivo. Por ejemplo, los compuestos divulgados en el presente documento pueden inhibir el reclutamiento en aproximadamente el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más del control positivo. Además, los compuestos divulgados en el presente documento pueden inhibir NACK con una CI_{50} de aproximadamente 5 μM o menos, o aproximadamente 4 μM o menos, o aproximadamente 3 μM o menos, o aproximadamente 2 μM o menos, o aproximadamente 1 μM o menos, o aproximadamente 0,6 μM o menos, o aproximadamente 0,5 μM o menos, o aproximadamente 0,4 μM o menos, o aproximadamente 0,3 μM o menos, o aproximadamente 0,2 μM o menos, o aproximadamente 0,1 μM o menos, o aproximadamente 0,05 μM o menos. En algunas realizaciones, los compuestos de la divulgación pueden inhibir NACK con una CI_{50} de aproximadamente 1 μM o menos, o aproximadamente 0,6 μM o menos, o aproximadamente 0,5 μM o menos, o aproximadamente 0,4 μM o menos, o aproximadamente 0,3 μM o menos, o aproximadamente 0,2 μM o menos, o aproximadamente 0,1 μM o menos, o aproximadamente 0,05 μM o menos. En algunos casos, los compuestos de la divulgación pueden inhibir NACK con una CI_{50} de aproximadamente 0,5 μM o menos, o aproximadamente 0,4 μM o menos, o aproximadamente 0,3 μM o menos, o aproximadamente 0,2 μM o menos, o aproximadamente 0,1 μM o menos, o aproximadamente 0,05 μM o menos. Por ejemplo, los compuestos de la divulgación pueden inhibir NACK con una CI_{50} de aproximadamente 0,2 μM o menos, o aproximadamente 0,19 μM o menos, o aproximadamente 0,18 μM o menos, o aproximadamente 0,17 μM o menos, o aproximadamente 0,16 μM o menos, o aproximadamente 0,15 μM o menos, o aproximadamente 0,14 μM o menos, o aproximadamente 0,13 μM o menos, o aproximadamente 0,12 μM o menos, o aproximadamente 0,11 μM o menos, o aproximadamente 0,10 μM o menos, o aproximadamente 0,09 μM o menos, o aproximadamente 0,08 μM o menos, o aproximadamente 0,07 μM o menos, o aproximadamente 0,06 μM o menos, o aproximadamente 0,05 μM o menos. Los compuestos descritos en el presente documento pueden inhibir NACK al interrumpir el reclutamiento de NACK en el NTC.

Los compuestos de la divulgación tienen varias propiedades y efectos ventajosos. Los compuestos pueden, por ejemplo: (1) interrumpir selectivamente el reclutamiento de NACK en el NTC con CI_{50} en el intervalo micromolar bajo; (2) provocar una regulación negativa de la actividad de transcripción de Notch; (3) bloquear la unión del complejo de transcripción de Notch al promotor Hes1; (4) inducir la apoptosis y la senescencia celular; y/o (5) inhibir el crecimiento tumoral.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo saturados de cadena lineal y ramificada que contienen de uno a treinta átomos de carbono, por ejemplo, de uno a veinte átomos de carbono, o de uno a diez átomos de carbono. El término C_n significa que el grupo alquilo tiene "n" átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C_4 se refiere a un grupo alquilo que tiene 4 átomos de carbono. Alquilo C_1 - C_7 se refiere a un grupo alquilo que tiene un número de átomos de carbono que abarca todo el intervalo (es decir, de 1 a 7 átomos de carbono), así como todos los subgrupos (por ejemplo, 1-6, 2-7, 1-5, 3-6, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono). Los ejemplos no limitantes de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, sec-butil (2-metilpropilo), isobutil (2,2-dimetiletilo), *t*-butil (1,1-dimetiletilo), 3,3-dimetilpentilo y 2-etilhexilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo alquilo puede ser un grupo alquilo sin sustituir o un grupo alquilo sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilenos" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Por ejemplo, el término "alquilenos-arilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo. El término C_n significa que el grupo alquilenos tiene "n" átomos de carbono. Por ejemplo, alquilenos C_{1-6} se refiere a un grupo alquilenos que tiene un número de átomos de carbono que abarca todo el intervalo, así como todos los subgrupos, como se ha descrito previamente para los grupos "alquilo". A menos que se indique lo contrario, el propio grupo alquilenos puede estar sustituido o sin sustituir.

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico alifático que contiene de tres a ocho átomos de carbono (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono). El término C_n significa que el grupo cicloalquilo tiene "n" átomos de carbono. Por ejemplo, cicloalquilo C_5 se refiere a un grupo cicloalquilo que tiene 5 átomos de carbono en el anillo. Cicloalquilo C_5 - C_8 se refiere a grupos cicloalquilo que tienen un número de átomos de carbono que abarca todo el intervalo (es decir, de 5 a 8 átomos de carbono), así como todos los subgrupos (por ejemplo, 5-6, 6-8, 7-8, 5-7, 5, 6, 7 y 8 átomos de carbono). Los ejemplos no limitantes de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo cicloalquilo puede ser un grupo cicloalquilo sin sustituir o un grupo cicloalquilo sustituido. Los grupos cicloalquilo descritos en el presente documento pueden aislarse, compartir un átomo de carbono con otro grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo, o condensarse a otro grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo y/o un grupo heteroarilo. Los grupos cicloalquilo pueden ser sistemas anulares saturados o parcialmente insaturados opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, de uno a tres grupos, alquilo seleccionado independientemente, alquilenos-OH, $C(O)NH_2$, NH_2 , oxo (=O), arilo, haloalquilo, halo y OH.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a sistemas anulares aromáticos carbocíclicos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos condensados y tricíclicos condensados). Los ejemplos de grupos

arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, fenantrenilo, bifenilenilo, indanilo, indenilo, antracenilo y fluorenilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo arilo puede ser un grupo arilo sin sustituir o un grupo arilo sustituido. A menos que se indique lo contrario, un grupo arilo puede estar condensado a un grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo.

5

Como se usa en el presente documento, el término "ariloxi" se refiere a -O-arilo.

Como se usa en el presente documento, el término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con un resto arilo. El término C_n indica n átomos de carbono del grupo alquilo del aralquilo.

10

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a sistemas anulares aromáticos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos condensados y tricíclicos condensados), en donde de uno a cuatro átomos de anillo se seleccionan de oxígeno, nitrógeno o azufre, y los átomos del anillo restantes son carbono, estando dicho sistema anular unido al resto de la molécula por cualquiera de los átomos del anillo. Los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, furanilo, tiofenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoxazolilo, bencimidazolilo y benzotiazolilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo heteroarilo puede ser un grupo heteroarilo sin sustituir o un grupo heteroarilo sustituido.

15

Como se usa en el presente documento, el término "halo" se refiere a un grupo flúor, cloro, bromo o yodo. El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con al menos un halógeno.

20

Como se usa en el presente documento, el término "alcóxilo" se refiere a -OR, en donde "R" es un radical.

Como se usa en el presente documento, el término "amino" se refiere a un grupo -NH₂ o -NH-, en donde cada hidrógeno en cada Fórmula se puede reemplazar por un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo.

25

Como se usa en el presente documento, el término "amido" se refiere a un grupo amino que está sustituido con un resto carbonilo (por ejemplo, -NRC(=O)- o -C(=O)NR-), en donde R es un sustituyente en el nitrógeno (por ejemplo, alquilo o H).

30

Como se usa en el presente documento, el término "carbamilo" se refiere al siguiente grupo funcional -NR(C=O)O- u -OC(=O)-NR-, en donde R es un sustituyente en el nitrógeno (por ejemplo, alquilo o H).

35

Como se usa en el presente documento, el término "S-tiocarbamilo" se refiere al siguiente grupo funcional -SC(=O)NR- o -NRC(=O)S-, en donde R es un sustituyente en el átomo de nitrógeno (por ejemplo, H o alquilo).

Como se usa en el presente documento, el término "ureido" se refiere al siguiente grupo funcional -NR(C=O)NR-, en donde cada R es un sustituyente en el nitrógeno (por ejemplo, alquilo o H).

40

Como se usa en el presente documento, el término "sustituido", cuando se usa para modificar un grupo funcional químico, se refiere a la sustitución de al menos un radical hidrógeno en el grupo funcional con un sustituyente. Los sustituyentes pueden incluir, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, heterocicloalquilo, tioéter, politioéter, arilo, heteroarilo, hidroxilo, oxi, alcoxi, heteroalcoxi, ariloxi, heteroariloxi, éster, tioéster, carboxi, ciano, nitro, amino, amido, acetamida y halo (por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo). Cuando un grupo funcional químico incluye más de un sustituyente, los sustituyentes pueden estar unidos al mismo átomo de carbono o a dos o más átomos de carbono diferentes. Un grupo funcional químico sustituido puede incluir por sí mismo uno o más sustituyentes.

45

50

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto o combinación de compuestos terapéuticamente activos (por ejemplo, un inhibidor descrito en el presente documento, o una combinación de inhibidores) que mejora, atenúa o elimina uno o más síntomas de una enfermedad o afección particular (por ejemplo, un cáncer), o previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o afección particular.

55

Como se usan en el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" pueden usarse indistintamente y se refieren a animales, tales como perros, gatos, vacas, caballos y ovejas (es decir, animales no humanos) y seres humanos. Los pacientes particulares son mamíferos (por ejemplo, seres humanos). El término paciente incluye hombres y mujeres.

60

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que la sustancia a la que se hace referencia, tal como un compuesto de la presente invención, o una formulación que contiene el compuesto, o un excipiente particular, son seguros y adecuados para la administración a un sujeto o paciente. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio o principios activos y que no es tóxico para el hospedador al que se administra.

65

Como se usa en el presente documento, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" y similares, incluyen tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico) y paliativo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "excipiente" significa cualquier aditivo, portador, diluyente, adyuvante u otro ingrediente farmacéuticamente aceptable, distinto del principio farmacéutico activo (API, por sus siglas en inglés).

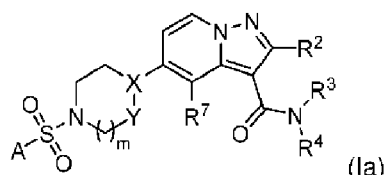
10 Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo de activación transcripcional de Notch" ("NTC") se refiere a un complejo de tres proteínas, la proteína de unión al ADN CSL, el dominio intracelular de Notch ("NICD") y la proteína coactivadora Mastermind ("MAML1), que funciona para activar la transcripción de genes diana.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch" o "pérdida de regulación del NTC" se refiere a una anomalía en la capacidad reguladora del NTC, que da como resultado la reactivación de la transcripción génica.

Inhibidores de la cinasa del complejo de activación transcripcional de Notch ("NACK")

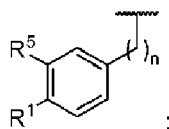
20 En el presente documento se divulgan compuestos que pueden inhibir la cinasa del complejo de activación de Notch ("NACK").

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en donde:

A es alquilo C₁₋₄ o



X es CH o N;

Y es CH₂ o N, y cuando X es N, entonces Y es CH₂;

m es 0 o 1, y cuando m es 1, entonces Y es CH₂;

n es 0 o 1;

R¹ es H, alquilo C₁₋₆, alquileo C₀₋₆-C(=O)R⁶, halo, ciano, ariloxi, amino, alquileo C₀₋₃-amido, carbamilo, S-tiocarbamilo o ureido;

R² es H, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ o heteroarilo;

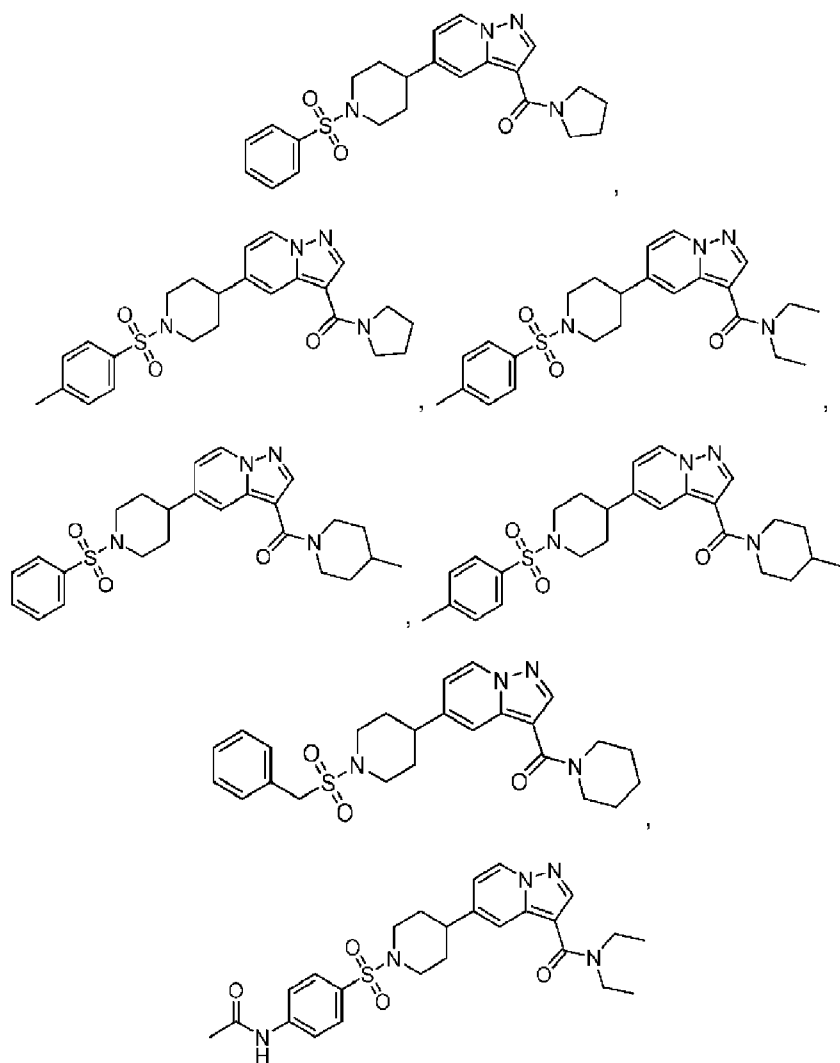
cada R³ y R⁴ es independientemente H, alquilo C₁₋₆ o aralquilo C₁₋₃, o R³ y R⁴ y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 3-6 miembros que comprende opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S;

R⁵ es H, o R¹ y R⁵ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de N, O y S;

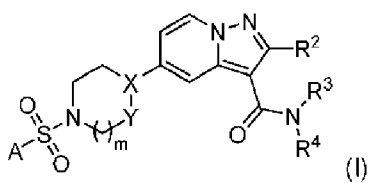
R⁶ es OH, alquilo C₁₋₆ u Oalquilo C₁₋₆;

R⁷ es H, halo o amino;

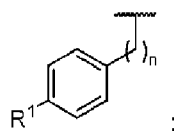
con la condición de que el compuesto no sea



En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



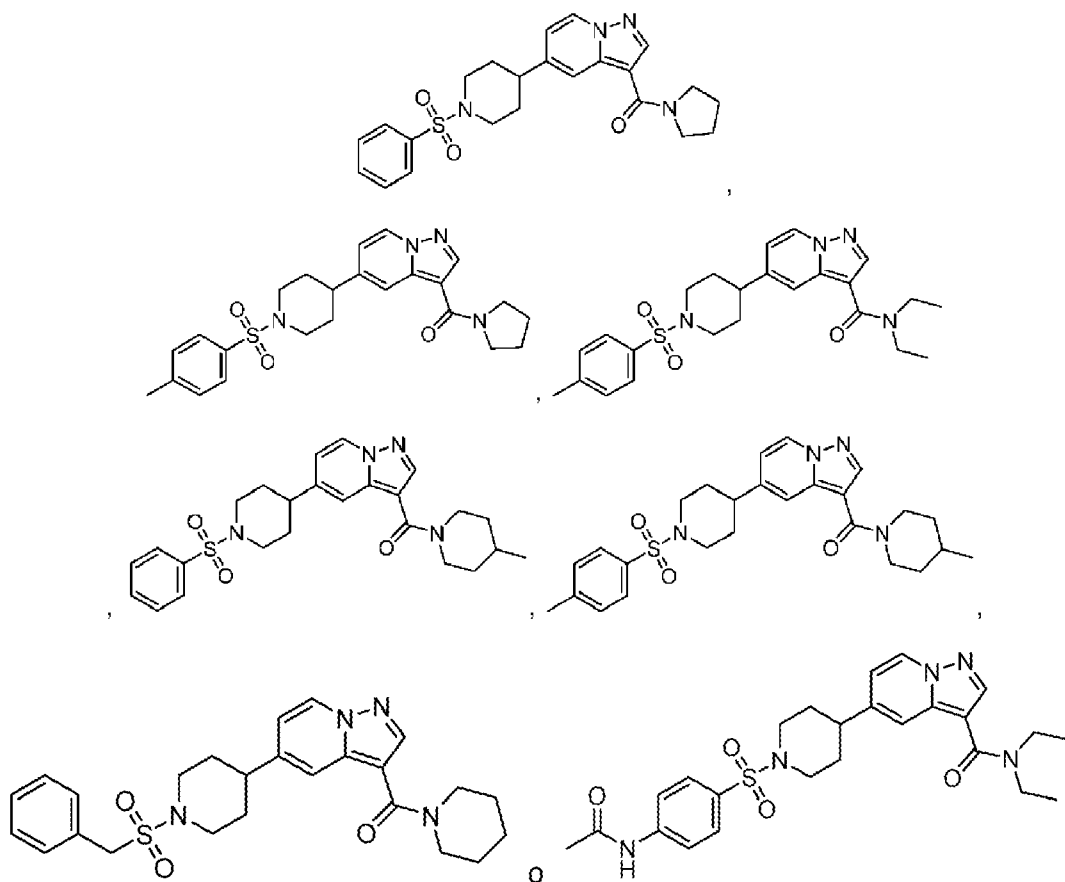
en donde A es alquilo C_{1-4} o



X es CH o N; Y es CH_2 o N, y cuando X es N, entonces Y es CH_2 ; m es 0 o 1, y cuando m es 1, entonces Y es CH_2 ; n es 0 o 1; R^1 es H, alquilo C_{1-6} , halo, ciano, arilo, amino, amido, carbamilo o ureido; R^2 es H, halo, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} o heteroarilo; y cada R^3 y R^4 es independientemente H, alquilo C_{1-6} o aralquilo C_{1-3} , o R^3 y R^4 y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 5-6 miembros;

con la condición de que el compuesto no sea

5

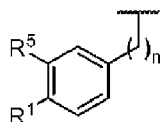


10

En algunas realizaciones, A es alquilo C₁₋₄. Los grupos A adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, isobutilo o t-butilo. En algunos casos, A es metilo. En algunas realizaciones, A no es alquilo C₁₋₄.

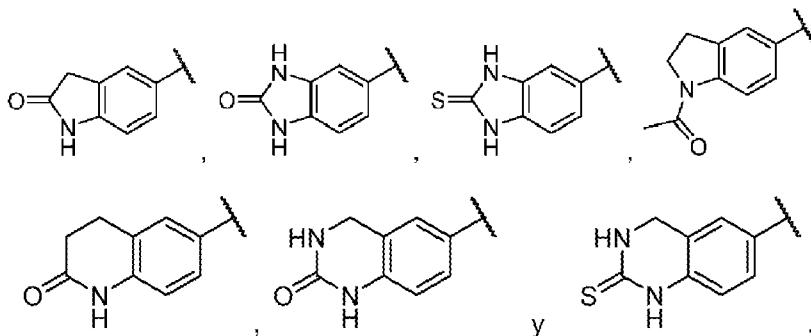
En algunas realizaciones, A es

15



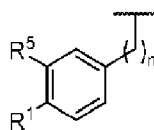
20

En algunas realizaciones, n es 0. En diversos casos, n es 1. En algunas realizaciones, R¹ y R⁵ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de N, O y S. En algunos casos, A se selecciona del grupo que consiste en



25

En algunos casos, A es



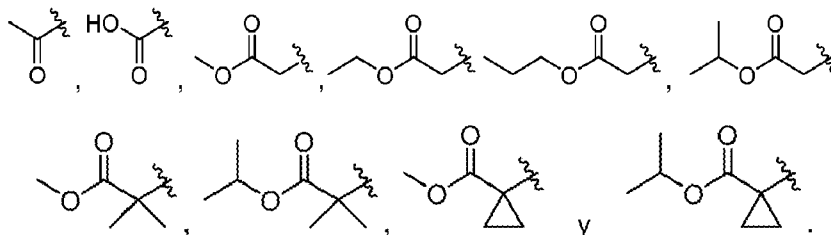
y R^5 es H. En algunos casos, R^1 es H. En algunas realizaciones, R^1 es alquilo C_{1-6} . Los grupos R^1 adecuados pueden incluir metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *s*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo o hexilo. En algunos casos, R^1 está sin sustituir. Por ejemplo, R^1 puede ser metilo o etilo. En algunos casos, R^1 está sustituido. Por ejemplo, R^1 puede ser fluorometilo o trifluorometilo. En algunas realizaciones, R^1 es alquileno $C_{0-6}-C(=O)R^6$. En algunos casos, R^1 es alquileno $C_{1-3}-C(=O)R^6$. En diversas realizaciones, el grupo alquileno no sin sustituir. En algunos casos, el grupo alquileno está sustituido con uno o más grupos alquilo (por ejemplo, uno o más grupos metilo, tales como



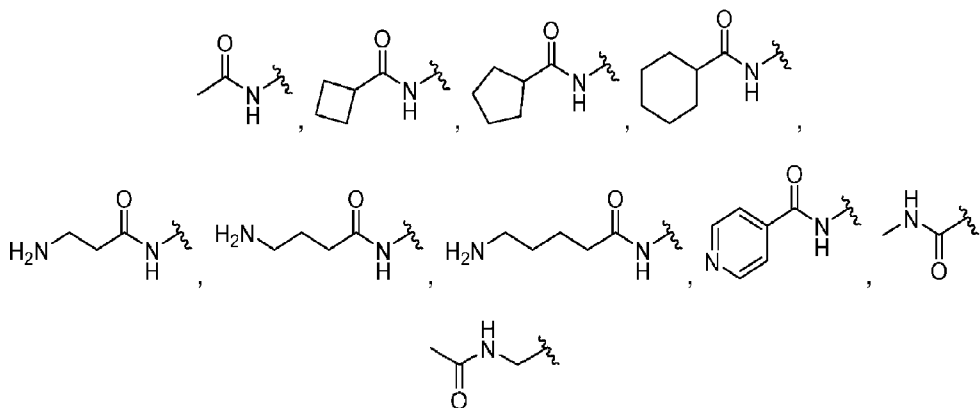
), o un grupo espiro (por ejemplo,



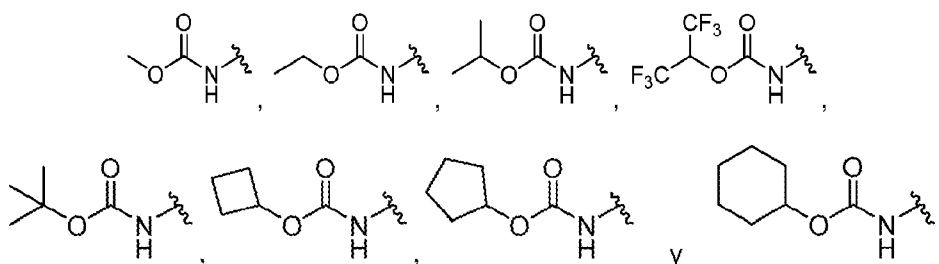
) En algunas realizaciones, R^6 es OH u O-alquilo C_{1-6} (por ejemplo, OMe, OEt, OPr, OiPr, 2-etilo). En diversas realizaciones, R^6 es alquilo C_{1-6} (por ejemplo, metilo, etilo o propilo). Los grupos R^1 adecuados pueden incluir



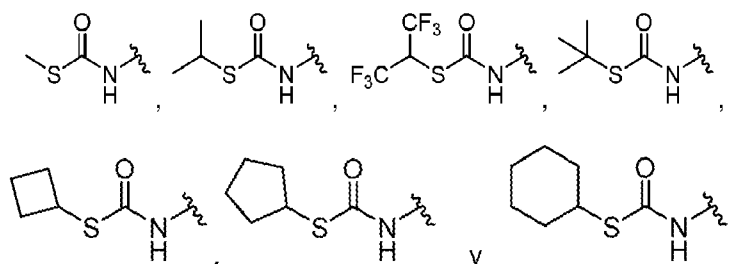
En algunos casos, R^1 es halo (por ejemplo, F). En algunas realizaciones, R^1 es ciano. En diversas realizaciones, R^1 es ariloxi. Por ejemplo, R^1 puede ser -CN u -Oph. En algunos casos, R^1 es amino (por ejemplo, NH_2). En algunas realizaciones, el amino está monosustituido con un grupo alquilo C_{1-3} (por ejemplo, metilo, etilo, propilo). En diversos casos, el amino está disustituido con los mismos o diferentes grupos alquilo C_{1-3} . Por ejemplo, R^1 puede ser $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$ o $-NH_2Ph$. En diversos casos, R^1 es alquileno C_{0-3} -amido. En algunos casos, R^1 es alquileno C_0 -amido. En diversos casos, R^1 es alquileno C_1 -amido. En algunas realizaciones, el grupo alquileno C_{0-3} -amido termina en un grupo alquilo C_{1-6} , un grupo cicloalquilo C_{3-6} , un grupo amino o un grupo heteroarilo. Los grupos alquileno C_{0-3} -amido adecuados pueden incluir



En algunas realizaciones, R^1 es un grupo carbamilo. En algunos casos, el grupo carbamilo termina en un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo cicloalquilo C_{3-6} . En algunas realizaciones, el grupo alquilo está sustituido (por ejemplo, con flúor). Los grupos carbamilo adecuados pueden incluir, por ejemplo,



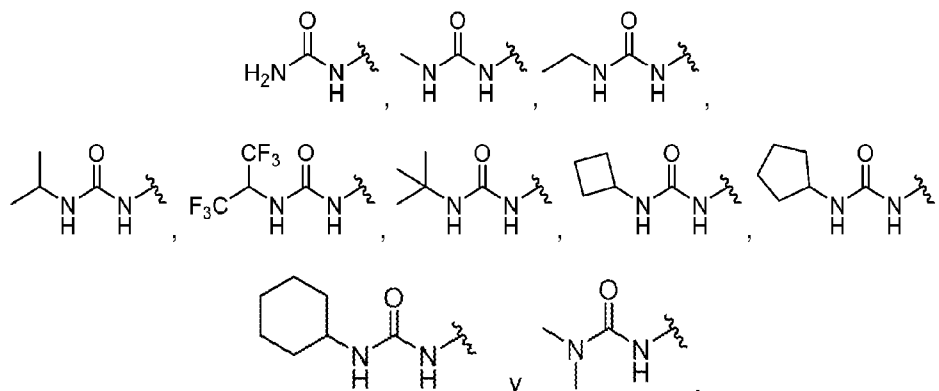
- 5 En algunas realizaciones, R^1 es un grupo S-tiocarbamilo. En diversas realizaciones, el grupo S-tiocarbamilo puede terminar en un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo cicloalquilo C_{3-8} . En algunas realizaciones, el grupo alquilo está sustituido (por ejemplo, con flúor). Los grupos S-tiocarbamilo adecuados pueden incluir, por ejemplo,



10

- En algunos casos, R^1 es un grupo ureido. En diversos casos, el grupo ureido puede terminar en un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo cicloalquilo C_{3-8} . En algunas realizaciones, el grupo alquilo está sustituido (por ejemplo, con flúor). Los grupos ureido adecuados pueden incluir, por ejemplo,

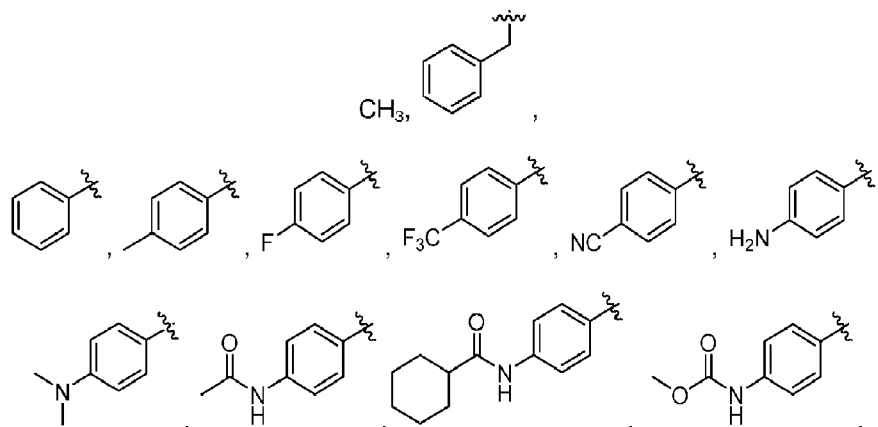
15



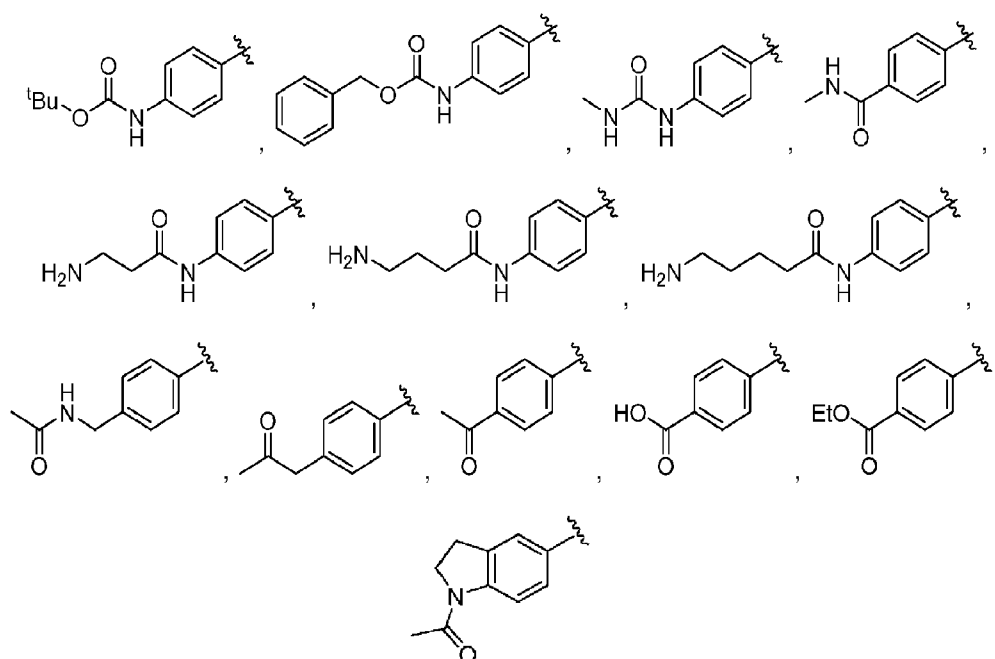
20

En diversos casos, R^1 es amido, carbamilo o ureido.

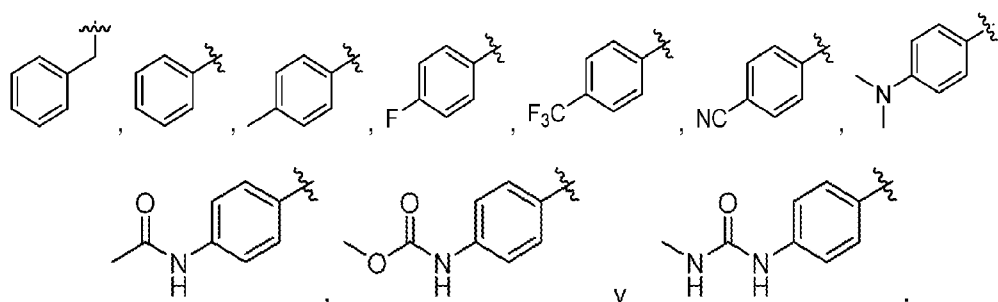
- 25 En algunos casos, A se selecciona del grupo que consiste en



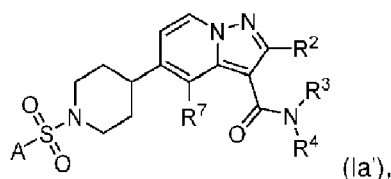
30



En diversos casos, A se selecciona del grupo que consiste en CH₃,



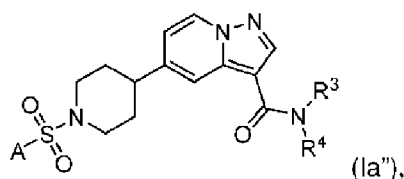
En algunas realizaciones, X es CH. En diversas realizaciones, X es N. En algunos casos, Y es CH₂. En diversos casos, Y es N. En algunos casos, m es 0. En diversos casos, m es 1. En algunas realizaciones, X es CH, Y es CH₂, y m es 1. En diversas realizaciones, X es CH, Y es CH₂, y m es 0. En algunos casos, X es N, Y es CH₂, y m es 1. En diversos casos, X es CH, Y es N, y m es 0. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (Ia) tiene una estructura de Fórmula (Ia'):



en donde los sustituyentes son como se han definido previamente.

En algunas realizaciones, R² es H. En diversas realizaciones, R² es halo. Por ejemplo, R² puede ser Br o Cl. En algunos casos, R² es alquilo C₁₋₆. Los grupos R² adecuados pueden incluir metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *s*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo o hexilo. En algunos casos, R² está sin sustituir. Por ejemplo, R² puede ser metilo o etilo. En algunos casos, R² está sustituido. En diversos casos, R² puede estar sustituido con un grupo flúor, hidroxilo o alcoxilo. Por ejemplo, R² puede ser CH₃, CF₃, CH₂OH o CH₂OCH₃. En algunas realizaciones, R² es cicloalquilo C₃₋₈. En algunos casos, R² es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En diversos casos, R² es heteroarilo. En diversas realizaciones, R² se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CF₃ y ciclopropilo.

En algunas realizaciones, R⁷ es H. En diversas realizaciones, R⁷ es halo o amino. En algunas realizaciones, R⁷ es F, Cl o Br. En algunas realizaciones, R⁷ es -NH₂. En algunas realizaciones, cada uno de R² y R⁷ es H. En algunos casos, el compuesto de Fórmula (Ia) tiene una estructura de Fórmula (Ia''):



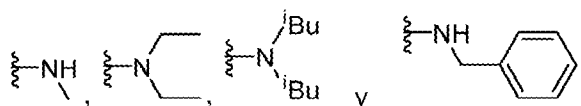
en donde los sustituyentes son como se han definido previamente.

- 5 En algunas realizaciones, cada uno de R^3 y R^4 es independientemente H, alquilo C_{1-6} o aralquilo C_{1-3} . Los grupos alquilo adecuados incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo y hexilo. En algunos casos, cada R^3 y R^4 es independientemente H, CH_3 , CH_2CH_3 , iBu o CH_2Ph . En diversos casos,



10

se selecciona del grupo que consiste en



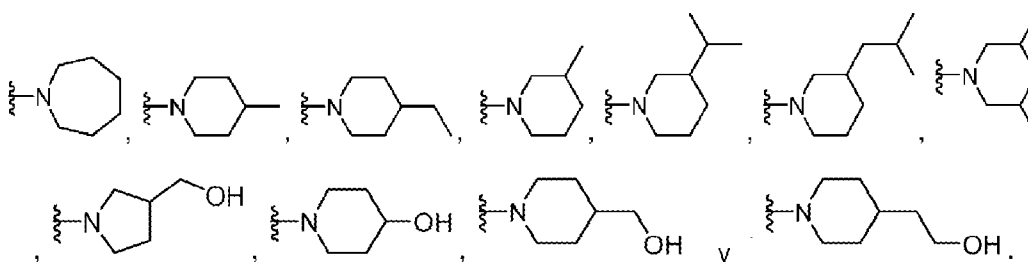
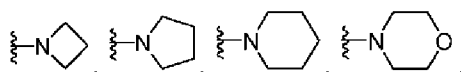
- 15 En algunas realizaciones, R^3 y R^4 y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 3-6 miembros. En algunas realizaciones, R^3 y R^4 y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 4 miembros. En algunas realizaciones, R^3 y R^4 y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 5-6 miembros. En diversas realizaciones, el anillo de 5-6 miembros es un anillo de pirrolidina o piperidina. En algunas realizaciones, el anillo de 3-6 miembros comprende de 1 a 3 heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S. En algunos

20



se selecciona del grupo que consiste en

25



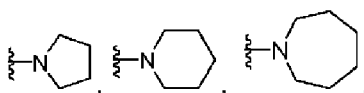
30

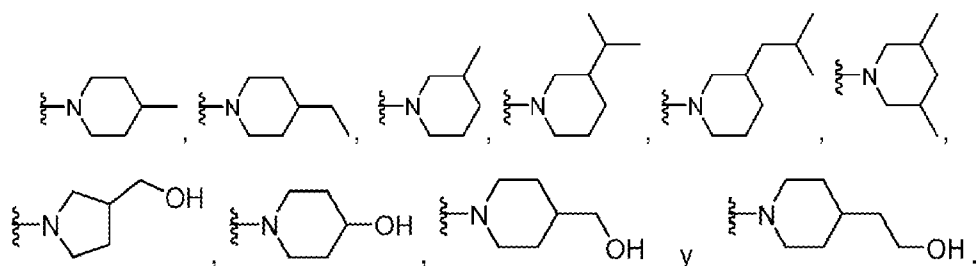
En diversos casos,



35

se selecciona del grupo que consiste en



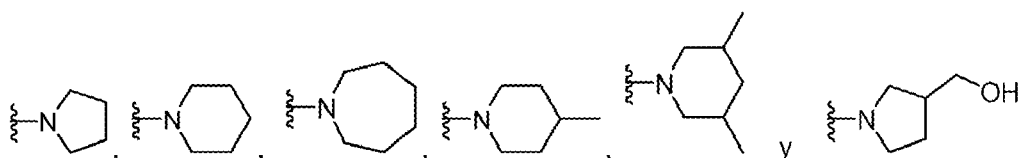
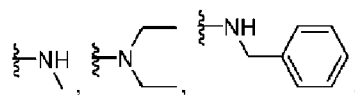


5 Por ejemplo,

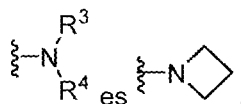


se puede seleccionar del grupo que consiste en

10

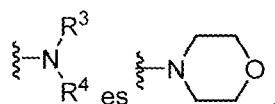


15 En algunos casos,



En algunos casos,

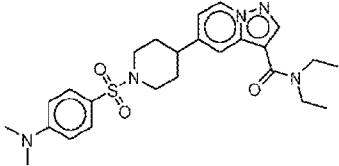
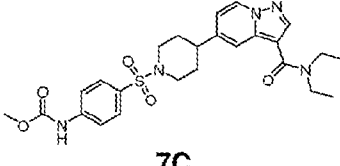
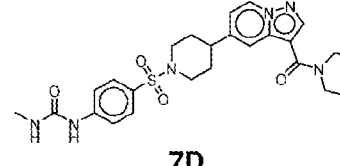
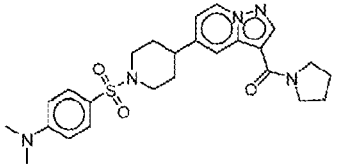
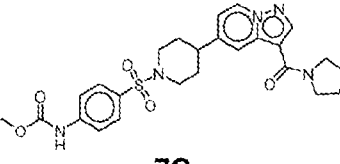
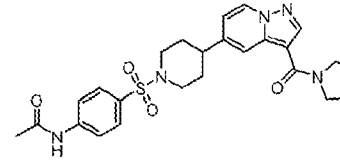
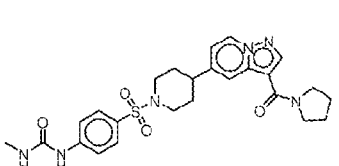
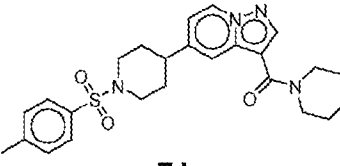
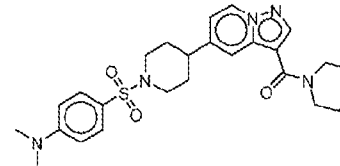
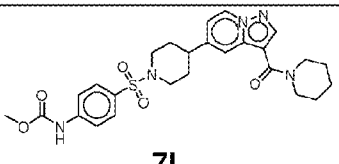
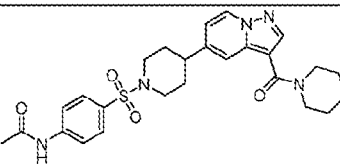
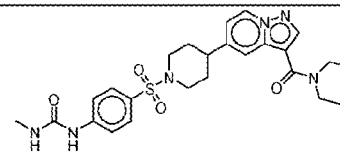
20

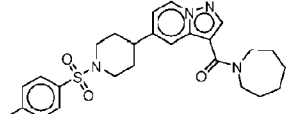
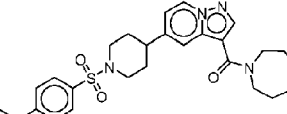
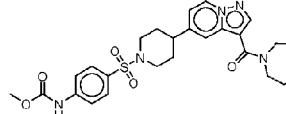
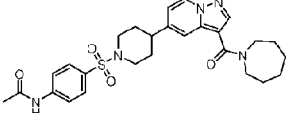
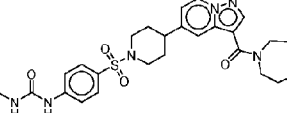
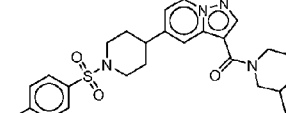
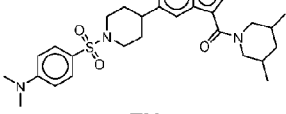
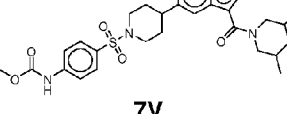
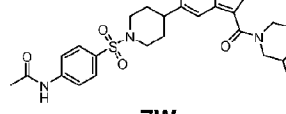
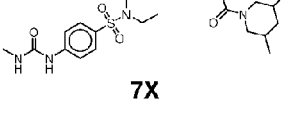
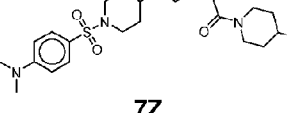
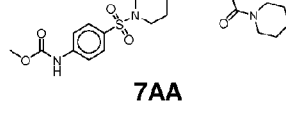
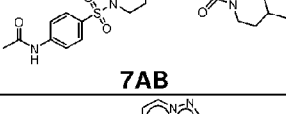
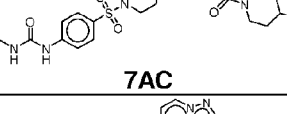
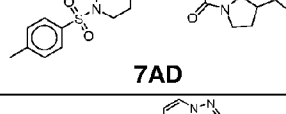
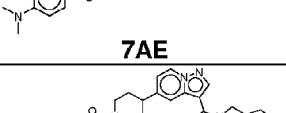
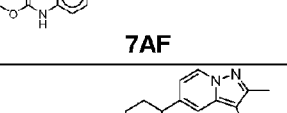
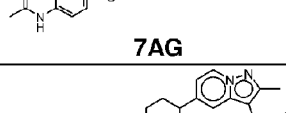
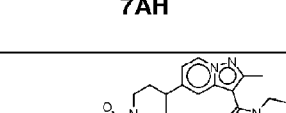
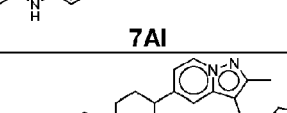
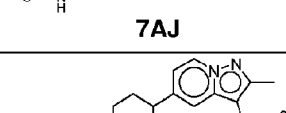
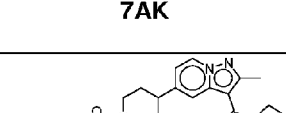
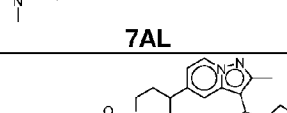
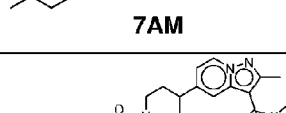
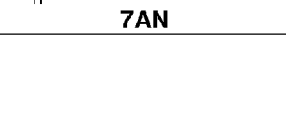
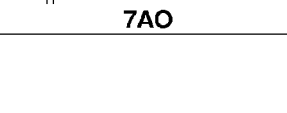
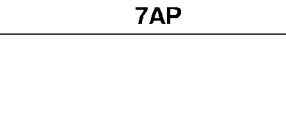


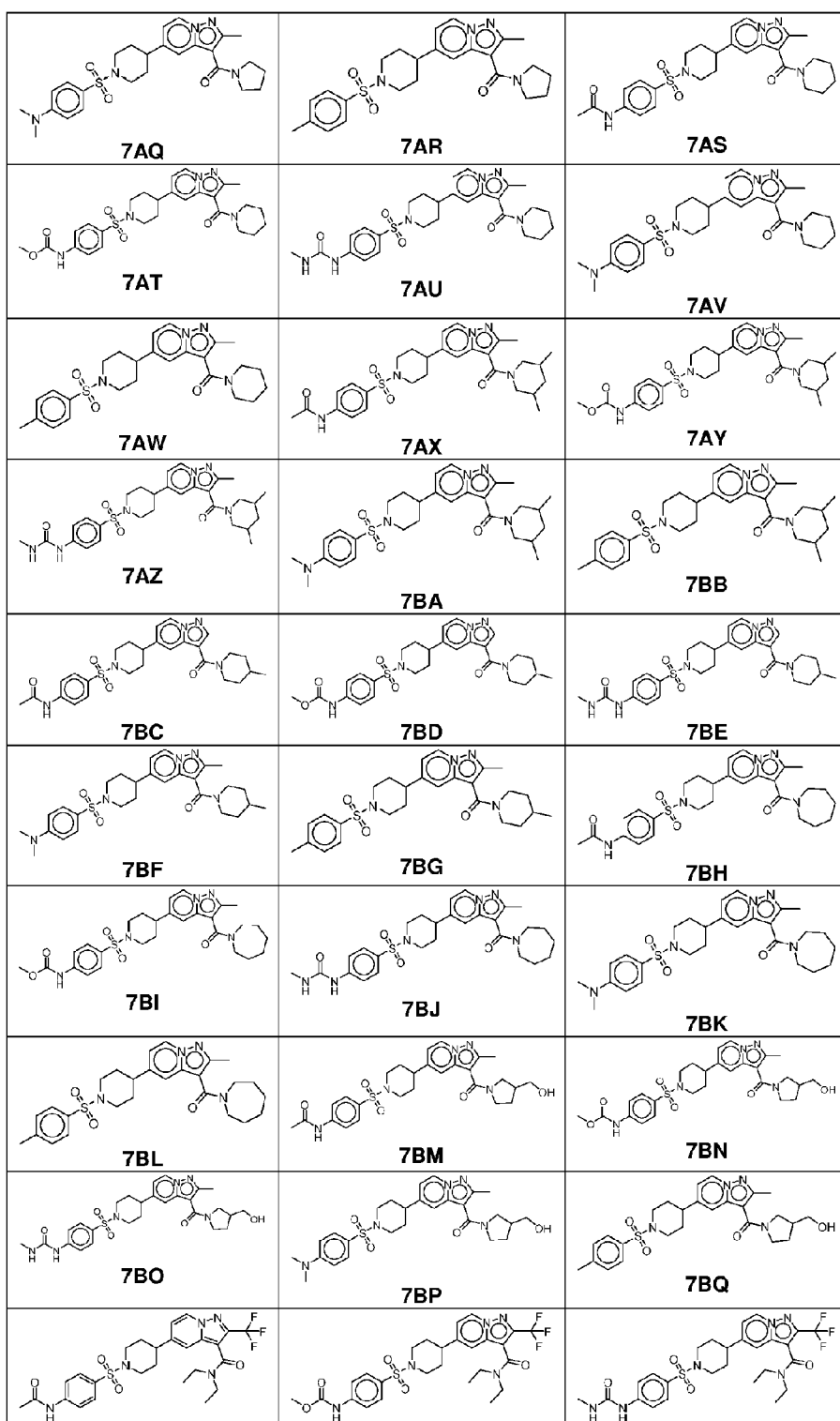
Los compuestos contemplados de la divulgación incluyen los compuestos enumerados en la Tabla A y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

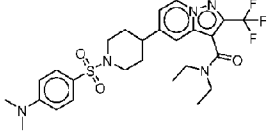
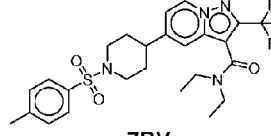
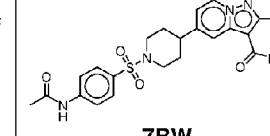
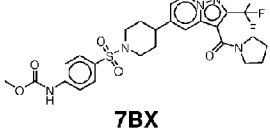
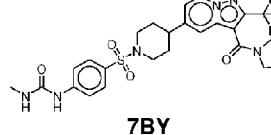
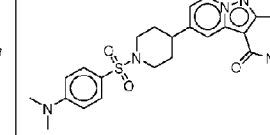
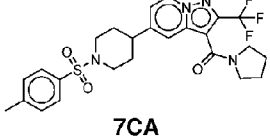
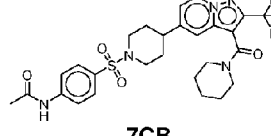
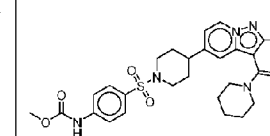
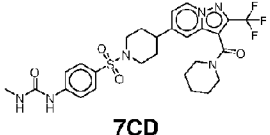
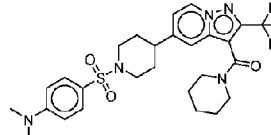
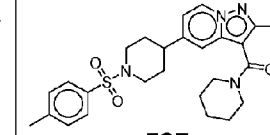
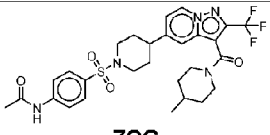
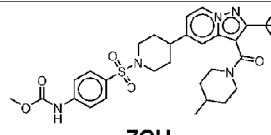
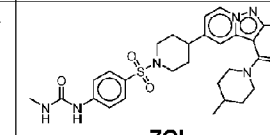
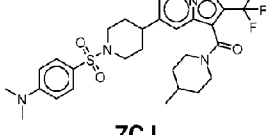
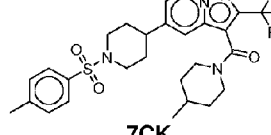
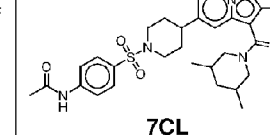
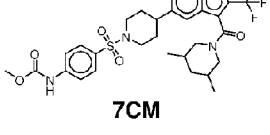
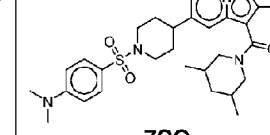
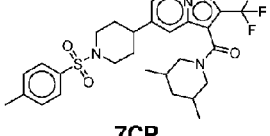
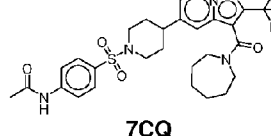
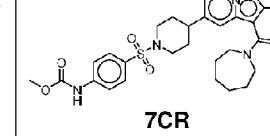
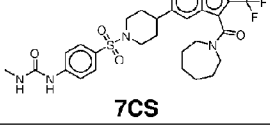
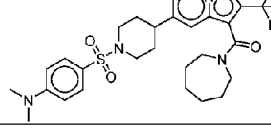
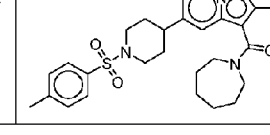
25

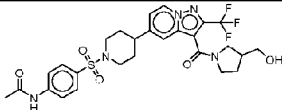
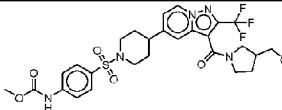
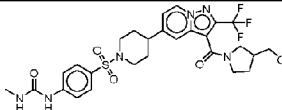
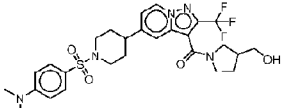
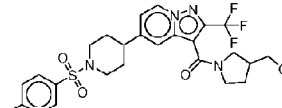
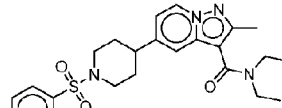
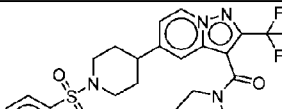
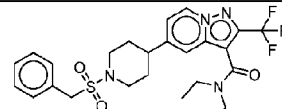
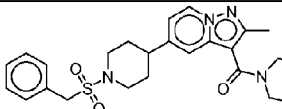
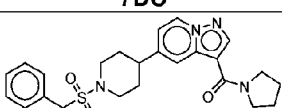
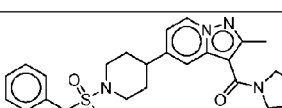
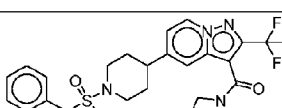
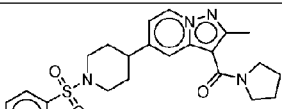
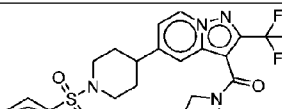
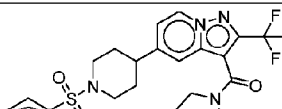
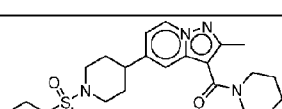
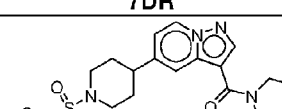
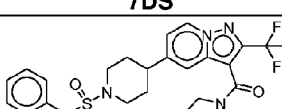
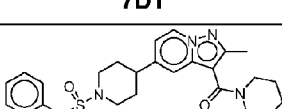
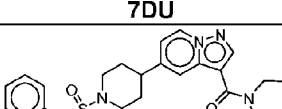
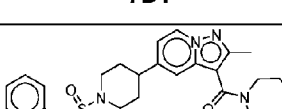
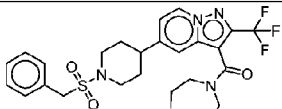
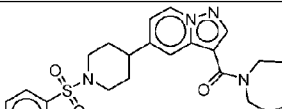
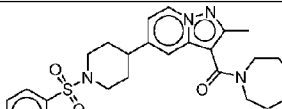
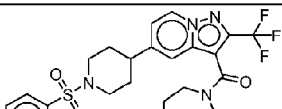
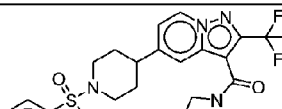
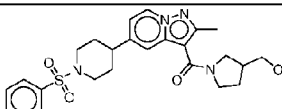
Tabla A

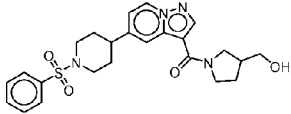
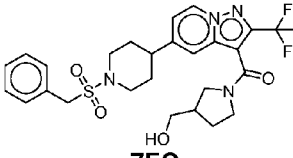
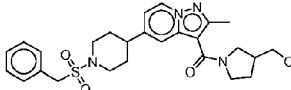
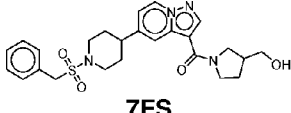
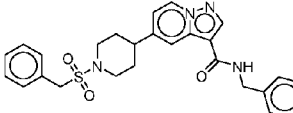
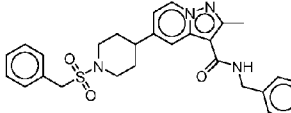
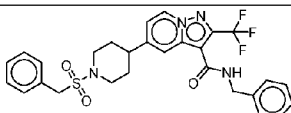
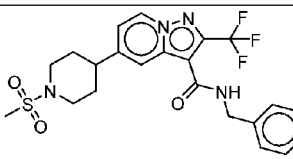
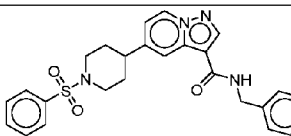
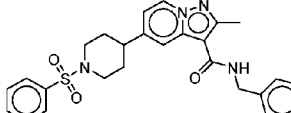
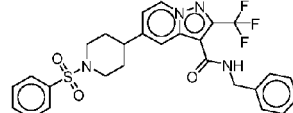
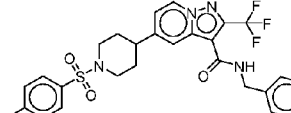
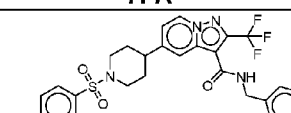
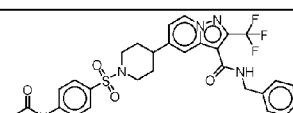
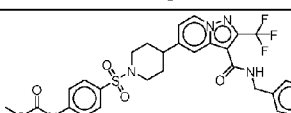
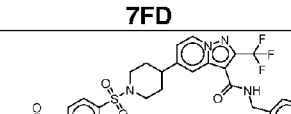
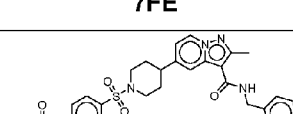
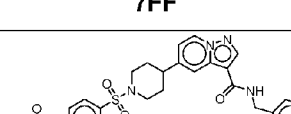
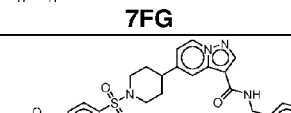
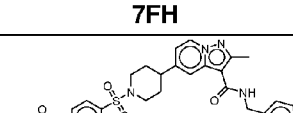
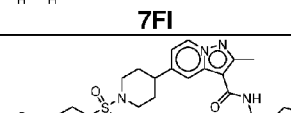
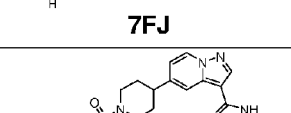
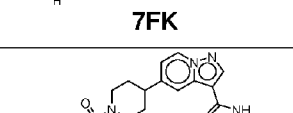
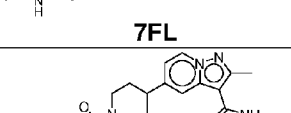
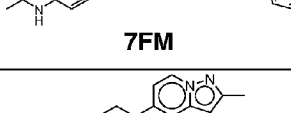
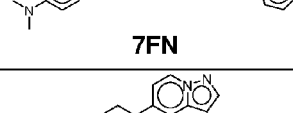
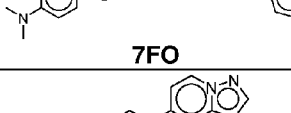
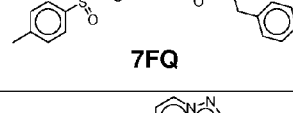
 7B	 7C	 7D
 7F	 7G	 7H
 7I	 7J	 7K
 7L	 7M	 7N

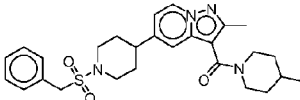
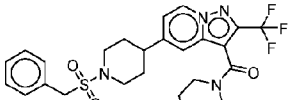
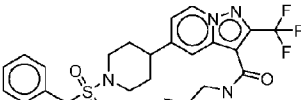
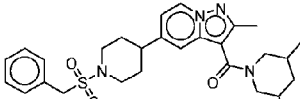
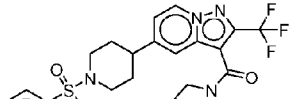
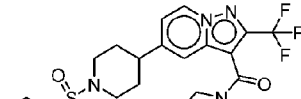
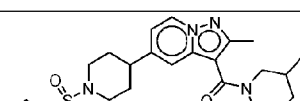
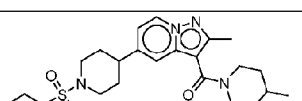
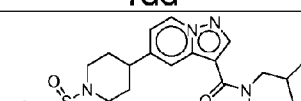
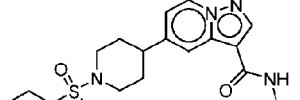
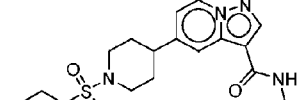
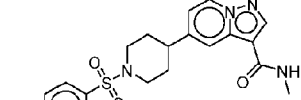
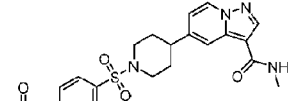
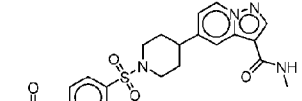
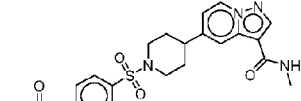
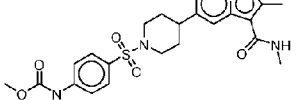
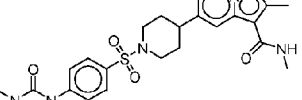
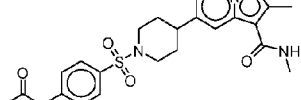
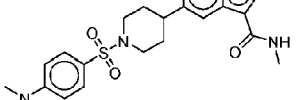
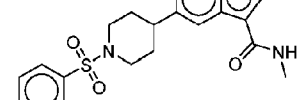
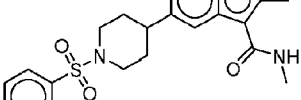
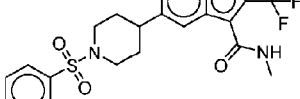
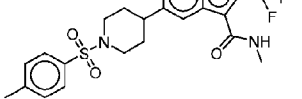
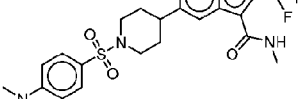
 7O	 7M	 7N
 7R	 7S	 7T
 7U	 7V	 7W
 7X	 7Z	 7AA
 7AB	 7AC	 7AD
 7AE	 7AF	 7AG
 7AH	 7AI	 7AJ
 7AK	 7AL	 7AM
 7AN	 7AO	 7AP

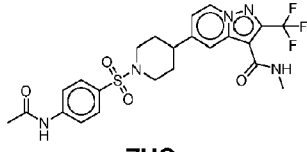
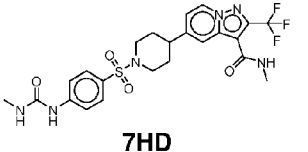
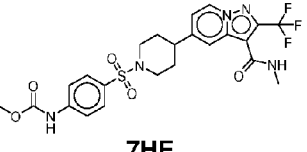
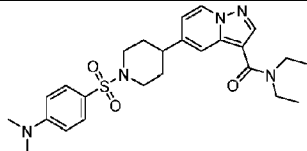
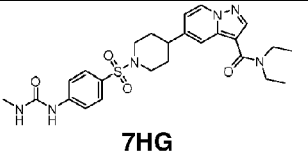
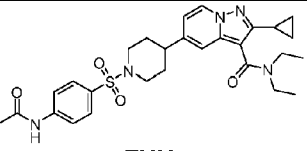
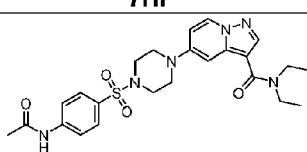
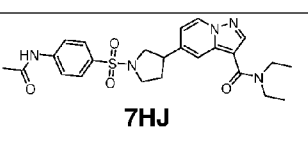
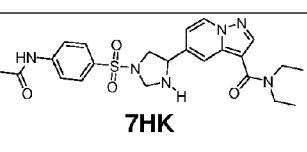
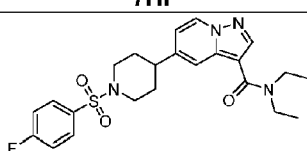


7BR	7BS	7BT
 7BU	 7BV	 7BW
 7BX	 7BY	 7BZ
 7CA	 7CB	 7CC
 7CD	 7CE	 7CF
 7CG	 7CH	 7CI
 7CJ	 7CK	 7CL
 7CM	 7CN	 7CO
 7CP	 7CQ	 7CR
 7CS	 7CT	 7CU

 7CV	 7CT	 7CU
 7CY	 7CZ	 7CX
 7DC	 7DH	 7DI
 7DK	 7DL	 7DM
 7DQ	 7DR	 7DS
 7DT	 7DU	 7DY
 7DZ	 7EB	 7EC
 7ED	 7EH	 7EI
 7EJ	 7EK	 7EL

 7EM	 7EQ	 7ER
 7ES	 7ET	 7EU
 7EV	 7EW	 7EZ
 7FA	 7FB	 7FC
 7FD	 7FE	 7FF
 7FG	 7FH	 7FI
 7FJ	 7FK	 7FL
 7FM	 7FN	 7FO
 7FP	 7FQ	 7FR
 7FT	 7FU	

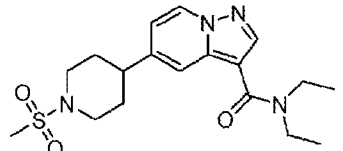
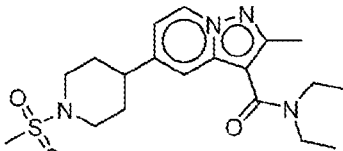
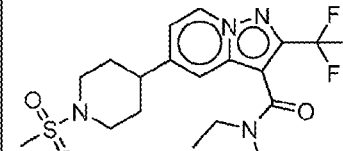
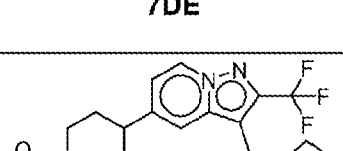
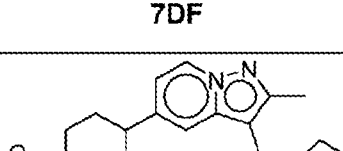
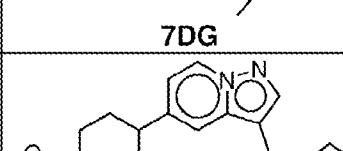
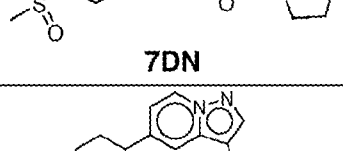
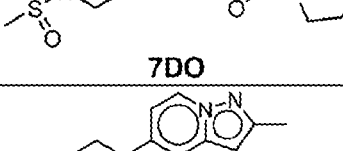
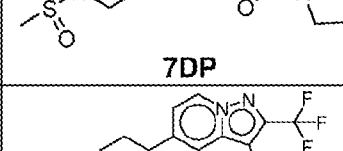
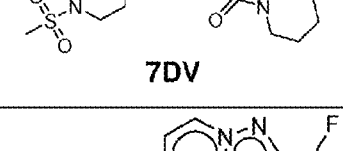
7FS  7FV	 7FW	 7FX
 7FY	 7GF	 7GG
 7GH	 7GI	 7GJ
 7GL	 7GM	 7GN
 7GO	 7GP	 7GQ
 7GR	 7GS	 7GT
 7GU	 7GV	 7GW
 7GZ	 7HA	 7HB

 7HC	 7HD	 7HE
 7HF	 7HG	 7HH
 7HI	 7HJ	 7HK
 7HL		

Los compuestos contemplados adicionales de la divulgación incluyen los compuestos enumerados en la Tabla B y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

5

Tabla B

 7DE	 7DF	 7DG
 7DN	 7DO	 7DP
 7DV	 7DW	 7DX
 7EF	 7EG	

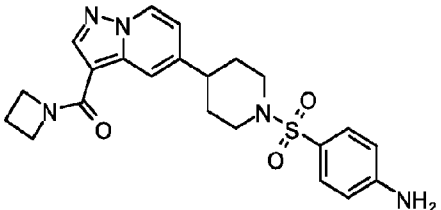
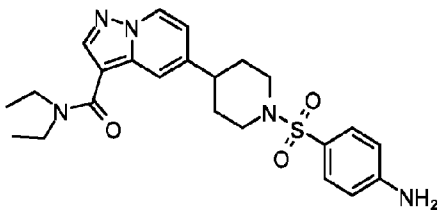
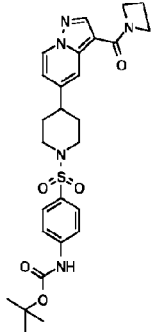
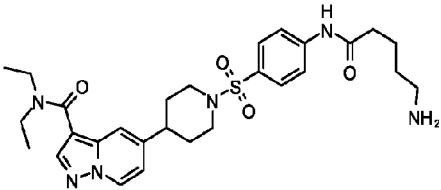
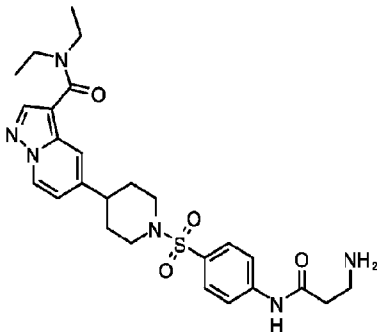
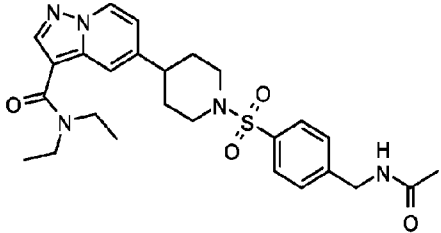
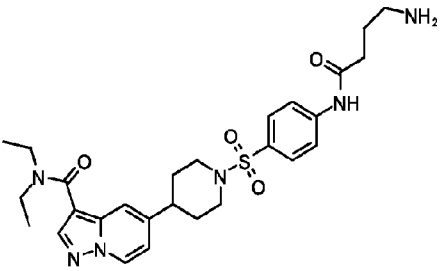
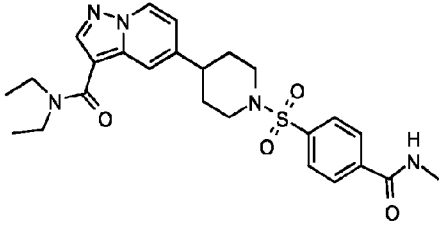
7EE 	7EO 	7EP
7EN 	7EY 	7FZ
7GA 	7GB 	7GC
7GD 	7GE 	7GK
7GX 	7GY 	

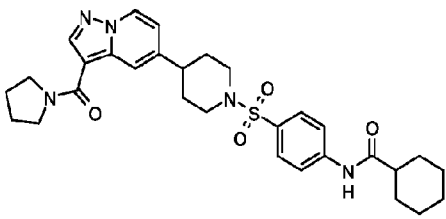
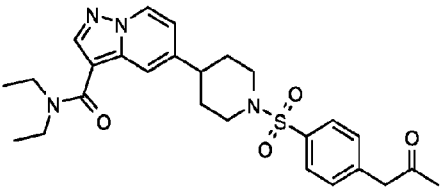
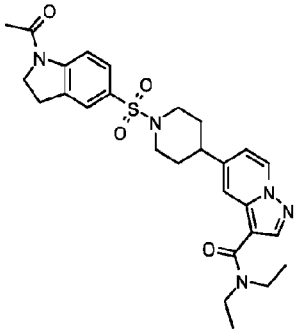
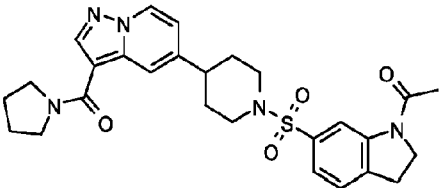
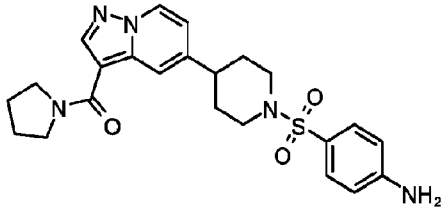
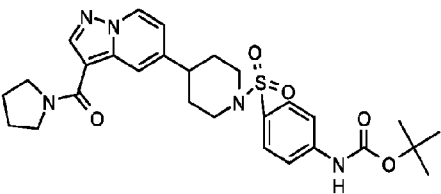
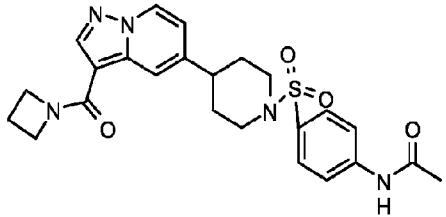
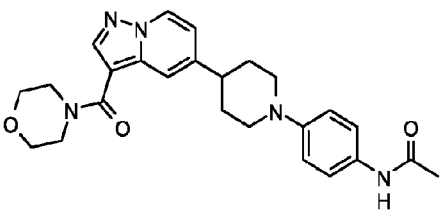
Los compuestos contemplados adicionales de la divulgación incluyen los compuestos enumerados en la Tabla C y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

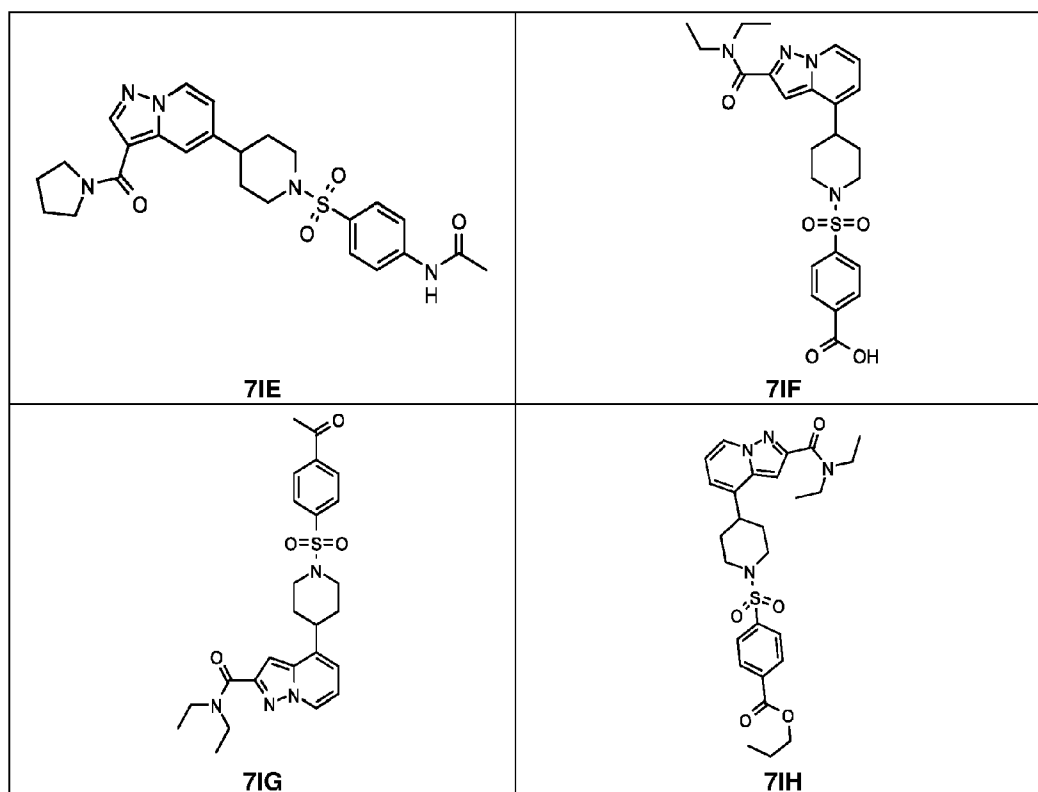
5

Tabla C

7HM	7HN

 7HO	 7HP
 7HQ	 7HR
 7HS	 7HT
 7HU	 7HV

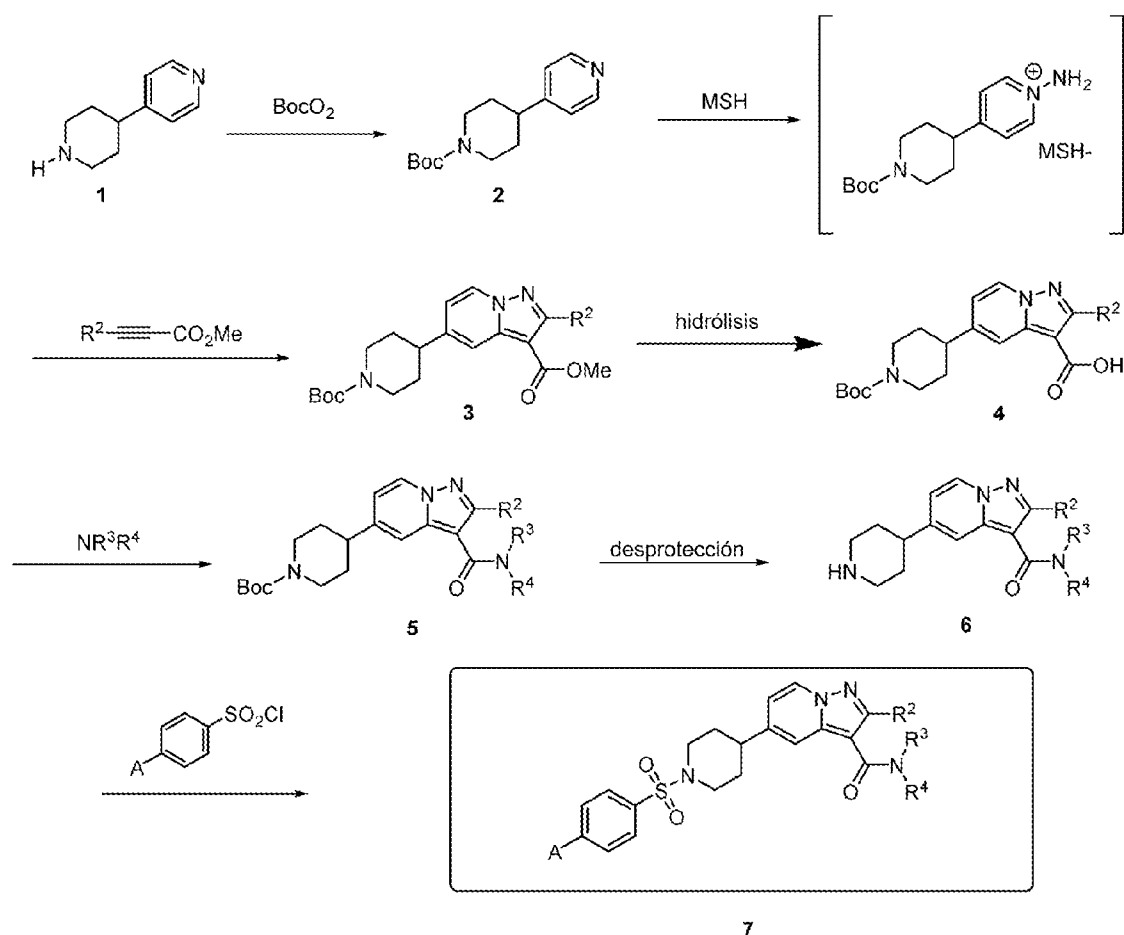
 7HW	 7HX
 7HY	 7HZ
 7IA	 7IB
 7IC	 7ID



En algunas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento incluyen un grupo aril sulfonilo, que participa en interacciones de enlace de hidrógeno con Tyr1019 en NACK, así como átomos donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno adicionales que participan en interacciones favorables con agua. Los compuestos divulgados en el presente documento también incluyen una alquilamida, cuyo nitrógeno forma un enlace de hidrógeno con Lys1022, y cuyos grupos alquilo participan en interacciones hidrófobas profundas dentro del sitio de unión de NACK. Se encontró que un aumento de átomos de carbono en las cadenas de alquilo de la alquilamida mejora la interacción del compuesto con el sitio de unión y, particularmente, para los restos cíclicos (por ejemplo, cuando R³ y R⁴ junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo). Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, los restos alquilo de cadena lineal pueden aumentar el impedimento estérico y la entropía. Los compuestos divulgados en el presente documento también incluyen un resto azaindol, que participa en interacciones bisagra con His1095.

Síntesis de los inhibidores de NACK

Los compuestos de la divulgación se pueden sintetizar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. El Esquema 1, a continuación, representa un método para sintetizar los compuestos de la divulgación. Por ejemplo, la 4-(piperidin-4-il)piridina (**1**) se puede proteger (por ejemplo, con BOC) para dar como resultado **2**, que puede reaccionar con, por ejemplo, mesitilenosulfonilhidroxilamina ("MSH") para formar una sal de aminopiridinio. La sal de aminopiridinio puede experimentar una cicloadición 3+2 con un propiolato deseado para formar un pirazolo[1,5-a]piridinacarboxilato de metilo deseado (**3**). El carboxilato de metilo **3** puede experimentar hidrólisis (por ejemplo, con LiOH) para dar como resultado ácido carboxílico (**4**), que se puede hacer reaccionar con una amina deseada usando química de acoplamiento estándar para formar una amida deseada (**5**). A continuación, la amida se puede desproteger (**6**) y hacer reaccionar con un cloruro de sulfonilo deseado para dar como resultado un inhibidor de la divulgación (**7**).



En el apartado de Ejemplos pueden encontrarse procedimientos sintéticos adicionales para preparar los compuestos divulgados en el presente documento.

5

Métodos de uso de los inhibidores de NACK

Los compuestos de la divulgación pueden inhibir la cinasa del complejo de activación de Notch ("NACK") interrumpiendo el reclutamiento de NACK en el complejo de transcripción de Notch ("NTC") en una célula, lo cual es útil para prevenir o tratar enfermedades asociadas con la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch.

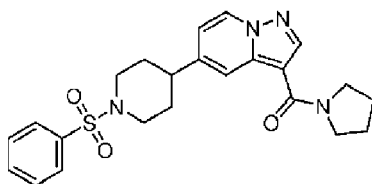
10

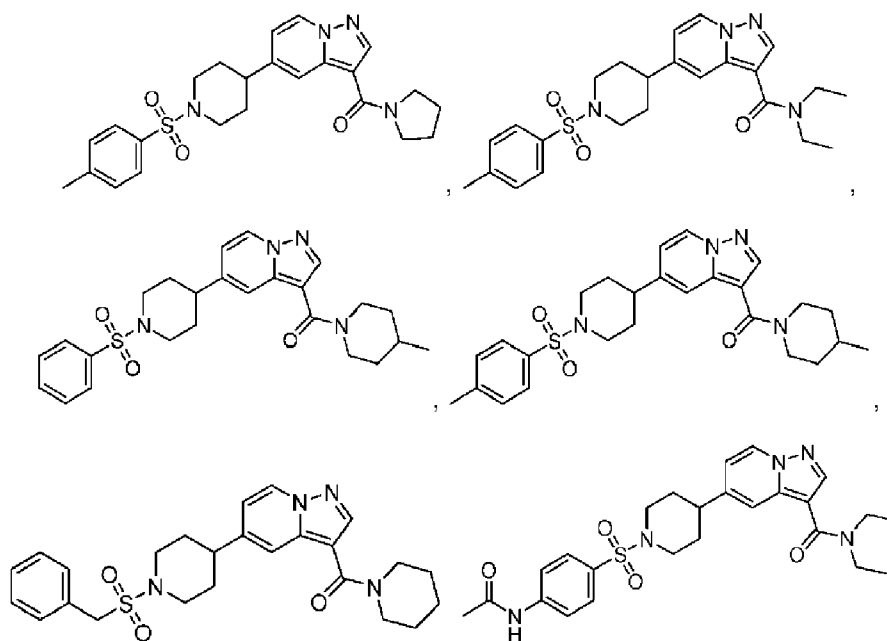
La vía Notch está restringida a pequeñas poblaciones de células progenitoras y madre de tejidos en regeneración, tales como el colon y el cerebro. Sin embargo, en muchos cánceres humanos, la vía Notch se reactiva, y esta pérdida de regulación de la vía Notch es la base de muchos aspectos de la fisiología del cáncer, dependiendo del tipo de célula y el contexto.

15

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a un método para inhibir el complejo de cinasa de activación de Notch ("NACK") en una célula, que comprende poner en contacto la célula con uno o más compuestos como se divulga en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I), un compuesto de Fórmula (Ia), un compuesto enumerado en la Tabla A, la Tabla B, la Tabla C,

20





y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores) en una cantidad eficaz para inhibir NACK.

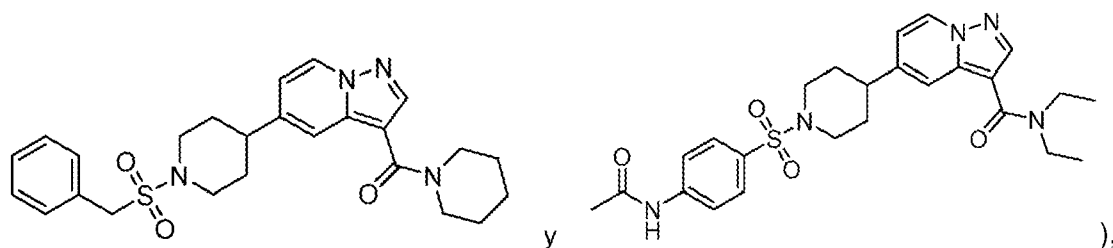
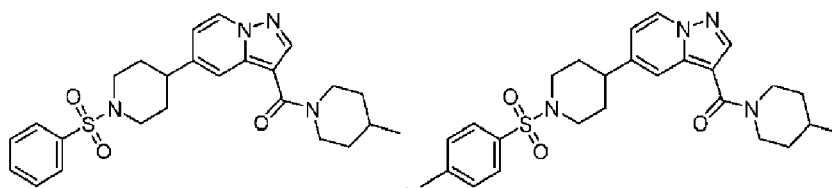
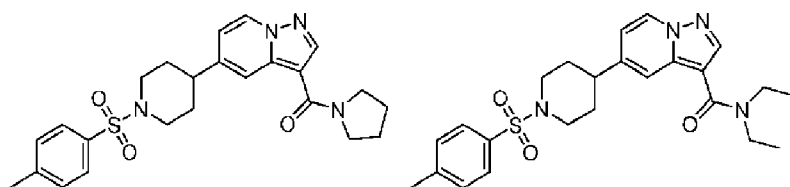
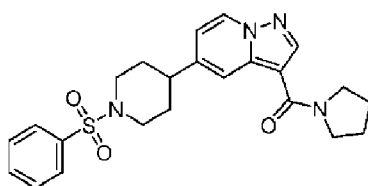
En particular, en el presente documento se proporciona un método para inhibir el reclutamiento de NACK en el complejo transcripcional de Notch ("NTC") en una célula poniendo en contacto la célula con uno o más compuestos divulgados en el presente documento en una cantidad eficaz para inhibir el reclutamiento de NACK en el NTC.

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden inhibir NACK en una célula poniendo en contacto la célula *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, el contacto se produce *in vitro*. En otras realizaciones, el contacto se produce *in vivo*. Los compuestos pueden ponerse en contacto con NACK *in vivo* administrando el compuesto a un sujeto o paciente que necesita la regulación de NACK. Dicho de otra manera, en diversas realizaciones, la invención incluye administrar uno o más compuestos de la divulgación a un sujeto o paciente, tal como un ser humano, que lo necesite. En algunas de estas realizaciones, el paciente padece una enfermedad asociada a la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch (por ejemplo, tetralogía de Fallot ("TOF"), síndrome de Alagille, esclerosis múltiple o cáncer).

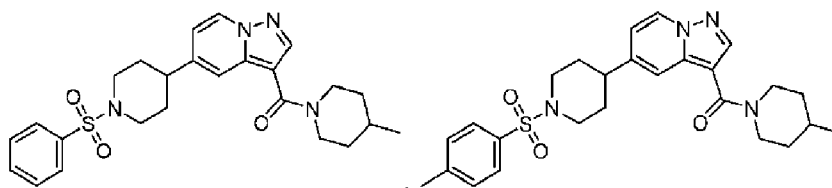
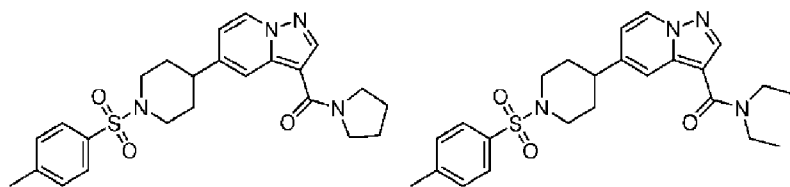
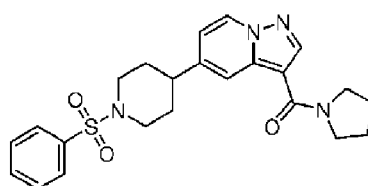
Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos divulgados en el presente documento.

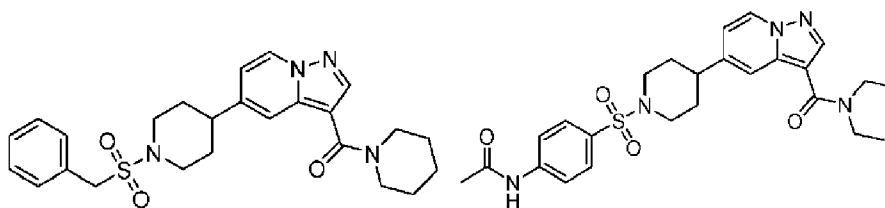
En algunas realizaciones, la enfermedad asociada con la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch es la tetralogía de Fallot ("TOF") o síndrome de Alagille. En algunos casos, la enfermedad asociada con la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch es un cáncer. En diversas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T ("T-ALL"), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B ("B-ALL"), cáncer de mama, meduloblastoma, cáncer colorrectal, carcinoma de pulmón no microcítico ("NSCLC"), melanoma, ateriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía ("CADASIL"), leucemia linfocítica crónica ("CLL"), carcinoma hepatocelular ("HCC"), leucemia mielomonocítica ("CMML"), adenocarcinoma ductal pancreático ("PDAC"), carcinoma escamocelular de cabeza y cuello ("HNSCC"), adenocarcinoma de células renales, fibrosarcoma y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la enfermedad asociada con la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch es la esclerosis múltiple ("EM").

También se contemplan el uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se divulga en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I), un compuesto de Fórmula (Ia), un compuesto enumerado en la Tabla A, la Tabla B, la Tabla C, para tratar una afección resultante de la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch en un paciente, así como el uso del compuesto en la preparación de un medicamento para tratar la afección.



Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad cinasa, la actividad ATPasa o ambas en una célula, que comprende poner en contacto la célula con uno o más compuestos como se divulga en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I), un compuesto de Fórmula (Ia), un compuesto enumerado en la Tabla A, la Tabla B, la Tabla C,





y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores), en una cantidad eficaz para inhibe la actividad cinasa y/o ATPasa.

Expresión elevada de NACK en el adenocarcinoma de esófago ("EAC")

NACK desempeña un papel importante en la activación de la transcripción de Notch y en la regulación de la tumorigénesis y el desarrollo mediados por Notch. Véase Weaver *et al.*, Cancer Research 74, 4741-4751 (2014). Además, Notch impulsa la troncalidad y la tumorigenicidad del adenocarcinoma de esófago ("EAC"). Véase Wang *et al.*, Cancer Research 74, 6364-6374 (2014).

Para evaluar el nivel de expresión de NACK en EAC, se analizaron muestras clínicas procedentes de adenocarcinoma de esófago primario resecado quirúrgicamente. Como se ilustra en la figura 1A, los niveles de ARNm de NACK y Notch1 están elevados en muestras de tumor en comparación con sus tejidos normales correspondientes. Consecuentemente, se observaron niveles elevados de NACK en muestras de adenocarcinoma de esófago sin tratamiento previo con quimioterapia procedentes de biopsias por ultrasonido endoscópico ("EUS"), que también tienen niveles elevados de Notch1 activado (figura 1B).

También se analizó la expresión de NACK en líneas celulares de adenocarcinoma de esófago (OE33, OE19, Flo-1 y JH-1) mediante qPCR (figura 1C). También se observó una mayor expresión de NACK en estas células de adenocarcinoma de esófago en comparación con las células inmortalizadas procedentes de tejido normal. Estos resultados demuestran que el nivel de expresión de NACK está elevado y relacionado con la expresión de Notch1 activado en células y tumores de adenocarcinoma de esófago.

Para evaluar la importancia de NACK en EAC, se evaluó la viabilidad de las células EAC atenuando la expresión endógena de NACK. Las líneas celulares se infectaron con lentivirus que expresaban ARNhc de control o ARNhc contra NACK. La atenuación de NACK en células de adenocarcinoma de esófago (OE33, OE19 y Flo-1), como se verificó mediante qPCR y transferencia de Western (figura 1D y 1E), condujo a una inhibición drástica del potencial clonogénico de estas células (figura 1F). Estos datos indicaron que NACK es esencial para la supervivencia de las células de EAC, lo que proporciona la justificación para el direccionamiento de NACK como diana terapéutica.

Modelado de homología y simulación de dinámica molecular ("MD") del dominio cinasa de NACK

La estructura NACK se construyó usando modelado de homología. El modelo tridimensional de NACK se produjo usando el servidor IntFOLD, que adoptó el método de modelado de plantillas múltiples basado en estimaciones de calidad de secuencia globales y locales y métodos adicionales de alineación de secuencia-estructura. Véase McGuffin *et al.*, Nucleic Acids Res 43, W169-73 (2015).

Se obtuvo un modelo de buena calidad basado en las plantillas estructurales de las proteínas cinasas PKR (2A1A), STK16 (2BUJ), NEK1 (4APC) y CaMKII (2BDW). El modelo tridimensional para NACK (longitud completa) muestra un dominio en el extremo N desordenado en gran medida (Met1-Gly974), un dominio catalítico de cinasa ordenado (Gly975-Trp1326), seguido de un dominio en el extremo C desordenado (Gly1327-Leu1402). El núcleo catalítico del dominio de la proteína cinasa está compuesto por un lóbulo N caracterizado por una lámina β y un lóbulo C dominado por una hélice α . En este sentido, sólo se empleó el modelo de dominio cinasa de NACK para una mayor simulación por dinámica molecular (MD).

Para investigar las características estructurales del dominio cinasa de NACK, se comparó el modelo del dominio cinasa de NACK con la estructura cristalográfica de PLK3 (PDB: 4B6L), que es una cinasa típica. PLK3 es estructuralmente similar a NACK, con una RMSD de 1,748 Å en 182 residuos alineados y una identidad de secuencia del 27,47 % calculada por YASARA (mostrada usando PyMOL, figura 2A y 2B). Esta estructura modelo del dominio cinasa de NACK también es similar a la de la cinasa atípica CASK. La superposición estructural 3D usando YASARA entre el dominio cinasa de NACK y CASK (PDB: 3COI) tiene una RMSD de 1,69 Å sobre 176 residuos alineados, con una identidad de secuencia del 21,59 % (mostrada usando PyMOL, figura 2A). La superposición de CASK con la estructura de NACK sugiere que el anillo de adenina de 5'AMP puede interactuar con los residuos "bisagra" del dominio cinasa de NACK. La región bisagra contiene varios residuos conservados que son esenciales para la unión de ATP y la actividad catalítica.

Existen varios motivos clave en estructuras típicas de dominios de cinasa que son necesarios para la unión,

hidrólisis y transferencia de ATP. El motivo HRD, que contiene un residuo catalítico, tiene la función de escindir el grupo gamma-fosfato y transferirlo al sustrato. El motivo VAIK se usa para posicionar los alfa y beta-fosfatos de ATP. El motivo DFG contiene el sitio de unión de Mg^{2+} , que es necesario para la hidrólisis del ATP. NACK tiene varias características importantes de proteína cinasa, tal como el motivo HRD, que incluye un aspartato conservado (ASP1143) que está implicado directamente en la actividad catalítica (figura 2A). Además, el motivo VAIK, con la alteración del motivo YAVK en NACK que adopta una estructura secundaria de lámina β (figura 2A) es muy similar a las regiones correspondientes de PLK3 y CASK (motivo FAVK). En el bucle entre los lóbulos N y C, Arg1091 y Val1093 forman una bisagra estructuralmente similar a la formada entre Glu92 y Met94 en CASK. Sin embargo, NACK carece del motivo DFG conservado que participa en la unión a metal (figura 2A). En cuanto a CASK, aún puede funcionar como una cinasa activa sin un sitio de unión a metal.

Después del modelado de homología de la estructura de NACK, se realizó una simulación por MD de todos los átomos de 50 ns en disolvente acuoso explícito para evaluar la estabilidad del modelo del dominio cinasa de NACK. A lo largo de la simulación, los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) aumentaron hasta 0,6 nm a los 5 ns y permanecieron a aproximadamente 0,7 nm a medida que evolucionó el tiempo (figura 2C). Además, se calculó la fluctuación cuadrática media (RMSF) para evaluar la flexibilidad de la estructura del dominio cinasa de NACK (figura 2D). Dos regiones parecen ser las más flexibles, que fueron Cys1049-Asp1084 y Cys1154-Leu1205 (mostradas en la figura 2E, respectivamente). La región Cys1049-Asp1084 forma un bucle flexible entre las cadenas de la lámina beta en el lóbulo N del dominio cinasa de NACK, y Cys1154-Leu1205 constituye el dominio de inserción de cinasa.

La simulación por MD entre NACK y ATP revela un sitio de unión de ATP putativo

Para identificar el sitio catalítico de NACK, se realizó una simulación por MD entre NACK y el ligando de ATP. La estructura más representativa de NACK procedente del estudio de MD inicial sirvió como conformación inicial para la simulación de la interacción NACK-ATP. La molécula de ATP se posicionó previamente en el dominio cinasa de NACK de acuerdo con las interacciones propuestas (véase Taylor, S.S. Bioessays 7, 24-9 (1987), interactuando los grupos fosfato con Lys1022 y haciendo contacto la cabeza de adenina con His1095 en la región bisagra del dominio cinasa. Se realizó una simulación por MD de 100 ns. Durante los segundos 50 ns, el modelo de unión se estabilizó con RMSD entre 4 y 5,5 Å (figura 3A). La estabilidad de la simulación por MD se validó adicionalmente mediante el radio de giro (Rg). Rg es la distancia de los átomos de la estructura desde su centro de gravedad durante el tiempo de simulación. Rg alcanzó una meseta con un promedio de aproximadamente 2,3 nm, lo que demostró además que la simulación alcanzó el equilibrio (figura 3B).

Las interacciones moleculares entre NACK y ATP se evaluaron calculando el número de enlaces de hidrógeno. Estuvieron constantemente presentes cinco enlaces de hidrógeno entre ATP y NACK en los últimos 50 ns de la simulación (figura 3C). En cuanto a las cinasas típicas, se encontró que el ATP formaba de siete a ocho enlaces de hidrógeno con residuos en el sitio activo. Véanse Kuriyan, J., Konforti, B. y Wemmer, D. The molecules of life: Physical and chemical principles (Garland Science, 2012). La estructura más representativa de NACK con molécula de ATP se muestra en la figura 3D. Se encontró que varios residuos en el dominio cinasa de NACK establecían contactos importantes con ATP (figura 3E). En particular, el puente salino entre Lys1022 y el grupo beta fosfato de ATP permaneció intacto durante la simulación. Se encontró un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno de la cadena principal de His1095 y el oxígeno alfa fosfato ATP, mientras que His1095 estaba en condiciones de hacer contacto con el anillo de adenina de ATP en el punto inicial de la simulación. Los residuos Asn1212, Cys999 y Tyr1006 también formaron enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato de ATP. Se encontró que Asp1048 hacía contacto con el anillo de adenina de ATP a través de un enlace de hidrógeno (figura 3E). Estos resultados sugirieron que el ATP podría establecer contactos estables en el sitio activo de NACK.

NACK se une al complejo de transcripción de Notch de manera dependiente de ATP

Anteriormente, se había demostrado que NACK se puede coprecipitar concomitantemente con N1ICD y Maml1 de una manera dependiente de CSL a partir de células 293T transfectadas con N1ICD, Maml1 y NACK en el ensayo de precipitación por afinidad de ADN de CSL (CSL-DAP). Véase Weaver, K.L. *et al.* Cancer Research 74, 4741-4751 (2014). Para validar el modelo, los residuos Lys1002, Cys979, Tyr986 e His1076 se mutaron en NACK de ratón, que se encontró que realizaban interacciones importantes entre NACK y ATP en la simulación por MD (figura 3D y 3E). La unión entre ATP y NACK mutado se evaluó mediante el experimento CSL-DAP. Los mutantes de NACK (NACK-Lys1002, NACK-Cys979) mostraron una unión de NACK disminuida a N1ICD y Maml1 de una manera dependiente de CSL, lo que sugiere su importancia para la unión de ATP (figura 4A). Mientras que el mutante NACK-His1076 no altera el reclutamiento de NACK ya que el residuo de His interactuó con el ATP a través de la cadena principal.

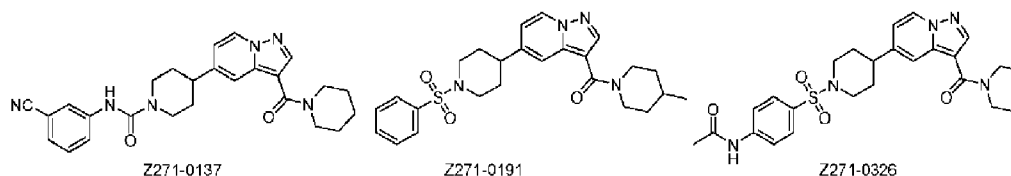
Para explorar más a fondo el efecto del ATP sobre la unión de NACK al complejo de transcripción de Notch, se realizó un ensayo CSL-DAP añadiendo ATP o GTP al lisado celular. En comparación con el control, el reclutamiento de NACK aumentó drásticamente (figura 4B). Por el contrario, no se observó NACK en la condición de ATP o GTP no hidrolizable (AMPPNP o GTP-gS) (figura 4B), lo que sugiere que se requiere hidrólisis de ATP o GTP para el reclutamiento de NACK en el complejo de transcripción de Notch. Además, la unión entre NACK y ATP se confirmó midiendo la unión entre NACK y el análogo de ATP AMP-PNP mediante resonancia de plasmón superficial (SPR).

Se determinó que la constante de unión era aproximadamente 1,5 μ M (figura 4C). Por lo tanto, se ha demostrado que NACK puede hidrolizar ATP en ADP y Pi (figura 4D). Por el contrario, el mutante K1002A "catalíticamente inactivo" de NACK no logró hidrolizar ATP en ADP en el ensayo ADP-Glo (figura 4E). En conjunto, estos resultados sugirieron que NACK funciona de manera dependiente de ATP para unirse al complejo de transcripción de Notch y activar la transcripción mediada por Notch.

Los inhibidores de NACK inhiben selectivamente la viabilidad de la línea celular dependiente de Notch/NACK

Para establecer un criterio para la dependencia de Notch/NACK, las líneas celulares se clasificaron en dos grupos en función de su sensibilidad a DAPT (un GSI) y la atenuación de NACK. En este escenario, se razonó que la inhibición del crecimiento celular y de los genes diana de Notch mediante la atenuación de DAPT o NACK indica una inhibición específica de la actividad de Notch/NACK. Por lo tanto, las líneas celulares en las que el crecimiento celular y la transcripción del gen diana de Notch se vieron afectados por el tratamiento con DAPT o la atenuación de NACK se clasificaron como líneas celulares dependientes de Notch/NACK. Por otro lado, aquellas en las que el crecimiento celular y la transcripción no cambiaron significativamente tras el tratamiento con DAPT o la atenuación de NACK se definieron como líneas celulares independientes de Notch/NACK.

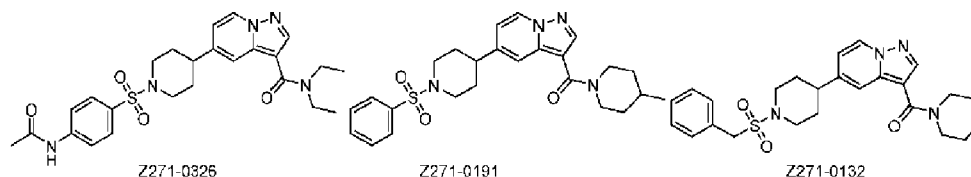
En estos experimentos se usó un ensayo de formación de colonias basado en células. Las células HC11 del epitelio mamario normal de ratón tienen poca o ninguna expresión endógena de NACK, y la atenuación de NACK no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las células HC11 (figura 5A, panel inferior). Por otro lado, la atenuación de NACK en la línea celular de adenocarcinoma de esófago OE33 mostró una inhibición significativa de la formación de colonias. La atenuación de NACK se confirmó mediante transferencia de Western y qPCR (figura 1D y 1E). Además, las líneas celulares OE33 respondieron al tratamiento con DAPT con inhibidor de gamma secretasa (GSI) con una reducción en la formación de colonias en comparación con las células tratadas de forma simulada, mientras que el tratamiento con DAPT no alteró la viabilidad de las células HC11 (figura 5B). Por lo tanto, se deseaban compuestos que afectaran a la formación de colonias OE33 pero no a HC11. Para cribar los compuestos, las células se trataron con compuestos de prueba cada dos días. Como se muestra en la figura 5B y 5C, los compuestos Z270-0137, Z271-0191 y Z271-0326 (representados a continuación) mostraron una potencia y selectividad notables, que pueden inhibir eficazmente la formación de colonias OE33 pero no de células HC11. Estos resultados sugirieron que un inhibidor competitivo de NACK afectaría a la viabilidad de las líneas celulares dependientes de Notch/NACK, mientras que tendría poco o ningún impacto en las células independientes de Notch/NACK.



Los inhibidores de NACK pueden inhibir selectivamente el reclutamiento de NACK en el complejo de transcripción de Notch

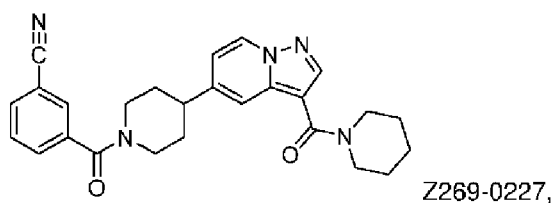
Anteriormente, se observaron NACK y Notch en el promotor Hes1 mediante el ensayo ChIP, lo que demuestra que Notch y NACK se pueden colocalizar en sitios CSL en la cromatina y respalda el modelo de que NACK es un componente del complejo regulador transcripcional de Notch. Véase Weaver, K.L. *et al.* Cancer Research 74, 4741-4751 (2014). Además, se demostró que se requiere la unión de ATP y la hidrólisis para impulsar la unión de NACK a Notch, CSL y Maml1 (figura 4B).

Para determinar si los inhibidores que eran selectivos en el ensayo de colonias podían inhibir el reclutamiento de NACK en el complejo de transcripción de Notch, se ensayaron los compuestos mediante el ensayo CSL-DAP. Se buscaron inhibidores que pudieran bloquear la unión de ATP a NACK, lo que dio como resultado una atenuación de la unión de NACK a N1ICD, Maml1 y CSL. Se encontró que Z271-0326, Z271-0191 y Z271-0132 (representados a continuación) inhibían drásticamente la unión de NACK al complejo de transcripción de NOTCH en comparación con el grupo de control (figura 6A).

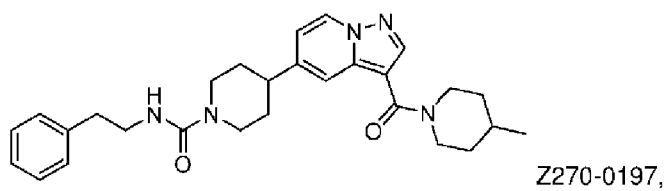
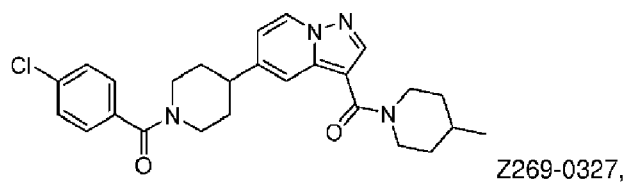
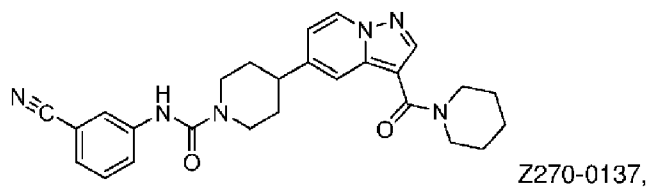


Sin embargo, aunque el compuesto Z271-0132 bloquea la unión de NACK al complejo ternario, no muestra selectividad entre las líneas celulares OE33 y HC11, lo que indica un posible efecto inespecífico de este compuesto. Para otros compuestos ensayados (representados a continuación), no hubo inhibición o fue mucho menos eficaz de

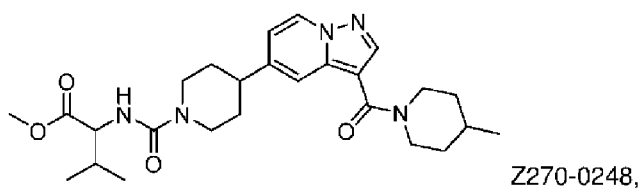
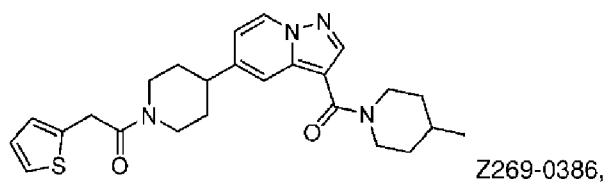
la unión de NACK al complejo de transcripción de NOTCH. Estos datos demuestran la naturaleza sólida de este cribado secundario para informar sobre el SAR a nivel bioquímico.



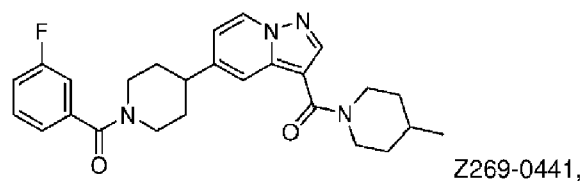
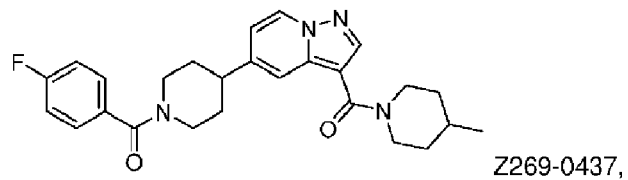
5

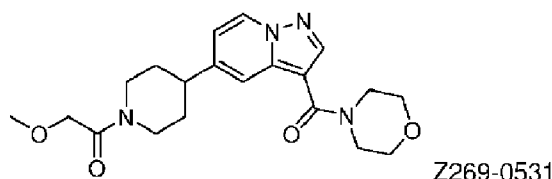
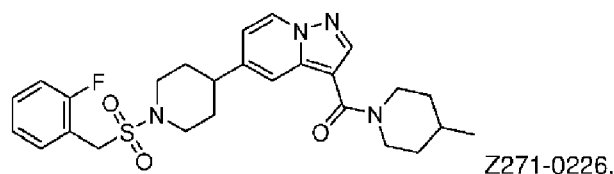
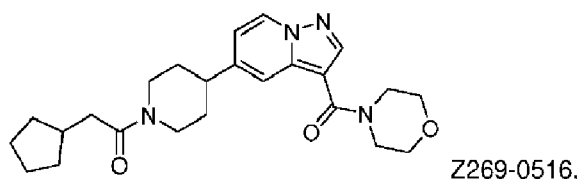


10



15





Los compuestos inhiben la activación transcripcional dirigida por Notch

Para explorar más a fondo los efectos de los inhibidores de NACK sobre la transcripción de los genes diana de Notch, se demostró que el tratamiento de OE33 con Z271-0191 y Z271-0326 disminuye los niveles de ARNm de los genes diana de Notch, Hes1 y Notch3 (figura 6B). Este resultado demuestra que los inhibidores atenúan eficazmente la actividad de NACK, lo que reguló negativamente aún más la actividad transcripcional mediada por Notch. Según el ensayo de valoración de formación de colonias, se estimó que la CE_{50} de Z271-0326 y Z271-0191 era de 1,05 y 3,74 μ M, respectivamente (figura 6C).

La formación de esferas secundarias se atenúa eficazmente mediante inhibidores

Se ensayaron dos compuestos realizando ensayos de esferas de tumor. En comparación con el grupo de vehículo, el tratamiento de OE33 con Z271-0326 mostró una disminución en la capacidad de las esferas celulares para formar esferas secundarias, lo que funciona de manera comparable con el grupo DAPT. Mientras que el compuesto Z271-0191 es menos eficaz en comparación con el Z271-0326 (figura 7A). El tratamiento de esferas de OE33 con Z271-0326 también afectó a la transcripción de los genes diana de Notch HES1, MYC, CCND1 y NACK (figura 7B).

Para explorar más a fondo el efecto de los inhibidores de NACK que se dirigen a la vía Notch, se construyó la expresión ectópica de Notch en células epiteliales mamarias HC11, ya que las células HC11 tienen poca o ninguna actividad Notch endógena. Además, las células HC11 son insensibles al tratamiento con DAPT o Z271-0326 como se muestra en el ensayo de formación de colonias anterior (figura 5B). Véase Weaver *et al.*, Cancer Research 74, 4741-4751 (2014). En comparación con el control, las células HC11/N1ICD mostraron una elevación de la transcripción del gen diana de Notch. El tratamiento con Z271-0326 inhibe la capacidad de las esferas de HC11/N1ICD para formar esferas secundarias (figura 7C). Además, el tratamiento de esferas de HC11/N1ICD con Z271-0326 también provoca una disminución en la expresión del gen HES1, así como en varios otros genes marcadores de células madre (ALDH1A1, SNAIL1 y TWIST1) (figura 7D). Por lo tanto, la transformación de células HC11 por Notch ahora hace que estas células dependan de la actividad Notch y sean sensibles a la inhibición de NACK por Z271-0326.

Los inhibidores de NACK bloquean la unión del complejo NOTCH-NACK en el promotor HES1

Para estudiar el mecanismo molecular mediante el cual NACK coactiva la activación transcripcional de Notch de los genes diana de Notch, se generaron líneas celulares estables OE33 que albergaban construcciones de ARN en horquilla corta (ARNhc) inducibles por doxiciclina (DOX). El análisis RT-qPCR se realizó en un clon celular 1A3 que expresaba ARNhc inducible por tet contra NACK, y se añadió DOX al medio de cultivo durante 72 h para agotar los niveles de proteína y ARNm de NACK (figura 8A). Se realizaron experimentos de RT-qPCR para determinar los efectos del agotamiento de NACK en la expresión del gen diana de Notch. Como control negativo se usó TBP (proteína de unión a TATA), que no es un gen diana de Notch. La expresión se normalizó con respecto a HPRT1. El agotamiento de NACK reduce la expresión de los genes diana de Notch HES1, HES5, NOTCH3 y CCND1 (figura 8A). Estos resultados indican que la inhibición de NACK bloquea la transactivación de Notch de genes diana. Para determinar aún más el mecanismo de acción de NACK en los genes diana de Notch, se realizaron experimentos de ChIP para medir la ocupación de Notch1, NACK y Pol II activado en el promotor HES1 después del agotamiento de NACK en el clon 1A3. Para medir la Pol II activada, se usó el anticuerpo contra Pol II pSer5 como marcador para la Pol II activa en el inicio de la transcripción. El agotamiento de NACK dio como resultado una profunda disminución

en las señales de ChIP de Notch1, NACK y Pol II pSer5 (figura 8B). Estos resultados indican que la inhibición de NACK por ARNhc disminuye la unión de Notch al promotor HES1 y bloquea el inicio de la transcripción.

Se encontró que la inhibición de NACK por el ARNhc atenúa la actividad Notch. Se realizaron experimentos para determinar si los inhibidores de NACK pueden inhibir la actividad de transcripción de Notch del promotor HES1, ya que la expresión de HES1 está regulada por el complejo de transcripción de N1ICD, MAML1 y CSL. Véase Nam, Y. *et al.*, Cell 124, 973-83 (2006). Para explorar esto, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) analizando el nivel de proteína de N1ICD y NACK en el promotor HES1. El tratamiento de células OE33 con GSI DAPT o Z271-0326 anuló la unión de N1ICD y NACK al promotor HES1 (figura 8C), lo que respalda que el inhibidor de NACK puede atenuar la actividad Notch en el promotor HES1. Además, el inhibidor de NACK Z271-0326 no solo bloquea la unión de los componentes Notch al promotor HES1, sino que también disminuye la formación del complejo de iniciación de la ARN polimerasa (Pol II pSer5) en el promotor HES1 (figura 8C). Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, estos datos indican que Z271-0326 bloquea la unión de NACK al promotor HES1 diana de NOTCH, lo que posiblemente causa una disminución del tiempo de residencia del complejo de activación de Notch en los promotores diana de Notch.

La inhibición de la vía Notch se asocia con la inducción de apoptosis y senescencia en líneas celulares de EAC

Para investigar cómo Z271-0326 inhibe el crecimiento celular en líneas celulares de EAC, se evaluó el efecto del tratamiento con Z271-0326 sobre la apoptosis. Las células OE33 se trataron con GSI DAPT o Z271-0326, y sus efectos sobre la apoptosis se analizaron en diversos puntos temporales después del tratamiento. El día 7 de tratamiento, los tratamientos con DAPT y Z271-0326 dan como resultado un aumento del doble y del triple en el porcentaje de células que experimentan apoptosis, respectivamente, en comparación con el control. Este resultado indicó que la inhibición de la vía Notch conduce a la muerte celular apoptótica, en células OE33 (figura 9A). De manera similar al tratamiento con DAPT, el tratamiento prolongado con Z271-0326 durante 3 semanas de células vivas de OE33 dio como resultado la inducción de senescencia celular, según lo medido por la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (figura 9B). Estos datos indican que la inhibición de la actividad NACK induce apoptosis y senescencia celular en un grado similar a GSI DAPT.

Caracterización de la interacción entre NACK y los inhibidores mediante SPR

La interacción entre el inhibidor Z271-0326 y la NACK diana se caracterizó usando resonancia de plasmón superficial (SPR). Para este fin, la NACK etiquetada con GST se capturó por un anticuerpo GST que se inmovilizó previamente en la superficie del chip mediante un acoplamiento de amida estándar. Las constantes de disociación asociadas con la unión de los compuestos a NACK se determinaron usando el enfoque de equilibrio, que consiste en representar gráficamente la respuesta de equilibrio (Req) en función de la concentración del compuesto y ajustar los datos a un modelo de unión 1:1. La constante de disociación asociada con la unión de Z271-0326 a NACK ($K_D = 0,89 \pm 0,07 \mu M$) es comparable a la afinidad observada para AMP-PNP, un análogo de ATP no hidrolizable ($K_D = 1,5 \pm 0,5 \mu M$), (figura 10A).

Los resultados iniciales del acoplamiento revelaron varias interacciones entre NACK y Z271-0326 (figura 10B y 10C). En el sitio activo de los residuos de NACK, se encontró que Lvs1022, His1095, Gln1046 y Tyr1019 formaban importantes enlaces de hidrógeno con Z271-0326. Para validar la importancia de estos residuos, los residuos Q1024 e Y999 se mutaron en NACK de ratón. La unión entre ATP y NACK mutado se evaluó mediante el ensayo CSL-DAP con o sin Z271-0326. Se encontró que Z271-0326 bloquea el reclutamiento de NACK en el complejo ternario de Notch cuando se usa WT NACK (figura 10D). Sin embargo, Y999F NACK y Q1024E NACK fueron insensibles a la inhibición por Z271-026 como lo indica la unión de NACK al complejo Notch en presencia o ausencia de Z271-0326.

Los inhibidores de NACK pueden suprimir el crecimiento tumoral en modelos PDX de adenocarcinoma de esófago (EAC)

Se empleó un modelo de xenoinjerto bien establecido para evaluar el efecto de Z271-0326 sobre la formación de tumores en un modelo animal usando PDX. En comparación con los xenoinjertos basados en líneas celulares, los modelos PDX representan mejor la diversidad del cáncer humano y son más representativos del tumor original. Véase Wang, Z. *et al.* Cancer Research 74, 6364-6374 (2014). Se construyeron dos modelos EAC PDX (EAC47 y EAC36) a partir de muestras de tumores de pacientes. Los ratones que albergaban tumores establecidos (aprox. 200 mm³) se trataron con DAPT (20 mg/kg) o Z271-0326 (25 mg/kg) diariamente mediante inyecciones intraperitoneales. El crecimiento de estos tumores fue atenuado significativamente por los ratones tratados con Z271-0326 a un nivel comparable con el de DAPT en comparación con el grupo tratado con vehículo (figura 11A, 11B y 11C). Además, el peso corporal de los grupos tratados no fue estadísticamente diferente del grupo tratado con vehículo (figura 11D). También se observó una disminución en el índice de proliferación en el grupo tratado con Z271-0326 en comparación con el grupo de control, medido mediante tinción con Ki67 (figura 11E). Estos resultados indican que Z271-0326 puede inhibir el crecimiento del tumor de adenocarcinoma de esófago dependiente de Notch.

Farmacocinética plasmática de Z271-0326

El perfil farmacocinético plasmático de Z271-0326 se investigó después de una única administración de dosis intravenosa e intraperitoneal en ratones macho C57 BL/6 (figura 12). Después de una única administración intravenosa de Z271-0326 a razón de 5 mg/kg, a ratones macho C57BL/6, el compuesto mostró un aclaramiento plasmático sistémico moderado (30 ml/min/kg, el flujo sanguíneo hepático normal en los ratones es 90 ml/min/kg) con una semivida de eliminación terminal de 0,23 h. El Vss fue similar al volumen normal de agua corporal total (0,7 l/kg). El Vss es un parámetro farmacocinético, que representa la distribución de volumen de un fármaco en el tejido corporal. Después de una única administración intraperitoneal de Z271-0326 a ratones macho C57 BL/6 a una dosis de 25 mg/kg, las concentraciones plasmáticas fueron cuantificables hasta 4 h con un T_{máx} de 0,25 h. Esta dosis fue MTD para los estudios de eficacia de 4 semanas que se muestran en los datos preliminares. Después de una única administración intraperitoneal de Z271-0326 a ratones macho C57 BL/6 a una dosis de 100 mg/kg, las concentraciones plasmáticas fueron cuantificables hasta 24 h con un T_{máx} de 1,00 h.

Efecto del inhibidor de NACK sobre la viabilidad celular

Para evaluar el efecto del inhibidor de NACK en la transcripción del gen diana de Notch, se trataron líneas celulares dependientes de Notch/NACK con inhibidores de NACK. Las células también se trataron con DAPT como control positivo. Las células tratadas con DMSO sirvieron como control de vehículo para la comparación. La expresión génica se normalizó con respecto a HPRT, y TBP sirvió como control negativo para validar la normalización. Como se muestra en la figura 14A, la figura 14B y la figura 15, los compuestos divulgados en el presente documento pueden inhibir eficazmente el número de colonias de células OE33. Efecto del inhibidor de NACK

sobre la viabilidad celular

Para evaluar el efecto del inhibidor de NACK en la transcripción del gen diana de Notch, se trataron líneas celulares dependientes de Notch/NACK con inhibidores de NACK. Las células también se trataron con DAPT como control positivo. Las células tratadas con DMSO sirvieron como control de vehículo para la comparación. La expresión génica se normalizó con respecto a HPRT, y TBP sirvió como control negativo para validar la normalización. Como se muestra en la figura 16, los análogos de NACK 7C y 7DA regulan negativamente los oncogenes cMYC, CCND1 y HES1 con respecto a DMSO y Z271-0326 (descritos previamente). Efecto del inhibidor de NACK sobre la viabilidad celular

Para evaluar la validez de los resultados del cribado del perfil de cinasa, se cribó Z271-0326 en el ensayo de cinasa LCK, MAP4K5 y TNIK. Como se muestra en la figura 17, Z271-0326 solo inhibe significativamente LCK de las tres cinasas mencionadas anteriormente

Efecto del inhibidor de NACK sobre la viabilidad celular. Como se muestra en la figura 18, la CE₅₀ de Z271-0326 es 1,27 µM, y los análogos 71C y 71B tienen una actividad mejorada con CE₅₀ a razón de 330 nM y 608 nM, respectivamente.

Ensayo de cinasa LCK

Para continuar impulsando la selectividad de análogos para NACK, se utilizó un ensayo de cinasa LCK como cribado inverso. Como se muestra en la figura 19, los compuestos descritos en el presente documento muestran una afinidad disminuida por LCK sobre Z271-0326.

Se puede encontrar orientación adicional para usar los compuestos de la divulgación en el apartado de Ejemplos, a continuación.

Formulaciones farmacéuticas

También se proporcionan en el presente documento formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de la divulgación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la divulgación se pueden administrar a un sujeto o paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Los compuestos se pueden administrar solos o como parte de una composición o formulación farmacéuticamente aceptable. Además, los compuestos se pueden administrar todos a la vez, como, por ejemplo, mediante una inyección en bolo, varias veces, por ejemplo, mediante una serie de comprimidos, o suministrados de manera sustancialmente uniforme durante un período de tiempo, como, por ejemplo, usando administración transdérmica. También se observa que la dosis del compuesto puede modificarse con el tiempo.

Los compuestos divulgados en el presente documento y otros compuestos farmacéuticamente activos, si se desea, se pueden administrar a un sujeto o paciente mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, rectal, parenteral, (por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravesical o como aerosol bucal, de inhalación o nasal. La administración puede ser para proporcionar un efecto sistémico (por ejemplo, enteral o parenteral). Se contemplan todos los métodos que puedan usar los expertos en la técnica para administrar un agente farmacéuticamente activo.

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente aceptables y polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. La contaminación por microorganismos se puede impedir añadiendo varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de las composiciones farmacéuticas inyectables puede realizarse utilizando agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente (o portador) habitual inerte, tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio o (a) cargas o expansores, como, por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, manitol y ácido silícico; (b) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; (c) humectantes, como, por ejemplo, glicerol; (d) agentes disgregantes, como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos complejos y carbonato de sodio; (e) retardadores de solución, como, por ejemplo, parafina; (f) acelerantes de la absorción, como, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) adsorbentes, como, por ejemplo, caolín y bentonita; y (i) lubricantes, como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y/o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas y comprimidos, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También pueden usarse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y granulados, se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros materiales conocidos en la técnica. Las formas farmacéuticas sólidas también pueden contener agentes opacificantes. Además, las formas farmacéuticas sólidas pueden ser composiciones de inclusión, de tal manera que liberen el uno o más compuestos activos en una determinada parte del tubo intestinal de manera retardada. Como ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras. El compuesto activo también puede estar en forma microencapsulada, opcionalmente con uno o más excipientes.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como, por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de semilla de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias, y similares.

Además de dichos diluyentes inertes, la composición también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes. Las suspensiones, además del compuesto activo, pueden contener agentes de suspensión, como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

Las composiciones para administración rectal son preferentemente supositorios, que pueden prepararse mezclando los compuestos de la divulgación con excipientes o portadores no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperatura ambiente ordinaria, pero líquidos a temperatura corporal, y por lo tanto, se fundirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el componente activo.

Los compuestos de la divulgación se pueden administrar a un sujeto o paciente a niveles de dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3.000 mg al día. Para un ser humano adulto normal con un peso corporal de aproximadamente 70 kg, por lo general bastará una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal. La dosificación y el intervalo de dosificación que se usarán pueden depender posiblemente de diversos factores, incluyendo los requisitos del sujeto o paciente, la gravedad de la afección o enfermedad que se está tratando y la actividad farmacológica del

compuesto que se está administrando. La determinación de intervalos de dosificación y dosis óptimas para un sujeto o paciente particular está dentro del conocimiento habitual en la técnica.

En jurisdicciones que prohíben patentar métodos que se lleven a cabo en el cuerpo humano, el significado de "administrar" una composición a un sujeto humano o paciente deberá restringirse a la prescripción de una sustancia controlada que un sujeto humano o paciente se autoadministrará por cualquier técnica (por ejemplo, por vía oral, inhalación, aplicación tópica, inyección, inserción, etc.). Se pretende que la interpretación más amplia razonable sea coherente con las leyes o normativas que definen la materia objeto patentable. En jurisdicciones que no prohíben patentar métodos que se lleven a cabo en el cuerpo humano, la "administración" de composiciones incluye ambos métodos realizados en el cuerpo humano y también las anteriores actividades.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Líneas celulares

Se obtuvieron OE19 y OE33, líneas celulares de adenocarcinoma de esófago humano, en la Colección Europea de Cultivos Celulares. Las líneas celulares 293T y HC11 se obtuvieron en la ATCC. Todas las líneas celulares se propagaron en medios de crecimiento según lo especificado por el proveedor.

Análisis de inmunoprecipitación de cromatina ("ChIP")

Se trataron células dependientes de Notch/NACK con DAPT como control positivo, DMSO (vehículo) como control negativo, o compuestos para cribado durante 24 horas. Después del tratamiento, las células se entrecruzaron y se sometieron a sonicación para producir fragmentos de cromatina de aproximadamente 500 pb, como se ha descrito previamente (véase Weaver *et al.*, Cancer Research 74, 4741-4751 (2014)). Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos α -Notch1 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX; A301-894A), α -Maml1 (Cell Signaling, 12166s), α -NACK (Bethyl Laboratories, A302-675A) o α -PolII pSer5 (Abcam, ab5131). Los inmunoprecipitados de ADN se limpiaron usando el kit de purificación por PCR (Qiagen). El ADN se detectó mediante qPCR Syber green usando cebadores oligonucleotídicos específicos de *HES1* (directo: 5'CGTGTCTCCTCCTCCATT3' (SEQ ID NO: 2); inverso: 5'GGGGGATTCCGCTGTTAT3' (SEQ ID NO:3)).

Análisis de RT-qPCR.

La transcripción inversa y el análisis de qPCR se realizaron como se ha descrito previamente (véase Weaver *et al.*, Cancer Research 74, 4741-4751 (2014)). La expresión génica se normalizó con respecto al gen de la proteína de unión a TATA ("TBP"). Como control, también se controló la expresión del gen hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 ("HPRT").

Ensayo de colonias

Se utilizó el ensayo de formación de colonias para determinar el efecto de inhibidores de moléculas pequeñas sobre la proliferación celular. En general, se sembrarán diferentes líneas celulares (dependientes o independientes de NACK) en placas de 6 pocillos a una densidad de 2000 células por pocillo y se dejarán unirse durante una noche. El tratamiento con inhibidor comenzó 24 horas después de la siembra y, posteriormente, el medio que contenía el inhibidor se cambió cada 48 horas. Después de 168 horas, las colonias se tiñeron con Crystal Violet (Millipore) y se contaron.

Ensayo de precipitación por afinidad de ADN CSL (CSL-DAP)

Para determinar la especificidad de los compuestos candidatos que se dirigen a la actividad NACK, se evaluó si iNACK puede bloquear la unión de NACK al complejo Notch realizando un ensayo de precipitación por afinidad de ADN-CSL (CSL-DAP). En este ensayo se evaluaron adicionalmente los compuestos que mostraron inhibición selectiva en líneas celulares dependientes de NACK/Notch. En el ensayo CSL-DAP, las células 293T se cotransfectaron con N1^{ICD}, Maml1 y NACK. Las transfecciones se realizaron usando el reactivo de transfección LipoJet (SL100468, SignaGen Laboratories) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Después de dos días de transfección, las células se trataron con compuestos durante 2 horas antes de recoger el lisado celular. Los lisados celulares se incubaron con perlas de ADN de estreptavidina. Las proteínas que se unieron a las perlas se analizaron mediante transferencia de Western.

Transferencia de Western

La transferencia de Western se realizó como se ha descrito previamente (véase Weaver *et al.*, Cancer Research 74, 4741-4751 (2014)). Los anticuerpos primarios fueron α -NACK (1:1000; contra aa209-287 de NACK y purificado por

afinidad), α -CSL (1:1.000; generado contra CSL de longitud completa y purificado por afinidad), α -Mam11 (1:5.000; Cell Signaling Technology), Notch1 α -escindido (1:1.000; Cell Signaling Technology).

Ensayo de formación de esferas tumorales

5 Para evaluar el efecto del ataque a los compuestos candidatos sobre la proliferación de una población de tipo células madre de células dependientes de Notch/NACK, las esferas tumorales primarias se trataron con inhibidor de NACK y se permitió que las células se propagaran como cultivos secundarios. Para obtener esferas tumorales, las células se cultivaron en DMEM/F12 con un complemento sin suero B-27 al 2 % (17604-044; Invitrogen), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF; PHG0311L; Invitrogen), y 20 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF; PHG0266; Invitrogen) durante 14 días. Las esferas tumorales resultantes se examinaron y se contaron bajo el microscopio. Además, las esferas tumorales se recogieron para un análisis adicional de RT-qPCR para ensayar el efecto de los compuestos candidatos en los genes diana de tipo troncal.

Determinación de la afinidad de los inhibidores líder con respecto a la proteína diana

Se utilizó un kit de captura de GST (GE Healthcare) para inmovilizar covalentemente un anticuerpo anti GST, proporcionado en el kit, en la superficie del chip sensor (chip CM5, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La captura se realizó inyectando GST-NACK (1 μ g/ μ l) sobre el anticuerpo anti GST inmovilizado en tampón Hepes (Hepes 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, NP-40 al 0,0005 %) durante 7 min a 10 μ l/min. Se preparó una celda de flujo de referencia capturando GST siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La captura de GST dio como resultado un valor inicial estable. Los experimentos se realizaron en un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) a 25 °C. Los inhibidores de moléculas pequeñas que se unen a NACK se realizaron en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM y DMSO al 5 % (tampón de análisis). La señal SPR que surge de la muestra se corrigió por su respectivo control que contenía DMSO. La visualización y el análisis de datos se realizaron usando el software Biacore T200 (GE Healthcare) y Origin 8.0 (OriginLab).

Farmacocinética plasmática de Z271-0326

30 El perfil farmacocinético plasmático de Z271-0326 se investigó después de una única administración de dosis intravenosa e intraperitoneal en ratones macho C57 BL/6.

Eficacia en modelos de ratón y análisis de biomarcadores *in vivo*

35 Se emplearon modelos PDX para determinar el efecto de los candidatos líder sobre el crecimiento tumoral. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 200 mm³, los grupos correspondientes se trataron con vehículo (DMSO) o con el compuesto líder mediante inyección IP a diario.

Ensayo de cinasa ADP-Glo

40 El ensayo de cinasa ADP-Glo se realizó usando un enlace de cinasa ADP-Glo™ (Promega, V6930) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante.

Ensayos de apoptosis celular y senescencia celular

45 Para investigar cómo Z271-0326 inhibe el crecimiento celular en líneas celulares de EAC, se evaluó el efecto del tratamiento con Z271-0326 sobre la apoptosis. OE33 se trató con GSI DAPT o Z271-0326 en días alternos y se analizaron sus efectos sobre la apoptosis. El día 7 de tratamiento, la apoptosis celular se analizó utilizando el kit FITC Annexina V/apoptosis de células muertas con FIFC Annexina V y PI para citometría de flujo (Invitrogen, V13242).

50 Después de un tratamiento prolongado con Z271-0326 o DAPT durante 3 semanas de células vivas de OE33, se midieron las células mediante la actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (kit de tinción de β -galactosidasa de senescencia, Cell Signaling, n.º 9860).

Ejemplos de síntesis

Ejemplo 1. Síntesis de 5-(1-((4-acetamidofenil)sulfonyl)piperidin-4-il)-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (Z271-0326)



5 Preparación de Boc-4-piridin-4-il-piperidina (2)

10 durante 2 horas. En este punto, todo el material de partida se había convertido como se observa por TLC. La
reacción se lavó con agua dos veces y una vez más con salmuera, se secó con sulfato de sodio y se concentró al
vacío. El producto se purificó a través de cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de EtOAc/hexano de 50/50.
El rendimiento fue del 90 %, 1,50 g, aceite de color amarillo. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,52 (dd, J = 4,3,
1,9 Hz, 2H), 7,16-7,09 (m, 2H), 4,26 (s, 2H), 2,80 (t, J = 12,5 Hz, 2H), 2,69-2,59 (m, 1H), 1,83 (d, J = 13,1 Hz, 2H),
15 1,68-1,53 (m, 2H), 1,48 (s, 9H). *m/z*: 263,2 [M+H].

Preparación de N-Boc-O-(mesitilsulfonil)hidroxilamina (N-Boc-MSH)

20 purgado con argón y se disolvió en éter (18 ml), seguido de la adición de N-Boc-hidroxilamina (1,47 g, 11,00 mmol). El matraz se enfrió a 0 °C y, a continuación, se añadió gota a gota TEA (1,3 ml). La reacción se agitó durante 2 horas a 0 °C, en la que todo el material de partida se había convertido como se observa por TLC. El TEA-Cl, sólido de color blanco, se filtró y se lavó con éter. El filtrado se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía

ultrarrápida en gradiente de EtOAc/hexano de 25/75. El rendimiento fue cuantitativo, 2,16 g, sólido de color blanco. ^1H RMN: (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,77 (1H, s), 6,98 (2H, s), 2,66 (6H, s), 2,31 (3H, s), 1,30 (9H, s). ^{13}C RMN: (100 MHz, CDCl_3) δ 154,5, 144,7, 142,2, 131,9, 128,7, 84,1, 27,9, 23,4, 21,4. m/z : 315,0 [M+H].

5 Preparación de O-mesitilenosulfonilhidroxilamina (MSH)

Se añadió TFA (2,1 ml) a un matraz de fondo redondo secado a la llama y purgado con argón y se enfrió a 0°C. Se añadió en 2 porciones N-Boc-O-(mesitilsulfonil)hidroxilamina (500 mg, 2,1 mmol), y la reacción se agitó a 0°C durante dos horas. Después de esto, todo el material de partida se había convertido, como se observa por TLC. Se añadió hielo y agua fría a la reacción para precipitar MSH. La MSH se filtró, se lavó con agua fría y se secó a alto vacío durante una noche para eliminar el exceso de TFA y agua. No fue necesaria purificación adicional. El compuesto es un sólido de color blanco, con un rendimiento cuantitativo de 422 mg. ^1H RMN: (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,00 (s, 2H), 4,80 (s, 3H), 2,65 (s, 6H), 2,33 (s, 3H). ^{13}C RMN: (100 MHz, CDCl_3) δ 21,1, 22,7, 128,9, 131,7, 141,0, 143,9.

Procedimiento general para (3)

Se disolvió Boc-4-piridin-4-il-piperidina en DMF (3,8 ml) y se añadió a un matraz de fondo redondo secado a la llama y purgado con argón. Se añadió en dos porciones MSH (535 mg, 2,5 mmol) y la reacción se agitó a TA durante dos horas. Después de esto, se añadió prop-2-inoato de metilo (170 μl , 1,9 mmol) seguido de K_2CO_3 (264 mg, 1,91 mmol). La reacción se agitó durante 2 días a TA y a continuación se diluyó con agua y se extrajo tres veces con DCM. El compuesto se purificó a través de cromatografía ultrarrápida y se eluyó con una mezcla 1:1 de EtOAc y hexanos. Las fracciones se concentraron al vacío y se secaron a alto vacío durante una noche.

Preparación de 4-[3-(metoxycarbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (3A): Rendimiento: 53 %, sólido de color naranja claro. ^1H RMN: (400 MHz, Acetonitrilo- d_3) δ 8,51 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 6,98 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,21 (d, J = 13,3 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,85 (m, J = 14,8, 13,1 Hz, 3H), 1,87 (d, J = 14,0 Hz, 3H), 1,65-1,53 (m, 3H), 1,48-1,42 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, Cloroformo- d) δ 164,06, 154,88, 146,28, 145,29, 141,21, 129,20, 115,69, 113,92, 103,16, 79,86, 51,35, 42,47, 28,60. m/z : 360,19 [M+H].

Preparación de 4-[3-(etoxycarbonil)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (3B): 40 % de rendimiento, sólido de color amarillo claro. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ 8,47 (dd, J = 7,5, 3,2 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 6,97 (d, J = 2,1 Hz, 0H), 4,49-4,36 (m, 2H), 2,93-2,68 (m, 3H), 1,91 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,69 (t, J = 12,6 Hz, 2H), 1,61-1,55 (m, 3H), 1,51 (s, 4H), 1,43 (dc, J = 6,7, 3,3 Hz, 2H).

Preparación de 4-[3-(metoxycarbonil)-2-metilpirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (3C): 34 % de rendimiento, sólido de color amarillo claro, ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ 8,34 (d, J = 7,0 Hz, 0H), 7,89 (s, 0H), 6,76 (d, J = 7,1 Hz, 0H), 4,13 (cd, J = 7,2, 2,2 Hz, 1H), 3,93 (s, 1H), 1,89 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 1,72-1,65 (m, 1H), 1,50 (s, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, Cloroformo- d) δ 164,81, 156,10, 154,81, 145,99, 142,47, 128,42, 115,56, 113,24, 100,69, 79,78, 51,06, 42,44, 28,55, 14,51. m/z : 374,21 [M+H].

Procedimiento general para (4)

Se disolvió 4-[3-(metoxycarbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (204 mg, 0,56 mmol) en una mezcla de disolventes 2:1:2 de THF: MeOH: agua (2,25 ml, 1,5 ml, 2,25 ml) y se añadió a un matraz de fondo redondo lleno de argón, equipado con un condensador de reflujo. Se añadió LiOH (13 mg, 0,56 mmol) y la reacción se calentó a 60 °C y se agitó a esta temperatura durante 4 horas. Después de esto, todo el material de partida se había convertido, como se observa por TLC. A la reacción se le añadió DCM y a continuación se lavó 2 veces con HCl 1 M, seguido de agua. Los extractos acuosos se combinaron y se extrajeron una vez más con DCM. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera, seguido de secado con Na_2SO_4 y a continuación se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con una mezcla de disolventes 70:30 de EtOAc/hexanos.

Preparación de ácido 5-{1-[(*terc*-butoxi)carbonil]piperidin-4-il}pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxílico (4A): 88 % de rendimiento, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ 8,39 (dd, J = 7,4, 2,8 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,96 (s, 1H), 6,75 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 4,27 (s, 2H), 3,66-3,50 (m, 3H), 2,78 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 2,74-2,68 (m, 0H), 1,87 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,67 (s, 1H), 1,48 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, Cloroformo- d) δ 169,27, 155,20, 146,47, 141,95, 129,71, 116,28, 114,53, 102,99, 80,24, 42,84, 32,82, 28,93. m/z : 344,05 [M+H].

Preparación de ácido 5-{1-[(*terc*-butoxi)carbonil]piperidin-4-il}-2-metilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxílico (4B): 78 % de rendimiento, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ 8,38 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 7,98 (s, 1H), 6,80 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 4,30 (s, 1H), 2,92-2,76 (m, 3H), 2,71 (s, 3H), 1,90 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 1,69 (c, J = 12,2, 11,6 Hz, 2H), 1,50 (s, 9H). ^{13}C RMN (100 MHz, Cloroformo- d) δ 169,40, 157,11, 154,85, 146,69, 143,07, 128,60, 115,95, 113,54, 100,05, 79,83, 77,31, 42,54, 28,57. m/z : 360,19 [M+H].

Preparación de ácido 5-{1-[(*terc*-butoxi)carbonil]piperidin-4-il}-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxílico (4C):

Rendimiento: 75 %, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,51 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,01 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,33 (s, 1H), 2,85 (t, J = 12,9 Hz, 3H), 1,92 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 1,70 (c, J = 11,3 Hz, 2H), 1,50 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 168,74, 168,70, 154,57, 147,72, 129,03, 122,68 (c, J = 3,8) Hz 116,71, 115,56, 79,72, 77,16, 77,16, 76,84, 76,52, 42,34, 32,10, 28,29. m/z : 436,15 $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

5

Procedimiento general para (5)

Se disolvió ácido 5-{1-[(*terc*-butoxi)carbonil]piperidin-4-il}pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxílico (75 mg, 0,22 mmol) en DCM (2,2 ml) y se añadió en un matraz de fondo redondo lleno de argón. Se añadieron HOBt (60 mg, 0,44 mmol), EDCi (68 mg, 0,44 mmol) y dietilamina (34 μl , 0,33 mmol) al matraz en ese orden. La reacción se agitó a TA durante una noche, después de lo cual todo el material de partida se había convertido, como se observa por TLC. A la reacción se le añadió DCM y a continuación se lavó 2 veces con NaOH 1 M, seguido de agua. Los extractos acuosos se combinaron y se extrajeron una vez más con DCM. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera, seguido de secado con Na_2SO_4 y a continuación se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con una mezcla de disolventes 60:40 de EtOAc/hexanos.

4-[3-(dietilcarbamoil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5A): 75 % de rendimiento, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Acetonitrilo- d_3) δ 8,45 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 6,89 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 4,26-4,11 (m, 2H), 3,64-3,45 (m, 4H), 2,81 (d, J = 15,9 Hz, 3H), 1,56 (dd, J = 12,6, 4,4 Hz, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,23 (td, J = 7,1, 2,7 Hz, 7H); ^{13}C RMN (100 MHz, Cloroformo-d) δ 164,45, 154,81, 144,41, 141,93, 141,13, 128,46, 116,44, 113,59, 106,14, 79,75, 42,38, 32,49, 28,60. m/z : 401,25 $[\text{M}+\text{H}]$.

4-[3-(dietilcarbamoil)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5B): 89 % de rendimiento, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,41 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,85 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 2,89-2,76 (m, 2H), 2,71 (t, J = 12,4 Hz, 1H), 1,85 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 1,74-1,53 (m, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,33-1,22 (m, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, Cloroformo-d) δ 162,41, 154,51, 144,24, 140,42 (d, J = 37,5 Hz), 138,69, 128,47, 122,26, 119,57, 114,84, 113,83, 106,10, 79,62, 77,05, 41,93, 32,05, 28,26, 20,89. m/z : 469,24 $[\text{M}+\text{H}]$.

4-[3-(dietilcarbamoil)-2-metilpirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5C): 74 % de rendimiento, aceite de color amarillo. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,28 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,61 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 3,49 (d, J = 7,4 Hz, 3H), 2,80 (t, J = 13,1 Hz, 1H), 2,66 (t, J = 12,2 Hz, 1H), 2,46 (s, 3H), 1,84 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 1,60 (c, J = 15,7, 13,9 Hz, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,26 (d, J = 7,5 Hz, 3H), 1,16 (d, J = 7,4 Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 165,95, 154,83, 150,51, 143,38, 139,49, 128,03, 113,20, 112,04, 105,96, 79,75, 77,43, 60,48, 42,21, 32,45, 28,54, 21,14, 14,28, 14,00, 13,02. m/z : 437,25 $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

4-[3-(metilcarbamoil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5D): Rendimiento: 95 %, sólido de color blanco; ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 6,77 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 4,26 (d, J = 13,4 Hz, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,89-2,67 (m, 3H), 1,86 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,65 (c, J = 13,2, 12,6 Hz, 2H), 1,48 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 164,57, 155,15, 145,44, 141,20, 140,98, 128,97, 116,53, 114,08, 106,66, 77,16, 42,69, 32,77, 28,90, 26,56. m/z : 359,10 $[\text{M}+\text{H}]$.

4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5G): 75 % de rendimiento. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,41 (s, 1H), 8,15 (s, 2H), 6,78 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 4,26 (d, J = 13,5 Hz, 1H), 3,74 (d, J = 31,6 Hz, 4H), 2,88-2,63 (m, 4H), 1,99 (d, J = 17,8 Hz, 4H), 1,86 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,64 (c, J = 13,9, 13,5 Hz, 2H), 1,48 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 154,79, 144,89, 141,96, 141,91, 131,69, 128,37, 126,61, 124,87, 116,84, 113,90, 106,58, 100,00, 79,73, 77,43, 77,11, 76,79, 42,31, 32,42. m/z : 399,24 $[\text{M}+\text{H}]$.

4-[3-(piperidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5J): ^1H RMN (500 MHz, Cloroformo-d) δ 8,41 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 8,15 (s, 2H), 6,76 (dd, J = 7,1, 1H), 4,30 (d, J = 12,5, 2H), 3,85 (t, J = 31,6 Hz, 4H), 3,18-3,02 (m, 3H), 2,01 (d, J = 13,0, 2H), 1,82-1,75 (m, 1H), 1,79-1,69 (m, 7H), 1,68-1,64 (m, 1H), 1,47 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, Cloroformo-d) δ 155,63, 147,76, 142,66, 142,26, 131,37, 130,37, 125,73, 113,37, 79,77, 78,73, 77,43, 40,29, 38,32, 29,55, 26,33, 25,43, 24,26. m/z : 413,15 $[\text{M}+\text{H}]$.

4-(3-(4-metilpiperidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5M): ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,38 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 6,74 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,45 (d, J = 12,9 Hz, 2H), 4,26 (s, 2H), 2,99 (d, J = 13,2 Hz, 2H), 2,76 (dt, J = 34,9, 12,7 Hz, 3H), 1,87 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,68 (dt, J = 37,7, 13,0 Hz, 5H), 1,47 (s, 9H), 1,24 (p, J = 13,4, 12,1 Hz, 2H), 0,99 (t, J = 5,0 Hz, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 164,46, 155,12, 144,63, 142,31, 141,64, 116,16, 113,81, 106,25, 80,07, 77,80, 77,48, 77,16, 42,64, 34,89, 32,77, 31,77, 29,02, 28,95, 28,87, 28,80, 22,25. m/z : 427,20 $[\text{M}+\text{H}]$.

4-(3-(3,5-dimetilpiperidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5P): ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 6,74 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,26 (s, 2H), 3,76 (d, J = 12,2 Hz, 1H), 3,55-3,06 (m, 0H), 2,86-2,66 (m, 3H), 2,00 (s, 1H), 1,87 (d, J = 12,4 Hz, 3H), 1,79-1,56 (m, 5H), 1,49 (t, 1H), 1,47 (s, 9H), 0,93 (dd, J = 16,8, 6,7 Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 163,85, 154,77, 144,31, 141,98, 141,32, 128,51, 128,49, 115,77, 113,51, 105,93, 79,72, 77,44, 77,13, 76,81, 42,66, 42,28,

39,72, 32,45, 32,43, 28,55, 19,14, 18,26, 14,29. *m/z*: 441,20 [M+H].

4-(3-(bencilcarbamoyl)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5S): ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,40-8,36 (m, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,9 Hz, 4H), 7,29-7,24 (m, 1H), 6,77 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,26 (s, 1H), 4,64 (s, 2H), 4,25 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), 2,76 (dt, *J* = 24,1, 12,3 Hz, 3H), 1,86 (d, *J* = 13,2 Hz, 2H), 1,65 (c, *J* = 13,3, 12,3 Hz, 3H), 1,47 (s, 9H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-*D*) δ 163,40, 154,81, 145,34, 141,09, 140,69, 138,74, 128,85, 128,71, 127,69, 127,64, 116,33, 113,88, 106,05, 79,79, 77,16, 43,47, 42,41, 36,77, 32,46, 28,60, 24,90, 23,52. *m/z*: 457,22 [M+Na⁺].

4-(3-(azepano-1-carbonil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il)piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5V): ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,39 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 6,75 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,26 (d, *J* = 13,4 Hz, 2H), 3,73 (s, 4H), 2,76 (dt, *J* = 26,0, 12,6 Hz, 3H), 1,86 (d, *J* = 11,9 Hz, 6H), 1,65 (d, *J* = 13,1 Hz, 6H), 1,47 (s, 9H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-*D*) δ 164,99, 154,75, 144,36, 141,90, 141,54, 128,39, 116,46, 113,54, 106,28, 79,68, 77,43, 77,11, 76,80, 42,34, 32,45, 28,55. *m/z*: 449,25 [M+Na⁺].

Procedimiento general para (6)

Se disolvió 4-[3-(dietilcarbamoyl)pirazolo[1,5-*a*]piridin-5-il]piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (100 mg, 0,25 mmol) en DCM (250 µl) y se añadió a matraz de fondo redondo purgado con argón. Se añadió TFA (2,5 ml) al matraz y se agitó a TA durante 1 h. La reacción se diluyó con DCM y se añadió NaOH 1 M hasta que la solución acuosa se volvió básica. La capa acuosa se extrajo 3 veces con DCM. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera, seguido de secado con Na₂SO₄ y a continuación se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con una mezcla de disolventes 10:90 de MeOH:DCM.

N,N-dietil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6A): 87 % de rendimiento, 66 mg, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,38 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 6,78 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,59 (d, *J* = 7,1 Hz, 4H), 3,23 (d, *J* = 12,2 Hz, 2H), 2,74 (c, *J* = 15,6, 14,1 Hz, 3H), 2,48 (s, 1H), 1,89 (d, *J* = 12,9 Hz, 2H), 1,69 (c, *J* = 12,5, 11,0 Hz, 2H), 1,34-1,25 (m, 7H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-*D*) δ 164,84, 145,37, 142,16, 141,41, 128,74, 116,64, 113,85, 106,42, 77,79, 77,48, 77,44, 77,16, 46,98, 42,80, 33,64, 30,13, 14,27. *m/z*: 301,05 [M+H].

Los siguientes compuestos se usaron en la etapa 7 sin caracterización adicional: N,N-dietil-2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6B). N,N-dietil-5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6C). N-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6D). N,2-dimetil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6E). N-metil-5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6F). 5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il(pirrolidin-1-il)metanona (6G). 2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il(pirrolidin-1-il)metanona (6H). 5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il(pirrolidin-1-il)metanona (6I). piperidin-1-il(5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6J). (2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)(piperidin-1-il)metanona (6K). piperidin-1-il(5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6L). azepan-1-il(5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6M). azepan-1-il(2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6N). azepan-1-il(5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6O). N-bencil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6P). N-bencil-2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6Q). N-bencil-5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (6R). (4-metilpiperidin-1-il)(5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6S). (2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)(4-metilpiperidin-1-il)metanona (6T). (4-metilpiperidin-1-il)(5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6U). (3,5-dimetilpiperidin-1-il)(5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6V). (3,5-dimetilpiperidin-1-il)(2-metil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6W). (3,5-dimetilpiperidin-1-il)(5-(piperidin-4-il)-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)metanona (6X).

Procedimiento general para (7)

Se disolvió N,N-dietil-5-(piperidin-4-il)pirazolo[1,5-*a*]piridin-3-carboxamida (82 mg, 0,27 mmol) en DCM (900 µl, 0,3 M) y se añadió a un matraz de fondo redondo secado a la llama y purgado con argón. El matraz se enfrió a 0 °C y se añadió TEA (90 µl), seguido de cloruro de 4-acetamidobencenosulfonilo y se agitó a TA durante 1 h. La reacción se diluyó con más cantidad de DCM y se lavó dos veces con agua. Los extractos acuosos se combinaron y se extrajeron de nuevo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera, seguido de secado con Na₂SO₄ y a continuación se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con una mezcla de disolventes 10:90 de MeOH:DCM.

Z231-0326: 78 % de rendimiento, sólido de color blanco. ¹H RMN: (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,40 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,85-7,66 (m, 6H), 6,71 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,13 (dd, *J* = 7,0, 1,1 Hz, 1H), 3,98 (d, *J* = 11,7 Hz, 2H), 3,61 (c, *J* = 7,1 Hz, 3H), 2,55-2,39 (m, 3H), 2,24 (s, 3H), 1,88 (d, *J* = 13,0 Hz, 2H), 1,76 (d, *J* = 13,7 Hz, 2H), 1,32 (t, *J* = 7,2 Hz, 5H), 1,29 (dd, *J* = 2,4, 1,2 Hz, 1H), 1,26 (s, 6H). ¹³C RMN (100 MHz, Cloroformo-*d*) δ 164,22, 143,50, 141,47, 143,11, 140,86, 132,89, 129,53, 128,33, 128,29, 127,56, 116,37, 112,69, 105,99, 46,21, 41,19, 31,56, 21,41. *m/z*: 497,0 [M+H].

- 5 N,N-dietil-5-[1-(4-metilbencenosulfonil)piperidin-4-il]pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7A): 63 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,38 (dd, $J = 7,3, 2,2$ Hz, 1H), 8,01 (dd, $J = 3,8; 2,0$ Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,67 (ddd, $J = 8,1, 3,8, 2,0$ Hz, 2H), 7,38-7,30 (m, 2H), 6,69 (ddt, $J = 5,7, 3,9, 2,0$ Hz, 1H), 3,93 (d, 2H), 3,57 (tt, $J = 9,3, 5,9$ Hz, 4H), 2,51 (tt, $J = 11,7, 3,8$ Hz, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,34 (tc, $J = 8,8, 2,9$ Hz, 2H), 1,96-1,78 (m, 4H), 1,33-1,22 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, Cloroformo-d) δ 164,22, 143,50, 141,47, 143,11, 140,86, 132,89, 129,53, 128,33, 128,29, 127,56, 116,37, 112,69, 105,99, 46,21, 41,19, 31,56, 21,41. m/z : 455,21 [M+H].
- 10 N-[4-({4-[3-(dietilcarbamoil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]carbamato de metilo (7C): 44 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,75 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,17 (s, 1H), 6,70 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 3,95 (d, $J = 11,7$ Hz, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,60 (c, $J = 7,1$ Hz, 4H), 2,51 (t, $J = 12,0$ Hz, 1H), 2,42 (t, $J = 11,3$ Hz, 2H), 1,89 (d, $J = 13,1$ Hz, 2H), 1,79 (c, $J = 12,1$ Hz, 2H), 1,31 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, Cloroformo-d) δ 164,76, 154,02, 143,83, 142,72, 142,13, 141,55, 130,98, 129,53, 128,98, 118,83, 116,92, 113,58, 106,58, 53,20, 46,89, 41,84, 32,00. m/z : 514,21 [M+H].
- 20 N-[4-({4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7H): 44 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,40 (dd, $J = 7,1, 0,9$ Hz, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,85-7,66 (m, 4H), 6,73 (dd, $J = 7,2; 2,1$ Hz, 1H), 3,97 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H), 3,81-3,70 (m, 4H), 2,50 (c, $J = 14,0, 12,4$ Hz, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,04-1,95 (m, 4H), 1,85 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), 1,79-1,66 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 164,27, 154,80, 144,39, 141,90, 141,18, 138,42, 128,51, 126,64, 124,83, 115,68, 113,49, 109,96, 105,72, 79,76, 77,43, 42,25, 32,40, 28,55, 26,33, 24,80. m/z : 496,10 [M+H].
- 25 N-[4-({4-[3-(piperidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7M): 80 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,38 (dd, $J = 7,2, 0,9$ Hz, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,92-7,69 (m, 4H), 7,66 (s, 1H), 6,69 (dd, $J = 7,2; 2,0$ Hz, 1H), 3,96 (d, $J = 11,8$ Hz, 2H), 3,71 (t, $J = 5,4$ Hz, 4H), 2,47 (ddd, $J = 23,6, 12,8, 9,5$ Hz, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,87 (d, $J = 13,1$ Hz, 2H), 1,84-1,61 (m, 8H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 169,06, 164,21, 143,53, 142,56, 142,03, 141,12, 131,12, 128,97, 128,79, 119,74, 115,78, 113,26, 77,48, 77,16, 77,16, 76,84, 46,54, 41,39, 31,61, 26,38, 24,82, 24,74. m/z : 510,20 [M+H].
- 30 N-[4-({4-[3-(azepano-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7R): 68 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,93 (s, 1H), 7,83 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,17 (c, $J = 8,6$ Hz, 5H), 6,15 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 3,37 (d, $J = 11,7$ Hz, 2H), 3,17 (s, 4H), 1,96-1,80 (m, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,30 (d, $J = 9,6$ Hz, 6H), 1,21 (t, $J = 13,4$ Hz, 3H), 1,08 (s, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 168,83, 164,86, 143,32, 142,35, 141,36, 141,31, 130,69, 128,63, 128,38, 119,43, 116,05, 113,05, 105,97, 77,16, 50,66, 46,23, 41,11, 31,30, 24,39. m/z : 524,23 [M+H].
- 40 N-[4-({4-[3-(3,5-dimetilpiperidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7W): 78 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,40 (dd, $J = 7,2, 1,1$ Hz, 1H), 8,00 (dd, $J = 5,6; 1,0$ Hz, 1H), 7,83-7,63 (m, 5H), 6,70 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 3,97 (d, $J = 12,1$ Hz, 2H), 3,76 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), 2,49 (dt, $J = 22,8, 11,7$ Hz, 3H), 2,23 (s, 3H), 1,89 (d, $J = 11,9$ Hz, 2H), 1,83-1,70 (m, 3H), 1,31-1,22 (m, 6H), 0,99-0,87 (m, 6H), 0,87-0,78 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 169,06, 164,82, 163,88, 143,53, 142,53, 142,01, 141,14, 128,93, 128,77, 119,68, 115,76, 113,26, 105,84, 77,44, 77,12, 76,81, 46,50, 42,58, 41,32, 31,57, 22,01, 24,69, 19,12, 18,25. m/z : 538,25 [M+H].
- 50 N-[4-({4-[3-(4-metilpiperidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7AB): 65 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,73 (s, 4H), 7,66 (s, 1H), 6,69 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,45 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), 3,94 (d, $J = 11,7$ Hz, 2H), 3,01 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 2,45 (dt, $J = 24,1, 12,0$ Hz, 3H), 2,17 (s, 3H), 1,87 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 1,74 (p, $J = 12,0, 11,2$ Hz, 6H), 1,23 (c, $J = 12,4, 11,2$ Hz, 2H), 1,03-0,96 (m, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 168,94, 164,13, 143,51, 142,46, 141,98, 141,14, 128,94, 128,74, 119,70, 115,79, 113,23, 105,85, 98,23, 46,49, 41,35, 34,52, 31,54, 31,38, 24,71, 21,84, 14,28. m/z : 526,21 [M+H].
- 55 N-[4-({4-[3-(3-(hidroximetil)pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7AG): 40 % de rendimiento, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (dd, $J = 7,2, 2,1$ Hz, 1H), 8,00 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,75 (td, $J = 8,2, 7,4, 3,2$ Hz, 4H), 7,66 (s, 1H), 6,70 (dt, $J = 7,4, 2,2$ Hz, 1H), 4,19-4,10 (m, 2H), 4,03 (s, 1H), 3,94 (d, $J = 11,9$ Hz, 2H), 3,44 (t, $J = 11,3$ Hz, 2H), 2,48 (dt, $J = 24,0, 12,1$ Hz, 3H), 2,21 (dd, $J = 2,7; 1,6$ Hz, 3H), 1,98 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H), 1,89 (d, $J = 13,1$ Hz, 2H), 1,76 (c, $J = 12,4$ Hz, 2H), 1,25 (c, $J = 2,7$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 164,28, 154,77, 144,51, 141,97, 141,30, 128,58, 115,73, 113,56, 105,54, 98,05, 79,75, 77,42, 77,11, 76,79, 67,52, 42,31, 34,58, 32,44, 28,55, 14,28. m/z : 532,15 [M+H].
- 65 5-[1-(4-acetamidobencenosulfonil)piperidin-4-il]-N,N-dietil-2-metilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7AI): 46 % de rendimiento, sólido de color blanco. ^1H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,82 (s, 1H), 8,28-8,22 (m, 1H), 7,66 (c, $J = 8,8$ Hz, 4H), 6,54 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 3,89 (d, $J = 11,4$ Hz, 2H), 2,43 (s, 4H), 2,34 (t, $J = 12,2$ Hz, 3H), 2,13 (s, 3H), 1,89-1,67 (m, 8H), 1,15 (t, 7H). ^{13}C RMN (101 MHz, Cloroformo-d) δ 169,44, 166,06, 150,41, 142,78, 142,77, 139,28,

130,37, 128,82, 128,20, 119,55, 112,99, 112,05, 105,81, 50,80, 46,52, 41,14, 31,67, 24,50, 12,97. *m/z*: 512,23 [M+H].

5-[1-(4-acetamidobencenosulfonil)piperidin-4-il]-N,N-dietil-2-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7BR): 65 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (d, J = 10,8 Hz, 0H), 8,10 (s, 1H), 7,68 (s, 4H), 7,20 (s, 1H), 6,78 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,94 (d, J = 11,8 Hz, 2H), 3,28 (s, 1H), 2,49 (t, J = 12,2 Hz, 1H), 2,40 (t, J = 11,8 Hz, 2H), 2,18 (s, 3H), 1,88 (d, J = 12,9 Hz, 2H), 1,76 (t, J = 12,6 Hz, 2H), 1,33-1,20 (m, 6H). ¹³C RMN (100 MHz, Cloroformo-d) δ 169,02, 162,77, 143,79, 142,42, 140,57, 138,79, 130,87, 128,93 (d, J = 4,9 Hz), 119,60, 115,01, 113,92, 106,31, 77,32, 46,39, 41,12, 31,50, 24,68, 14,19. *m/z*: 566,21 [M+H].

5-[1-(bencenosulfonil)piperidin-4-il]-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7DA): 57 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,40 (dd, J = 7,2, 0,9 Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,92 (dt, J = 1,9, 0,9 Hz, 1H), 7,85-7,79 (m, 2H), 7,69-7,54 (m, 3H), 6,71 (dd, J = 7,3; 2,0 Hz, 1H), 3,99 (dc, J = 10,5, 2,7 Hz, 2H), 3,60 (c, J = 7,2 Hz, 4H), 2,54 (tt, J = 11,7, 4,0 Hz, 1H), 2,39 (td, J = 11,9, 2,9 Hz, 2H), 2,00-1,79 (m, 4H), 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 6H). *m/z*: 441,19 [M+H].

N,N-dietil-5-(1-metanosulfonilpiperidin-4-il)pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7DE): 23 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,42 (dd, J = 7,2, 1,0 Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,99 (dc, J = 2,0, 1,0 Hz, 1H), 6,77 (dd, J = 7,2; 2,0 Hz, 1H), 3,96 (d, J = 11,9 Hz, 2H), 3,60 (c, J = 7,1 Hz, 4H), 2,84 (s, 3H), 2,81-2,70 (m, 3H), 2,01 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 1,94-1,82 (m, 2H), 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, Cloroformo-d) δ 168,99, 142,64, 142,35, 138,37, 137,37, 126,42, 116,27, 96,58, 60,06, 41,62, 40,89, 39,76, 29,84, 22,50, 13,03. *m/z*: 379,17 [M+H].

N,N-dietil-5-(1-fenilmetanosulfonilpiperidin-4-il)pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7DJ): 23 % de rendimiento en dos etapas. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,40 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,45-7,38 (m, 4H), 6,70 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 4,26 (s, 2H), 3,79 (d, J = 12,4 Hz, 2H), 3,59 (d, J = 7,2 Hz, 4H), 2,63 (dt, J = 24,0, 12,0 Hz, 3H), 1,83 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,74-1,59 (m, 3H), 1,30 (t, 6H). ¹³C RMN (100 MHz, Cloroformo-d) δ 164,31, 143,41, 141,77, 141,12, 130,79, 129,02, 128,94, 128,93, 128,60, 116,71, 112,97, 106,26, 57,39, 46,48, 41,77, 32,45. *m/z*: 455,21 [M+H].

N-bencil-5-[1-(4-acetamidobencenosulfonil)piperidin-4-il]pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7FM): 40 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,40 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,75 (s, 3H), 7,37 (s, 4H), 7,26 (s, 2H), 6,74 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,23 (s, 1H), 4,71-4,61 (m, 2H), 3,96 (d, J = 12,0 Hz, 2H), 2,58-2,40 (m, 3H), 2,19 (s, 3H), 1,87 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 1,76 (d, J = 13,0 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 168,69, 146,60, 142,34, 140,74, 129,00, 128,91, 127,89, 127,72, 119,74, 113,60, 99,66, 77,42, 77,11, 76,79, 46,46, 43,48, 41,51, 31,50, 24,86. *m/z*: 532,20 [M+H].

N-[4-({4-[3-(metilcarbamoil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]carbamato de metilo (7GQ): 87 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,39 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 8,17-8,07 (m, 4H), 8,12 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 6,77 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 4,26 (d, J = 13,4 Hz, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,89-2,67 (m, 3H), 2,49 (s, 3H), 1,86 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,65 (c, J = 13,2, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 168,03, 164,57, 155,15, 145,44, 145,65, 144,67, 141,20, 140,98, 138,97, 137,98, 128,97, 116,53, 114,08, 106,66, 77,16, 42,69, 32,77, 28,90, 27,75, 26,56. *m/z*: 456,10 [M+H].

N,N-dietil-5-[1-(4-fluorobencenosulfonil)piperidin-4-il]pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HL): 60 % de rendimiento en dos etapas. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,67 (m, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,00 (m, 2H), 7,59 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,41 (m, 3H), 3,48 (c, J = 6,3 Hz, 4H), 2,57 (m, 1H), 2,46 (m, 5H), 2,20 (m, 2H), 2,02 (m, 2H), 1,56 (t, J = 6,3 Hz, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 164,33, 143,04, 141,81, 141,21, 140,22, 134,83, 134,50, 128,70, 128,26, 122,01, 116,73, 112,99, 106,40, 77,48, 77,16, 76,84, 60,54, 46,55, 41,35, 31,88, 21,19, 14,33. *m/z*: 459,19 [M+H].

N,N-dietil-5-[1-(4-(trifluorometil)bencenosulfonil)piperidin-4-il]pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HM): 41 % de rendimiento en dos etapas, sólido de color blanco. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,40 (d, J = 9,4 Hz, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,92 (s, 3H), 7,85 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 6,70 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 3,99 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 3,59 (d, J = 7,1 Hz, 4H), 2,55 (t, J = 12,0 Hz, 1H), 2,43 (t, J = 11,5 Hz, 2H), 1,97 (d, J = 12,9 Hz, 2H), 1,88 (d, J = 13,4 Hz, 2H), 1,32-1,26 (m, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-D) δ 164,33, 143,04, 141,81, 141,21, 140,22, 134,83, 134,50, 128,70, 128,26, 126,49 (c, J = 3,8 Hz), 122,01, 116,73, 112,99, 106,40, 77,48, 77,16, 76,84, 60,54, 46,55, 41,35, 31,88, 21,19, 14,33. *m/z*: 509,18 [M+H].

Los siguientes compuestos se sintetizaron de manera similar a los compuestos Z231-0326 y 7A-7HM anteriores:

N-[4-({4-[3-(dietilcarbamoil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]carbamato de bencilo (7HN). *m/z*: 590,35 [M+H]

4-({4-[3-(azetidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)anilina (7HO). *m/z*: 440,30 [M+H]

5-[1-(4-aminobencenosulfonil)piperidin-4-il]-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HP). *m/z*: 456,20 [M+H]

N-[4-({4-[3-(azetidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]carbamato de *terc*-butilo (7HQ).

- m/z*: 540,30 [M+H]
 5-{1-[4-(5-aminopentanamido)benzenosulfonil]piperidin-4-il}-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HR).
m/z: 555,30 [M+H]
 5-{1-[4-(3-aminopropanamido)benzenosulfonil]piperidin-4-il}-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HS).
 5 *m/z*: 525,25 [M+H]
 5-{1-[4-(acetamidometilbenzenosulfonil]piperidin-4-il}-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HT). *m/z*:
 512,30 [M+H]
 5-{1-[4-(4-aminobutanamido)benzenosulfonil]piperidin-4-il}-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HU).
m/z: 541,3 [M+H]
 10 N,N-dietil-5-{1-[4-(metilcarbamoil)benzenosulfonil]piperidin-4-il}pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HV). *m/z*:
 498,25 [M+H]
 N-[4-({4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]ciclohexanocarboxamida
 (7HW). *m/z*: 564,75 [M+H]
 N,N-dietil-5-{1-[4-(2-oxopropil)benzenosulfonil]piperidin-4-il}pirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HX). *m/z*:
 15 497,3 [M+H]
 5-{1-[(1-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-5-il)sulfonil]piperidin-4-il}-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-3-carboxamida (7HY).
m/z: 524,25 [M+H]
 1-[6-({4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)-2,3-dihidro-1H-indol-1-il]etan-1-ona
 (7HZ). *m/z*: 522,6 [M+H]
 20 4-({4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)anilina (7IA). *m/z*: 454,20 [M+H]
 N-[4-({4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]carbamato de *terc*-butilo (7IB).
m/z: 554,30 [M+H]
 N-[4-({4-[3-(azetidín-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7IC). *m/z*: 482,20
 [M+H]
 25 N-[4-({4-[3-(morfolín-4-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}fenil)acetamida (7ID). *m/z*: 512,25 [M+H]
 N-[4-({4-[3-(pirrolidin-1-carbonil)pirazolo[1,5-a]piridin-5-il]piperidin-1-il}sulfonil)fenil]acetamida (7IE). *m/z*: 496,25
 [M+H]
 ácido 4-({4-[2-(dietilcarbamoil)pirazolo[1,5-a]piridin-4-il]piperidin-1-il}sulfonil)benzoico (7IF). *m/z*: 499,20 [M+H]
 4-[1-(4-acetilbenzenosulfonil)piperidin-4-il]-N,N-dietilpirazolo[1,5-a]piridin-2-carboxamida (7IG). *m/z*: 483,39 [M+H]
 30 4-({4-[2-(dietilcarbamoil)pirazolo[1,5-a]piridin-4-il]piperidin-1-il}sulfonil)benzoato de propilo (7IH). *m/z*: 527,20
 [M+H]

La descripción anterior se proporciona únicamente para la claridad de la comprensión y no se deben entender limitaciones innecesarias a partir de la misma, ya que las modificaciones dentro del alcance de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la técnica.

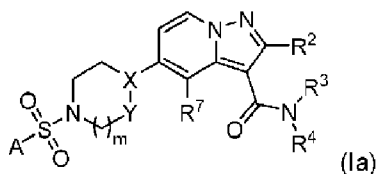
A lo largo de la presente memoria descriptiva y las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un elemento integrante o etapa o grupo de elementos integrantes o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o etapas.

A lo largo de la memoria descriptiva, cuando se describe que las composiciones incluyen componentes o materiales, se contempla que las composiciones también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación de los componentes o materiales mencionados, a menos que se describa lo contrario. De manera análoga, cuando se describe que los métodos incluyen etapas particulares, se contempla que los métodos también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación de las etapas mencionadas, a menos que se describa lo contrario. La invención divulgada de manera ilustrativa en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o etapa no divulgado específicamente.

La práctica de un método divulgado en el presente documento y las etapas individuales del mismo, puede realizarse manualmente y/o con la ayuda o automatización proporcionada por equipos electrónicos. Aunque los procesos se han descrito con referencia a realizaciones particulares, un experto en la técnica apreciará fácilmente que se pueden usar otras formas de realizar los actos asociados con los métodos. Por ejemplo, el orden de diversas etapas puede cambiarse sin apartarse del alcance o espíritu del método, a menos que se describa lo contrario. Además, algunas de las etapas individuales se pueden combinar, omitir o subdividir en etapas adicionales.

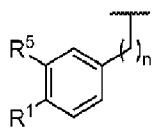
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en donde:

A es alquilo C₁₋₄ o



X es CH o N;

Y es CH₂ o N, y cuando X es N, entonces Y es CH₂;

m es 0 o 1, y cuando m es 1, entonces Y es CH₂;

n es 0 o 1;

R¹ es H, alquilo C₁₋₆, alquilenilo C₀₋₆-C(=O)R⁶, halo, ciano, ariloxi, amino, alquilenilo C₀₋₃-amido, carbamilo, S-tiocarbamilo o ureido;

R² es H, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ o heteroarilo;

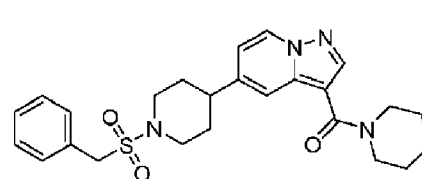
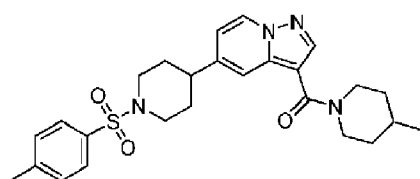
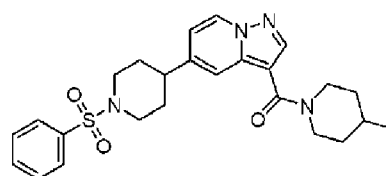
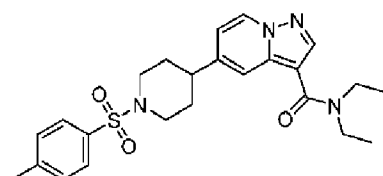
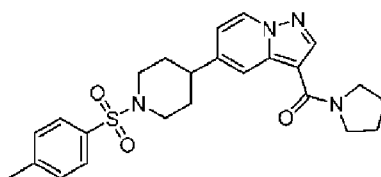
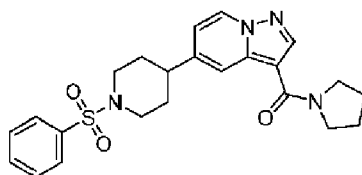
cada R³ y R⁴ es independientemente H, alquilo C₁₋₆ o aralquilo C₁₋₃, o R³ y R⁴ y el nitrógeno al que están unidos se unen para formar un anillo de 3-6 miembros que comprende opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S;

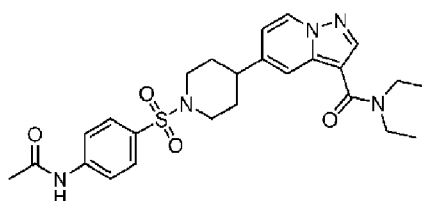
R⁵ es H, o R¹ y R⁵ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de N, O y S;

R⁶ es OH, alquilo C₁₋₆ u Oalquilo C₁₋₆; y

R⁷ es H, halo o amino;

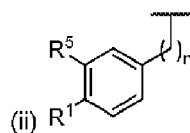
con la condición de que el compuesto no sea





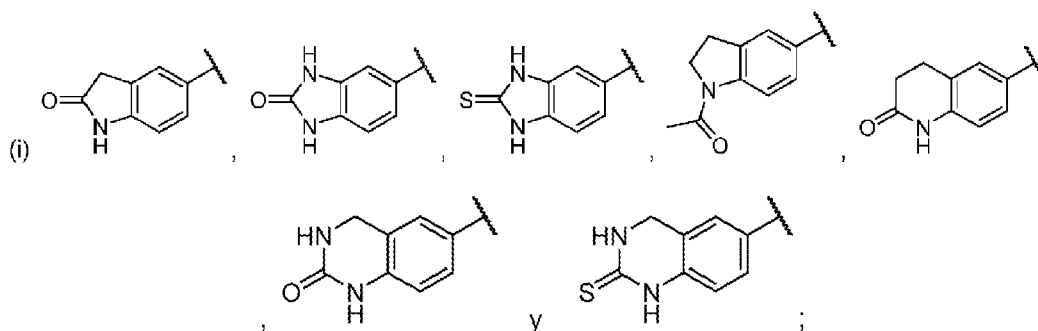
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde A es

5 (i) metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, isobutilo o t-butilo; o



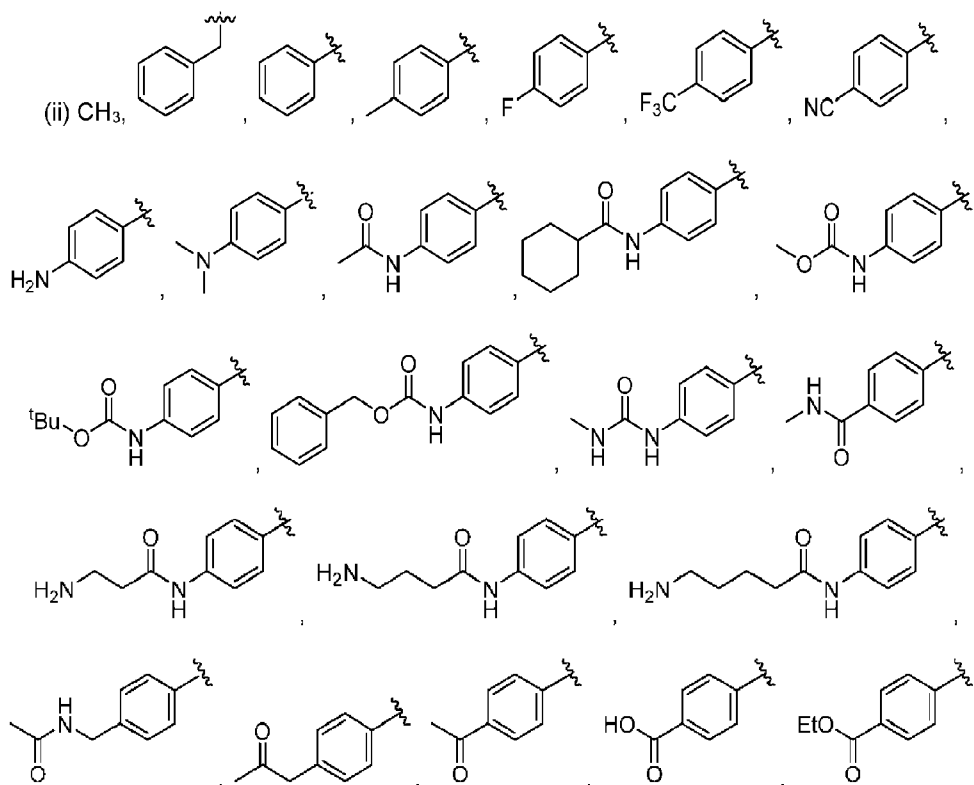
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde A se selecciona del grupo que consiste en

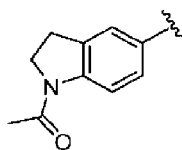
(i)



O

(ii)

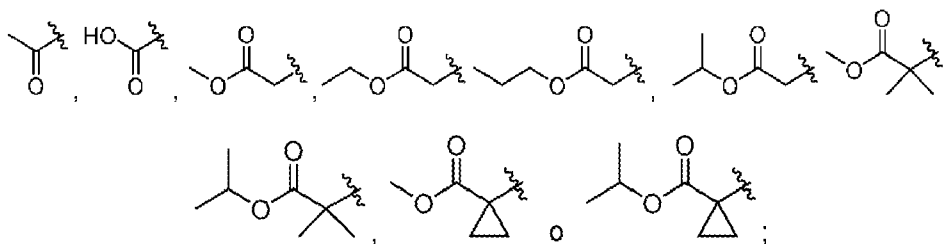
 y



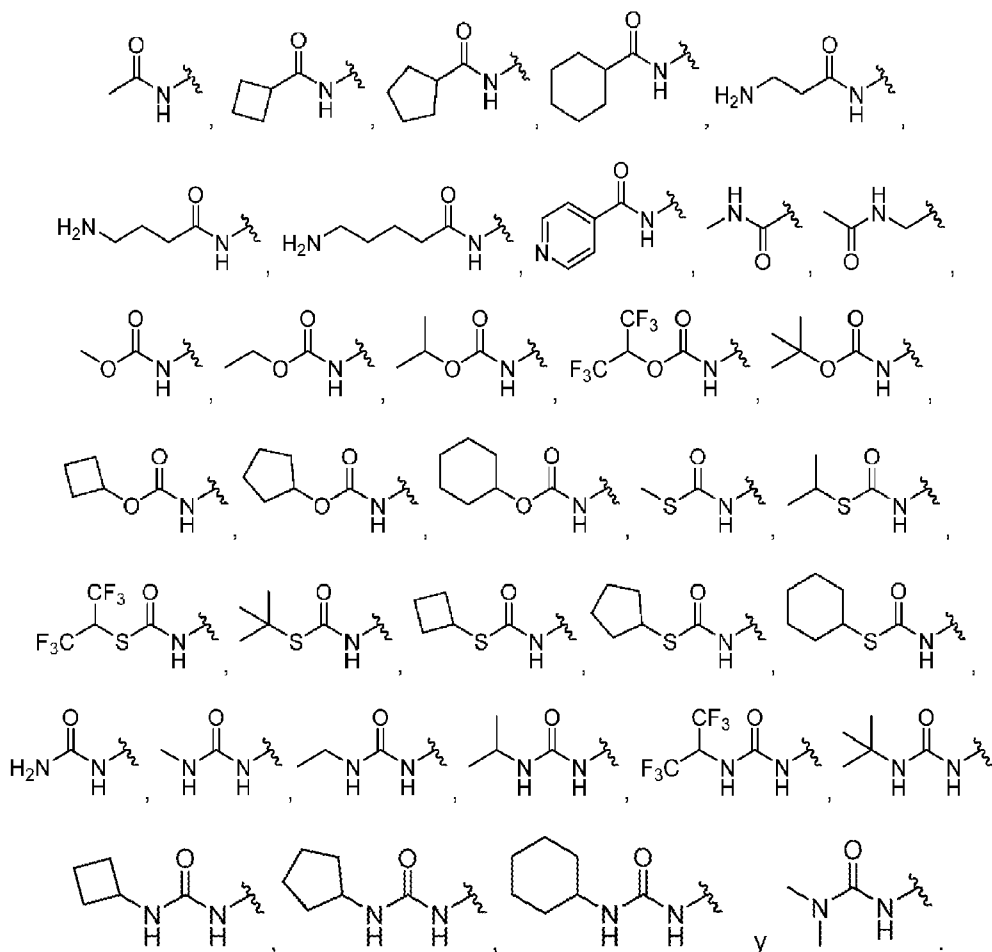
4. El compuesto o sal de la reivindicación 1, en donde R^5 es H.

5. El compuesto o sal de la reivindicación 4, en donde R^1 es:

- (i) H;
- (ii) metilo, etilo, fluorometilo o trifluorometilo;
- (iii)



- (iv) F;
- (v) CN u -OPh;
- (vi) $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$ o $-NH_2Ph$; o
- (vii)



6. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde X es CH, Y es CH_2 , y m es 1.

7. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde R^2 es

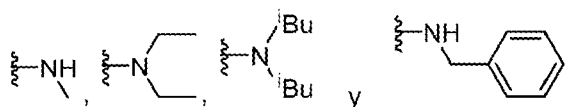
- (i) H;
- (ii) Br o Cl;
- (iii) CH_3 , CF_3 , CH_2OH o CH_2OCH_3 ;
- (iv) ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo; o
- (v) 3-furanilo.

8. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde cada uno de R^3 y R^4 es independientemente H, alquilo C_{1-6} o aralquilo C_{1-3} , opcionalmente, en donde cada uno de R^3 y R^4 es independientemente H, CH_3 , CH_2CH_3 , tBu o CH_2Ph .

9. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde



se selecciona del grupo que consiste en

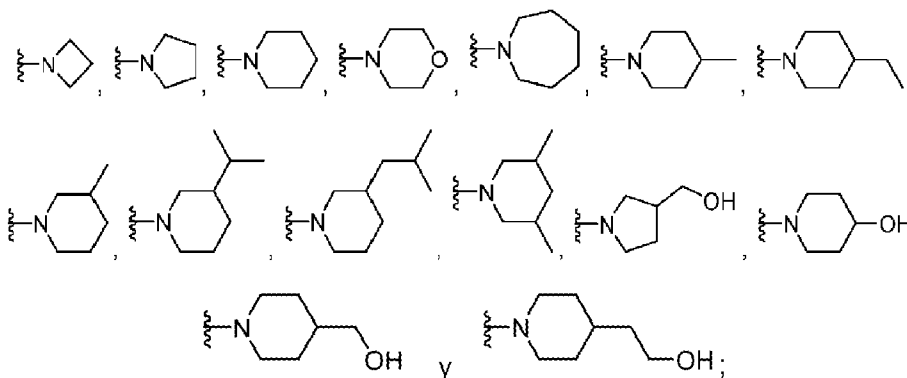


10. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde



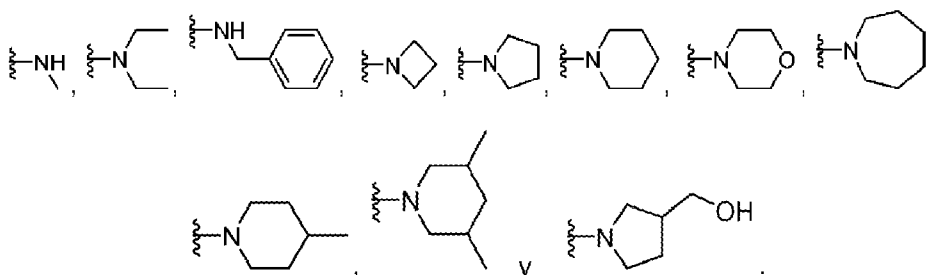
se selecciona del grupo que consiste en

(i)



o

(ii)

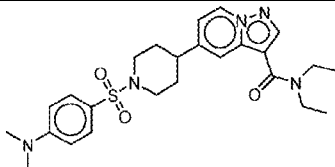
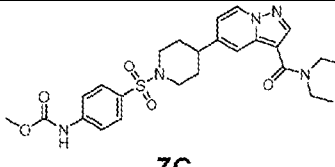
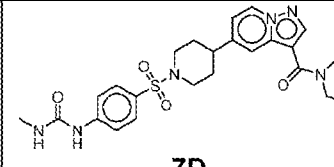
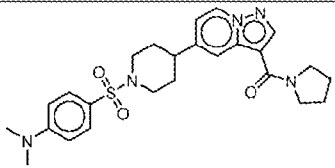
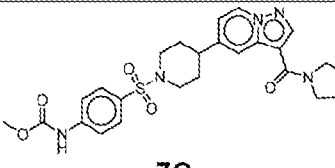
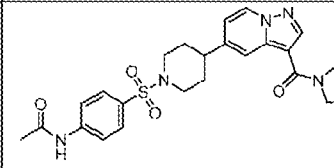
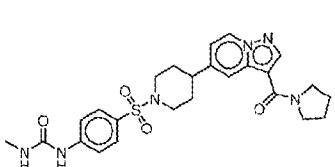
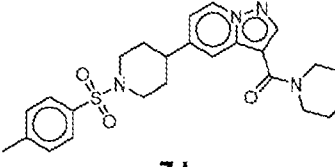
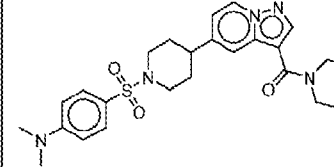
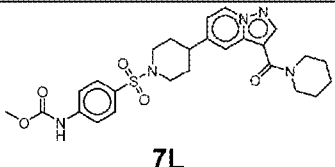
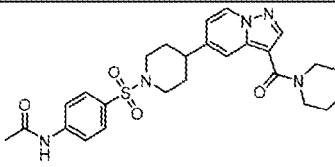
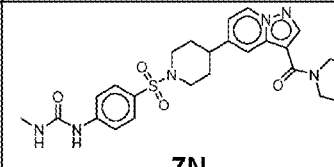


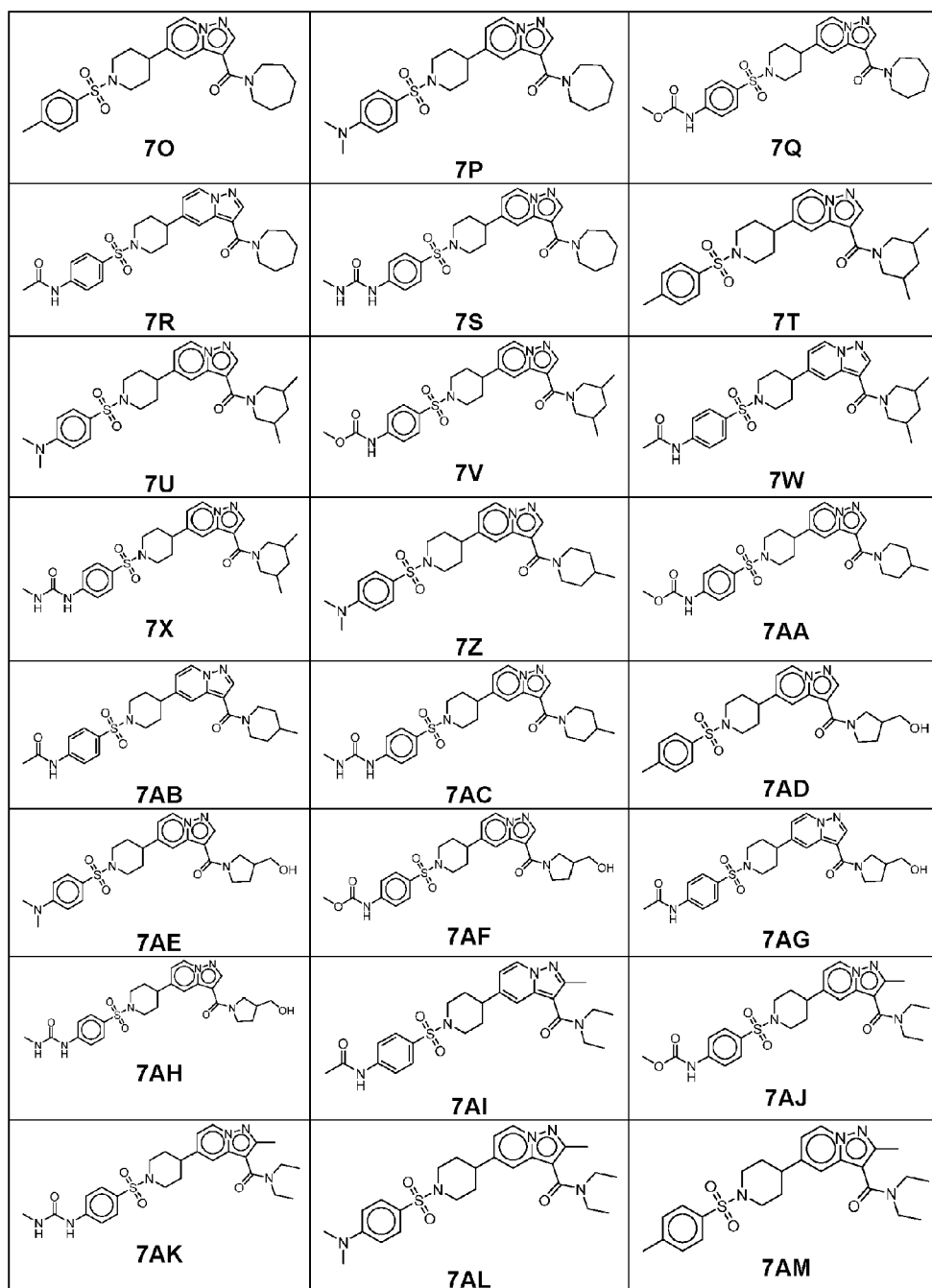
11. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde R^7 es

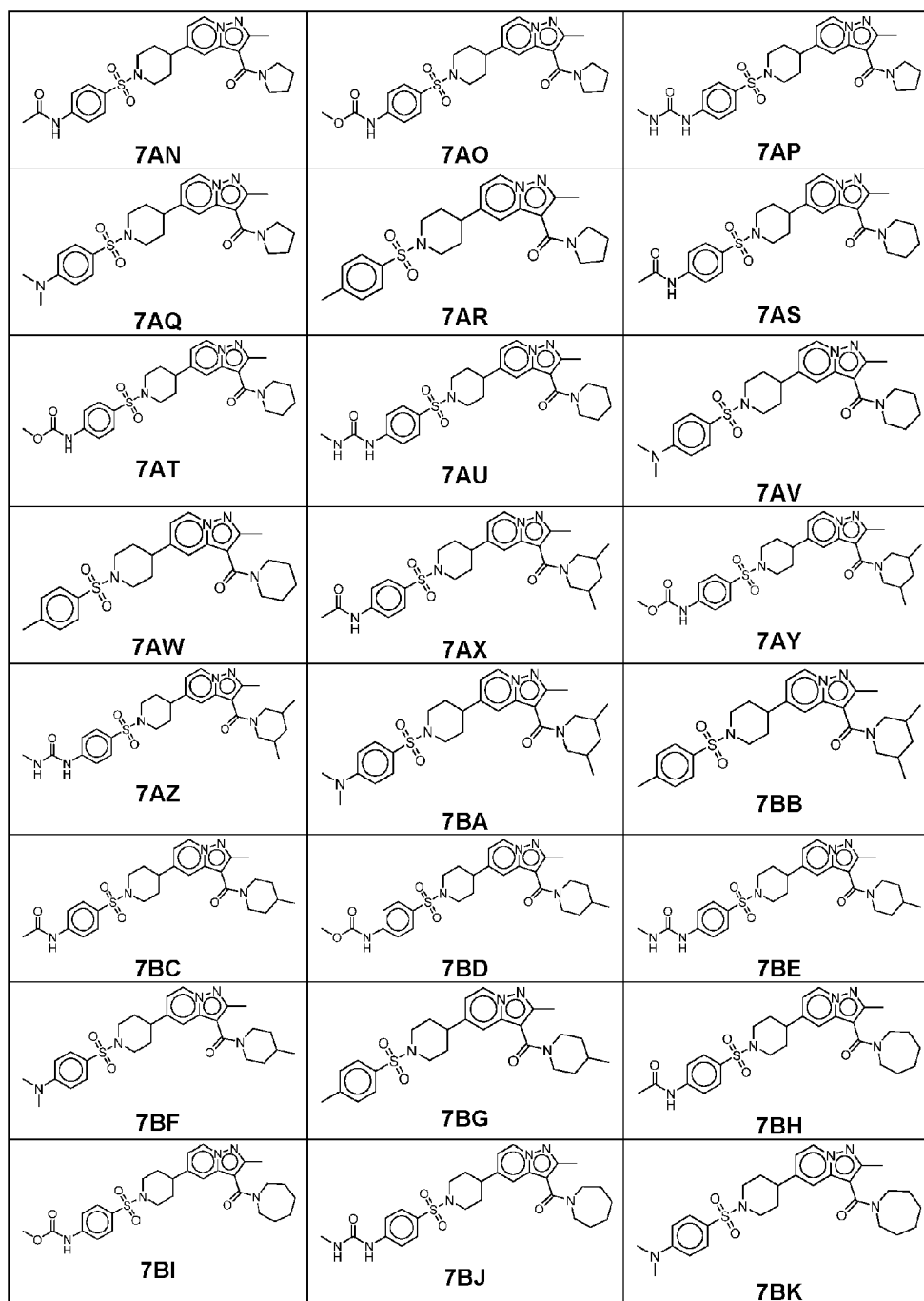
- (i) H; o
- (ii) NH_2 , Br, Cl o F.

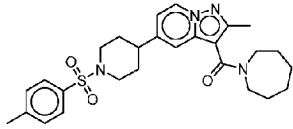
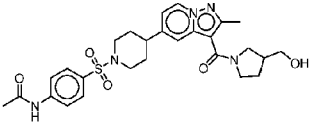
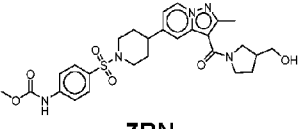
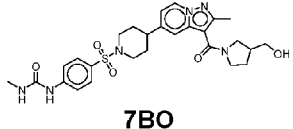
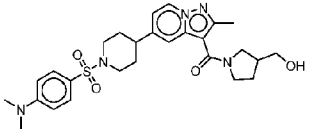
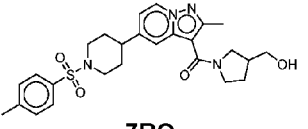
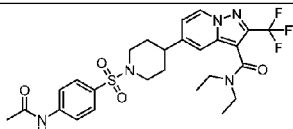
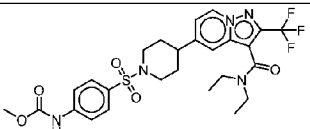
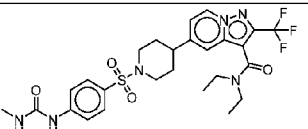
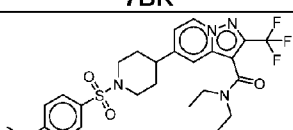
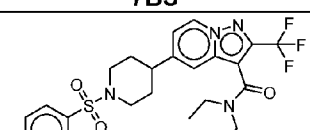
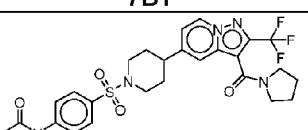
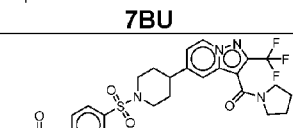
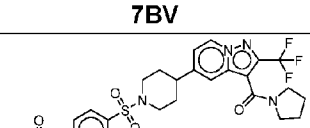
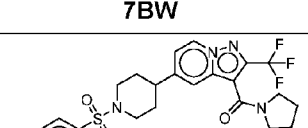
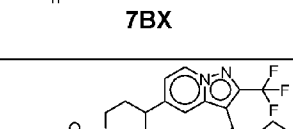
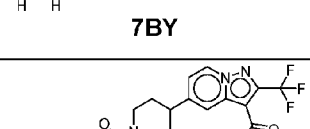
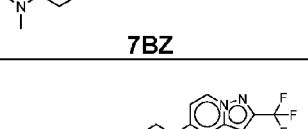
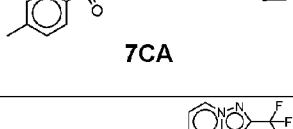
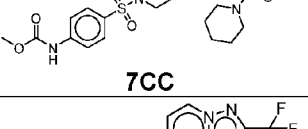
12. Un compuesto enumerado en la Tabla A, la Tabla B, la Tabla C, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

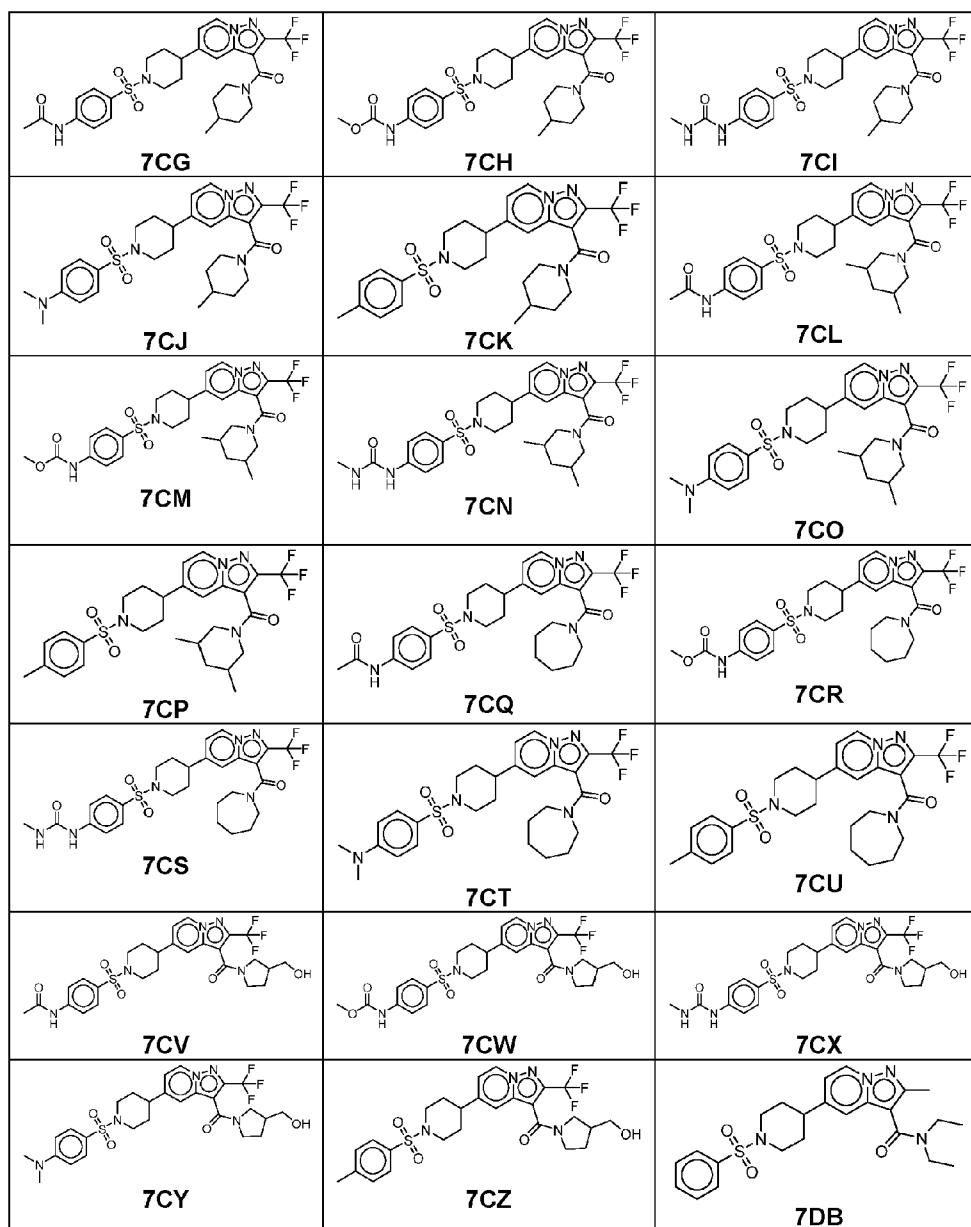
TABLA A

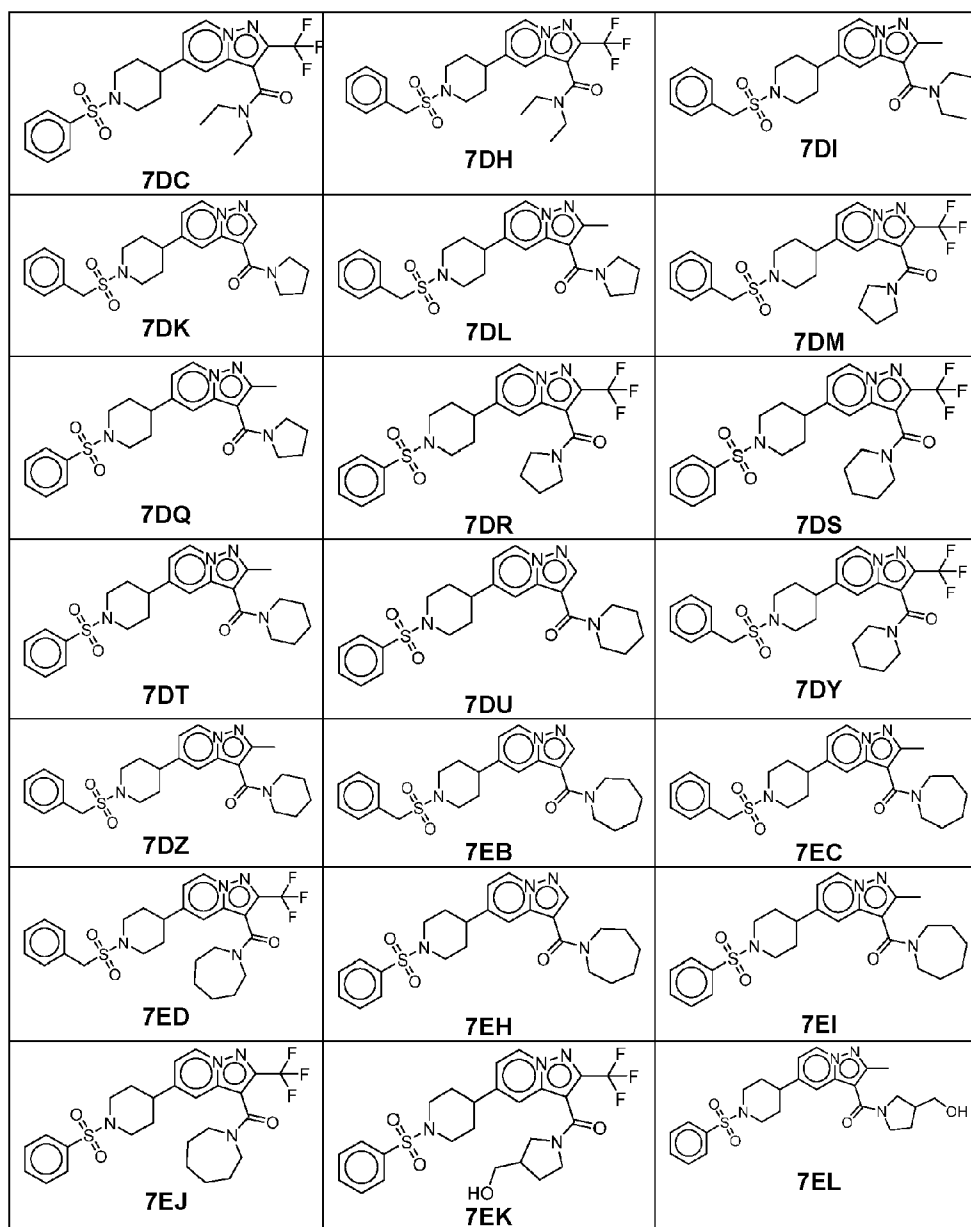
 7B	 7C	 7D
 7F	 7G	 7H
 7I	 7J	 7K
 7L	 7M	 7N

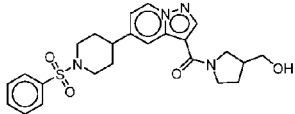
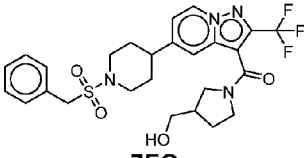
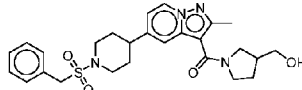
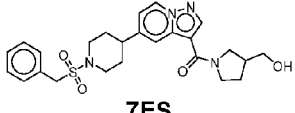
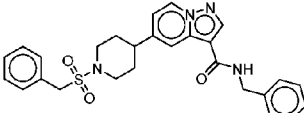
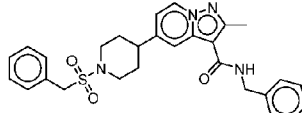
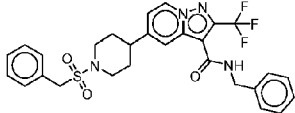
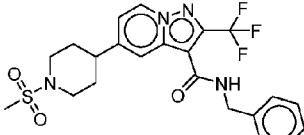
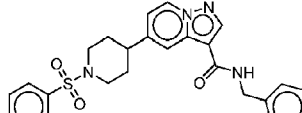
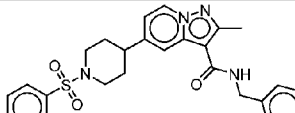
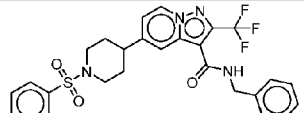
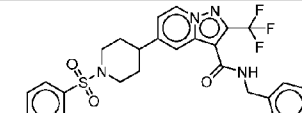
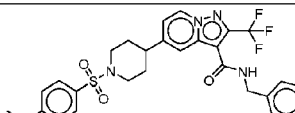
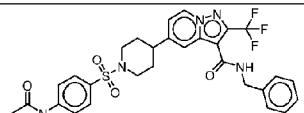
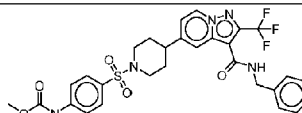
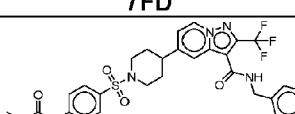
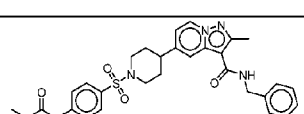
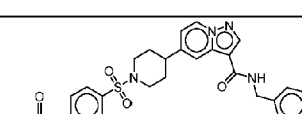
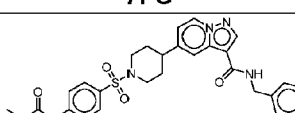
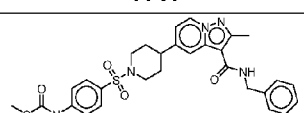
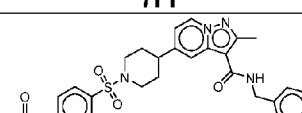
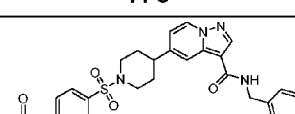
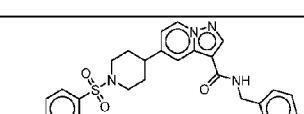
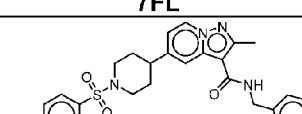


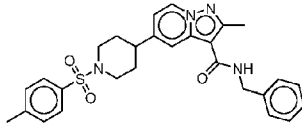
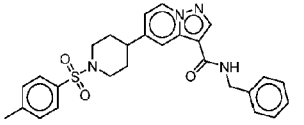
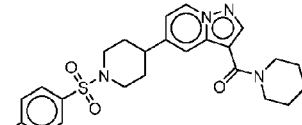
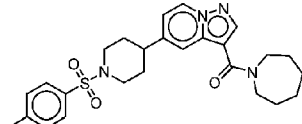
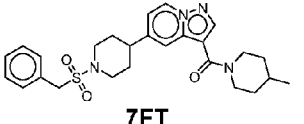
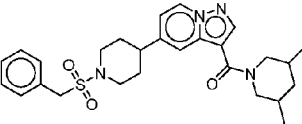
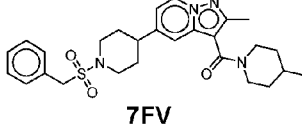
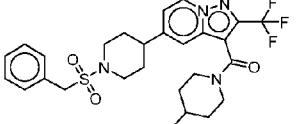
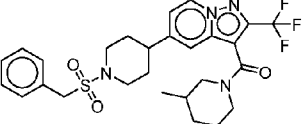
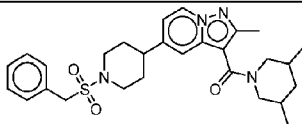
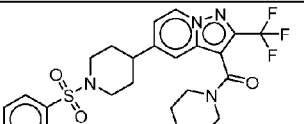
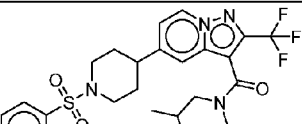
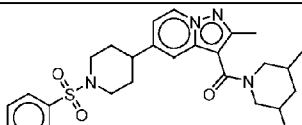
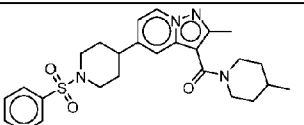
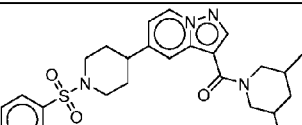
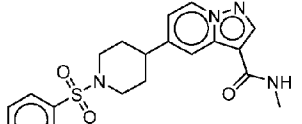
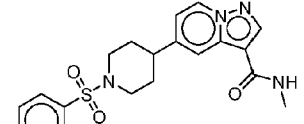
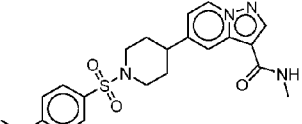
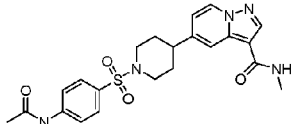
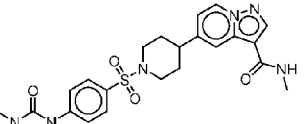
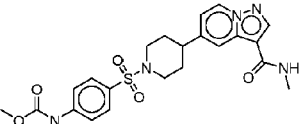


 7BL	 7BM	 7BN
 7BO	 7BP	 7BQ
 7BR	 7BS	 7BT
 7BU	 7BV	 7BW
 7BX	 7BY	 7BZ
 7CA	 7CB	 7CC
 7CD	 7CE	 7CF





 7EM	 7EQ	 7ER
 7ES	 7ET	 7EU
 7EV	 7EW	 7EZ
 7FA	 7FB	 7FC
 7FD	 7FE	 7FF
 7FG	 7FH	 7FI
 7FJ	 7FK	 7FL
 7FM	 7FN	 7FO

 7FP	 7FQ	 7FR
 7FS	 7FT	 7FU
 7FV	 7FW	 7FX
 7FY	 7GF	 7GG
 7GH	 7GI	 7GJ
 7GL	 7GM	 7GN
 7GO	 7GP	 7GQ

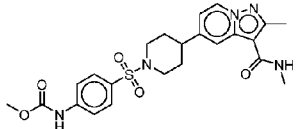
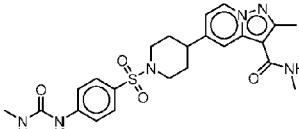
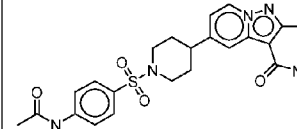
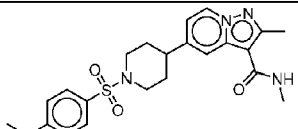
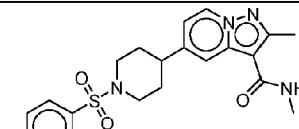
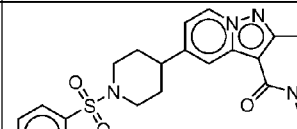
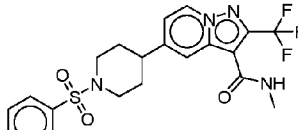
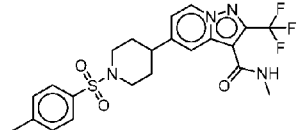
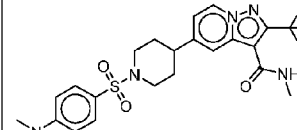
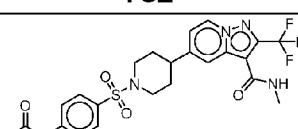
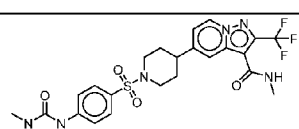
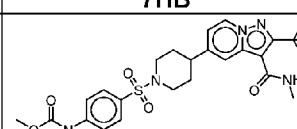
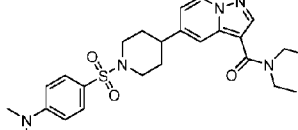
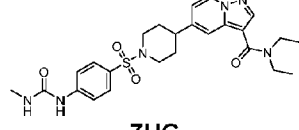
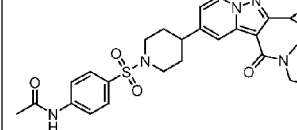
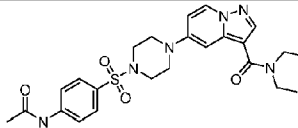
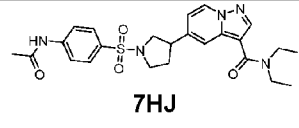
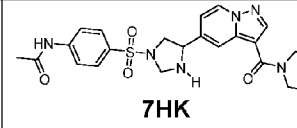
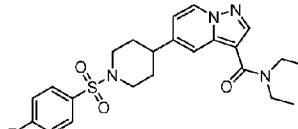
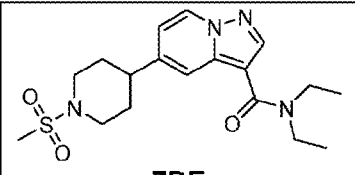
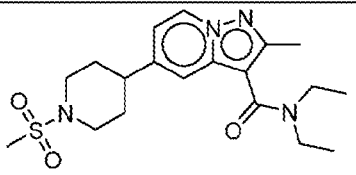
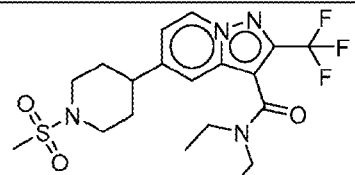
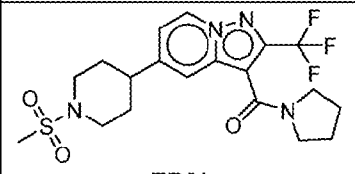
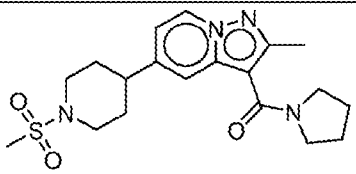
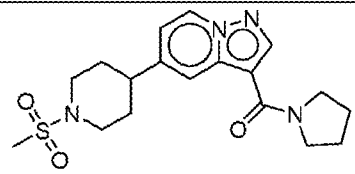
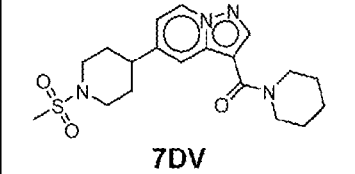
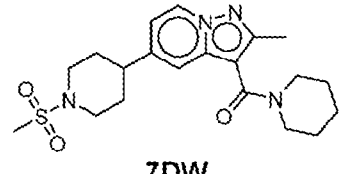
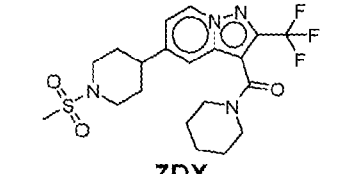
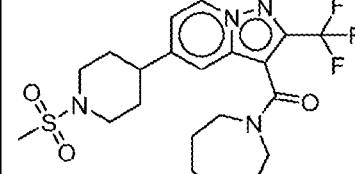
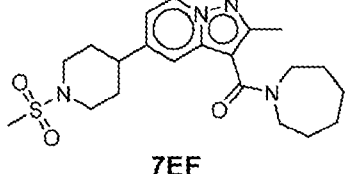
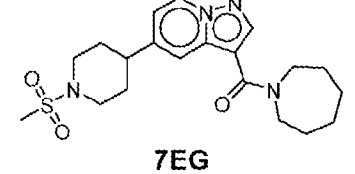
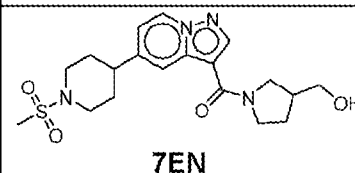
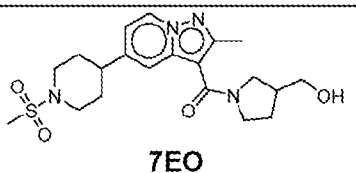
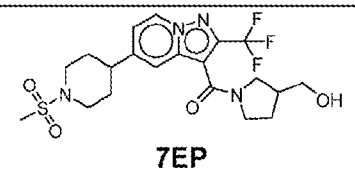
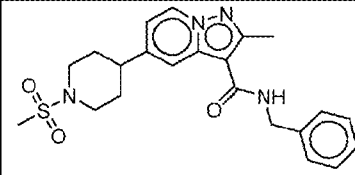
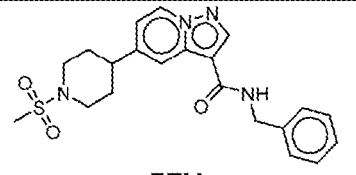
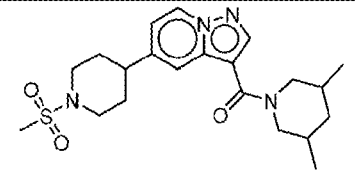
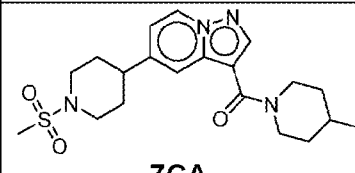
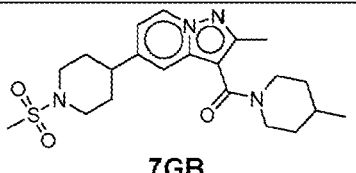
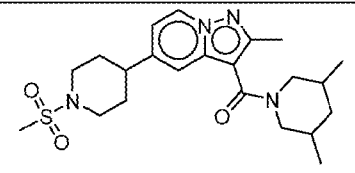
 7GR	 7GS	 7GT
 7GU	 7GV	 7GW
 7GZ	 7HA	 7HB
 7HC	 7HD	 7HE
 7HF	 7HG	 7HH
 7HI	 7HJ	 7HK
 7HL		

Tabla B

 7DE	 7DF	 7DG
 7DN	 7DO	 7DP
 7DV	 7DW	 7DX
 7EE	 7EF	 7EG
 7EN	 7EO	 7EP
 7EX	 7EY	 7FZ
 7GA	 7GB	 7GC

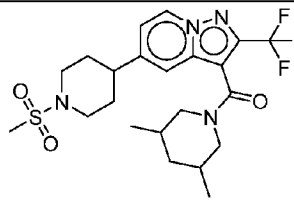
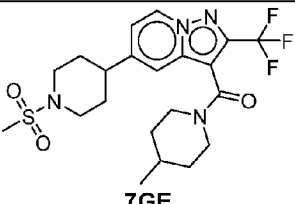
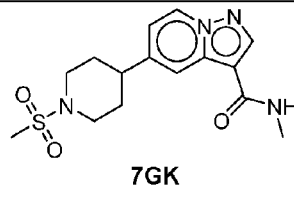
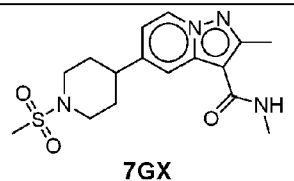
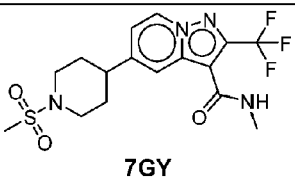
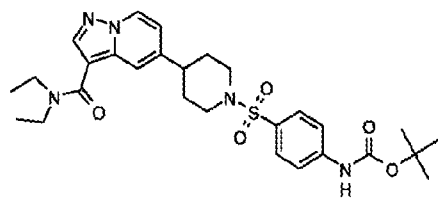
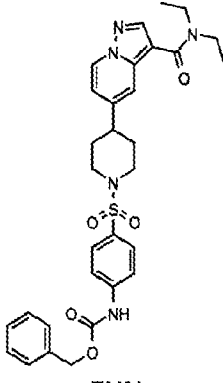
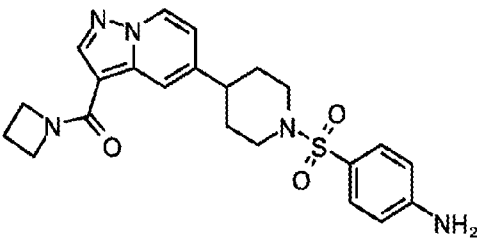
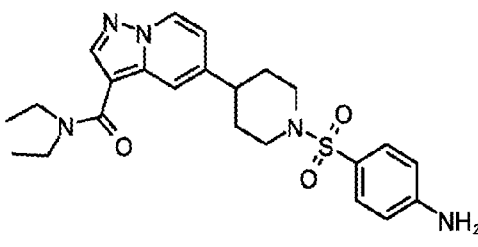
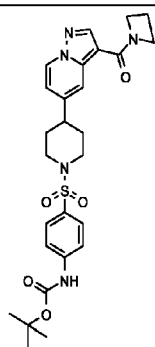
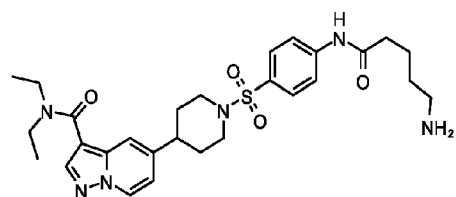
 7GD	 7GE	 7GK
 7GX	 7GY	

Tabla C

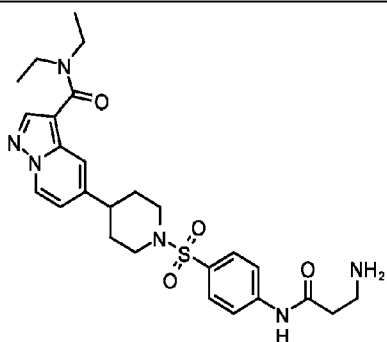
 7HM	 7HN
 7HO	 7HP



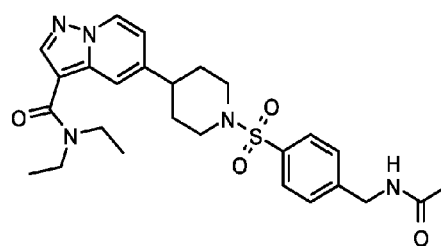
7HQ



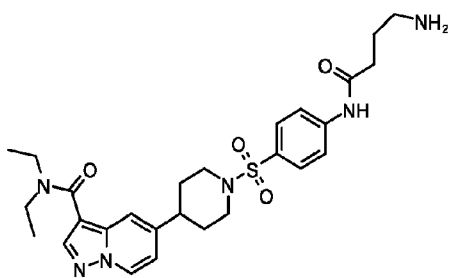
7HR



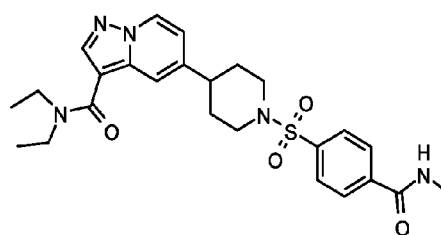
7HS



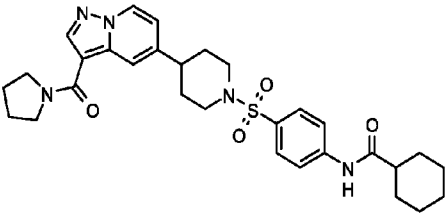
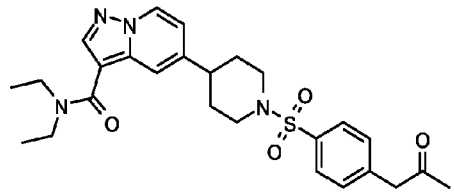
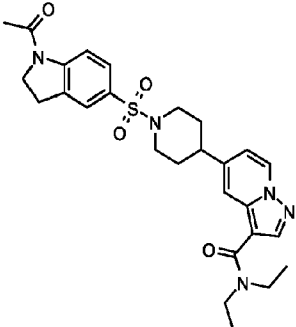
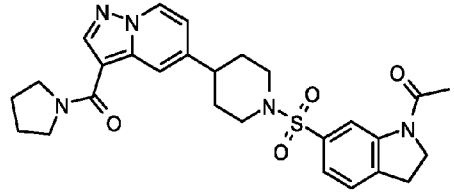
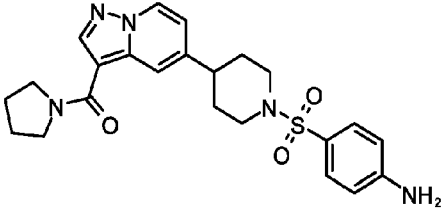
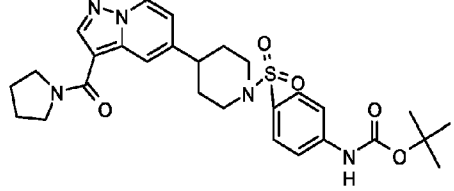
7HT

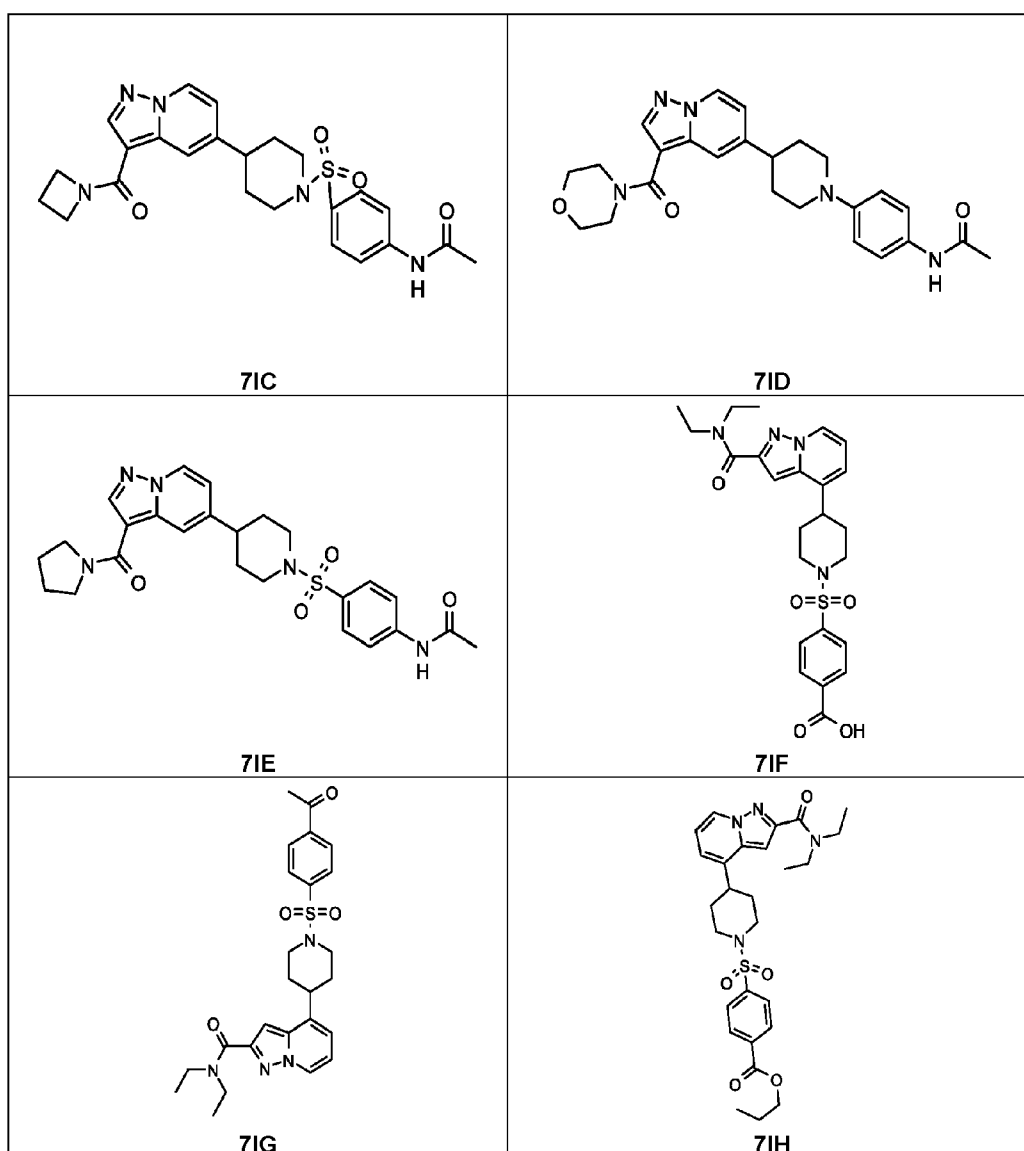


7HU



7HV

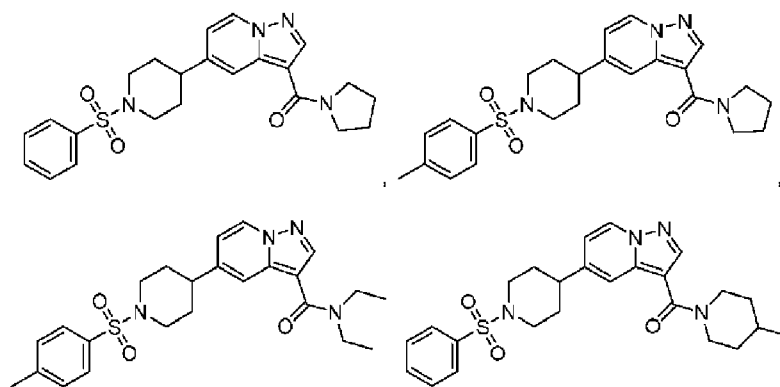
 7HW	 7HX
 7HY	 7HZ
 7IA	 7IB



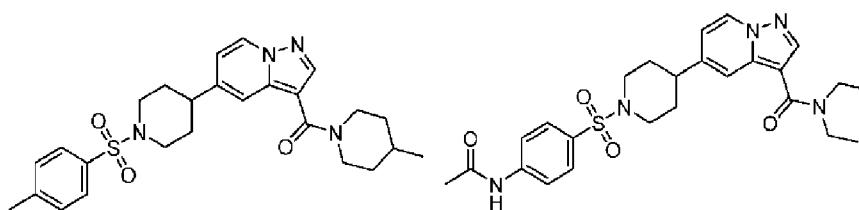
13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

14. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, la composición farmacéutica de la reivindicación 13,

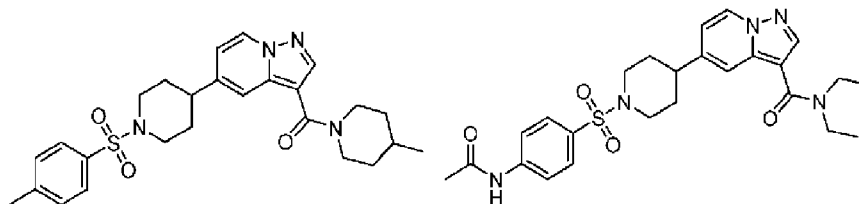
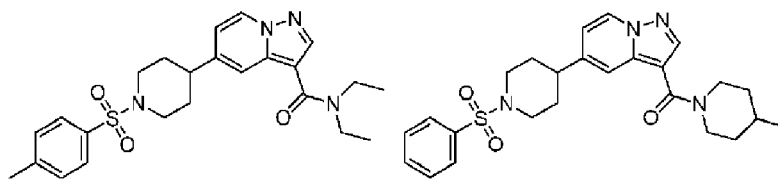
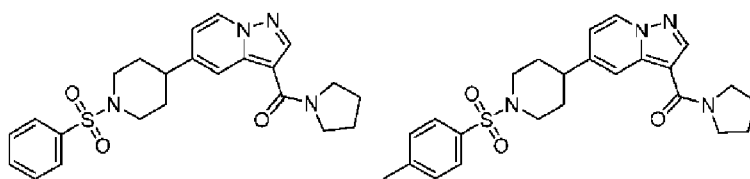


10



o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores para su uso en la inhibición de la cinasa del complejo de activación de Notch ("NACK") en una célula, opcionalmente, en donde el uso comprende administrar a un paciente que padece una enfermedad asociada con la pérdida de regulación del complejo de activación transcripcional de Notch y, opcionalmente, en donde la enfermedad es tetralogía de Fallot ("TOF"), síndrome de Alagille, cáncer o esclerosis múltiple ("EM").

15. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, la composición farmacéutica de la reivindicación 13,



o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores para su uso en la inhibición de la actividad cinasa, la actividad ATPasa o ambas en una célula.

FIG. 1A

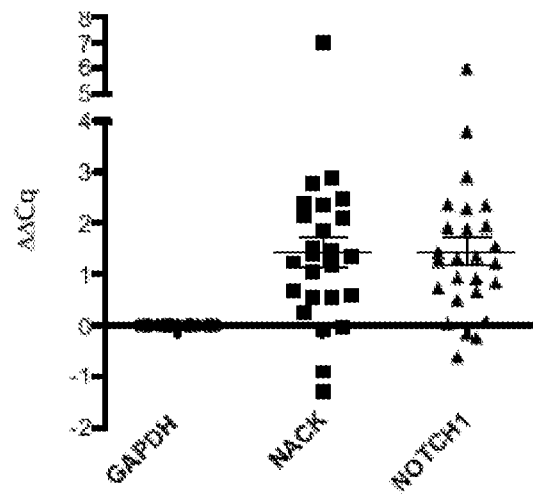


FIG. 1B

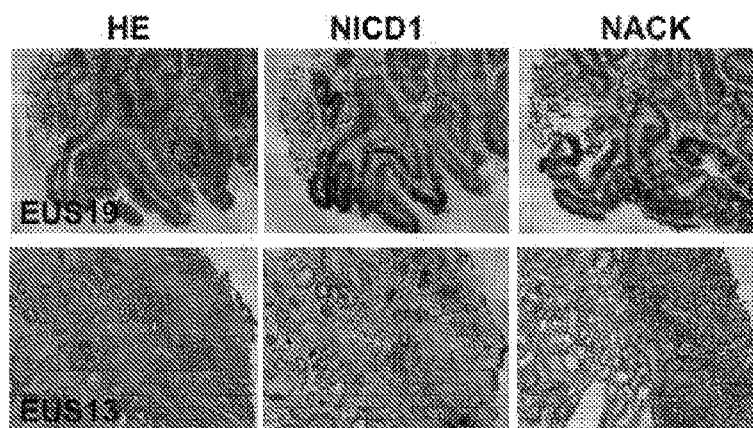


FIG. 1C

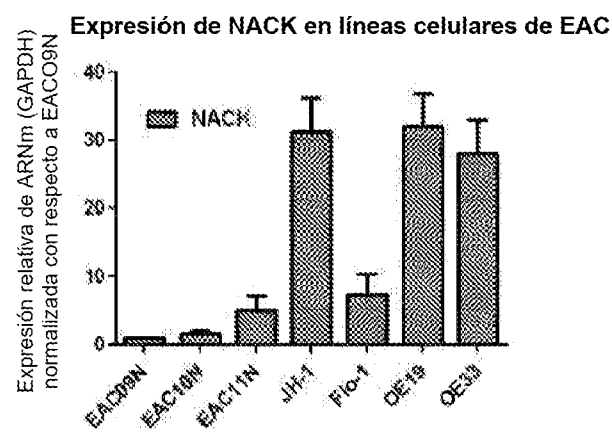


FIG. 1D

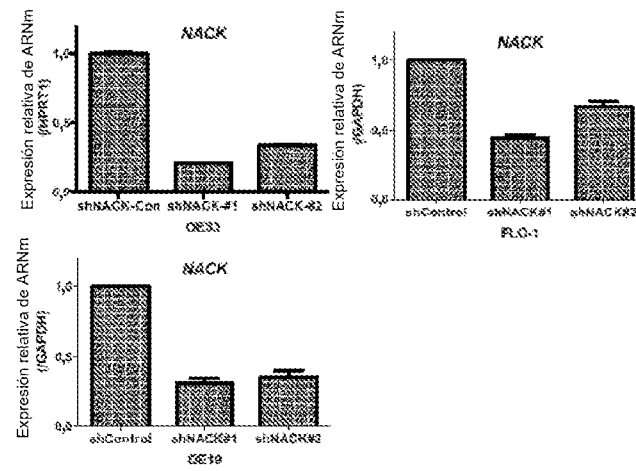


FIG. 1E

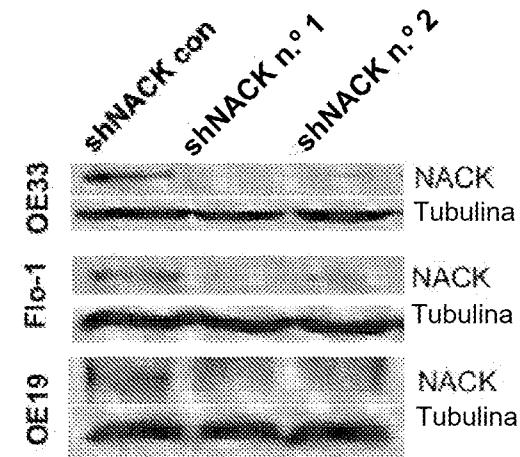


FIG. 1F

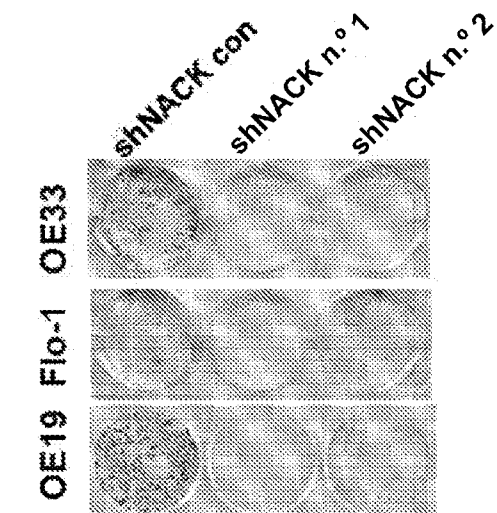
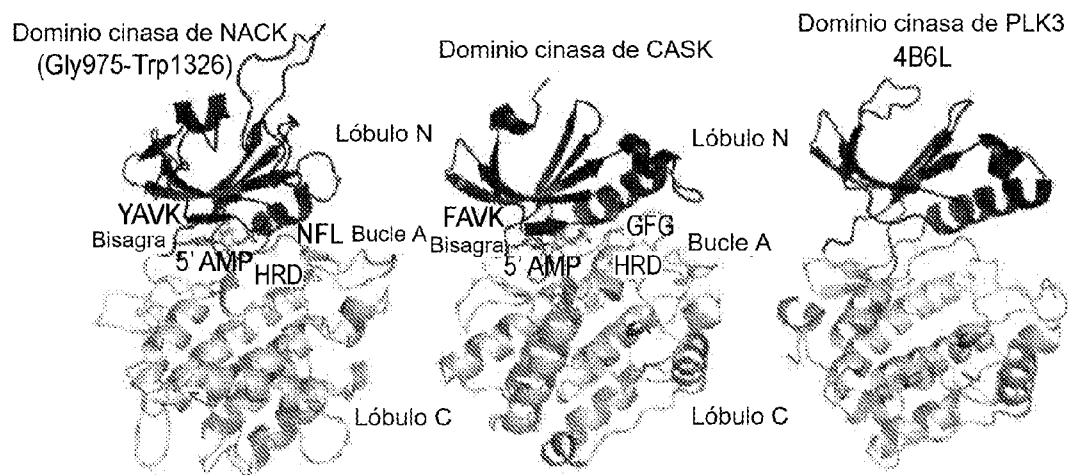


FIG. 2A**FIG. 2B**

Comparaciones de los motivos clave entre NACK, CASK y PLK3

Superposición de motivos	NACK (Humana)	CASK (PDB: 3C0E)	PLK3 (PDB: 4B6L)
Motivo HRD (Residuos catalíticos)	HRD	HRD	HRD
	His1141	His139	His183
	Arg1142	Arg140	Arg184
	Asp1143 (aceptor de H)	Asp141	Asp185
Motivo VAIK (Posición α y β -fosfato del ATP para la transferencia de fosforilo)	YAVK	FAVK	VAIK
	Tyr1019	Phe38	Val88
	Ala1020	Ala39	Ala89
	Val1021	Val40	Ile90
Motivo DFG (Unión a metal)	NFL	GFG	DFG
	Asn1212	Gly162	Asp203
	Phe1213	Phe163	Phe204
	Leu1214	Gly164	Gly205

FIG. 2C**RMSD**

Cadena principal después del ajuste por mínimo
cuadrados con respecto a la cadena principal

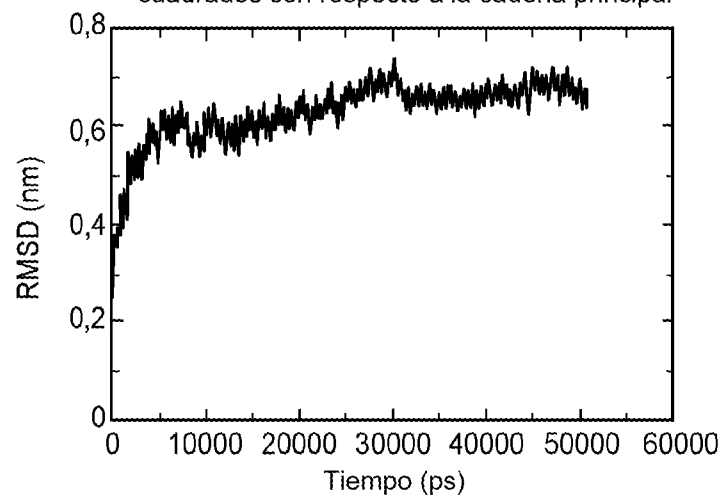
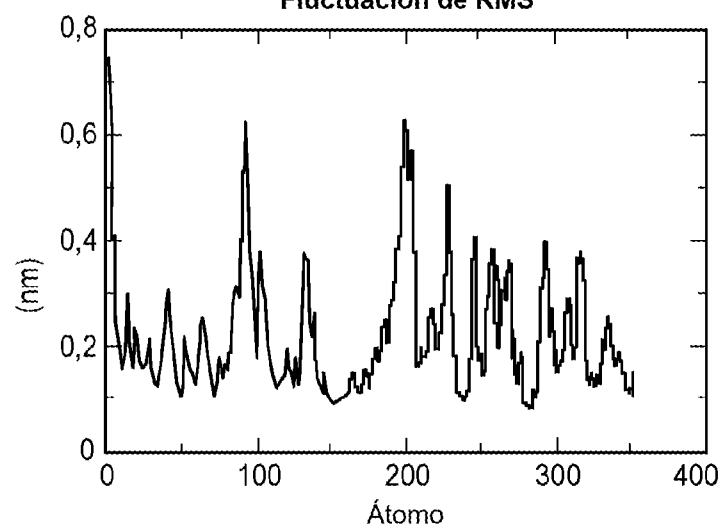
**FIG. 2D****Fluctuación de RMS**

FIG. 2E

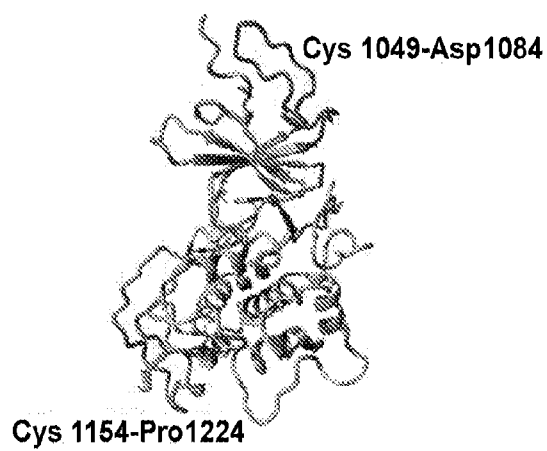


FIG. 3A

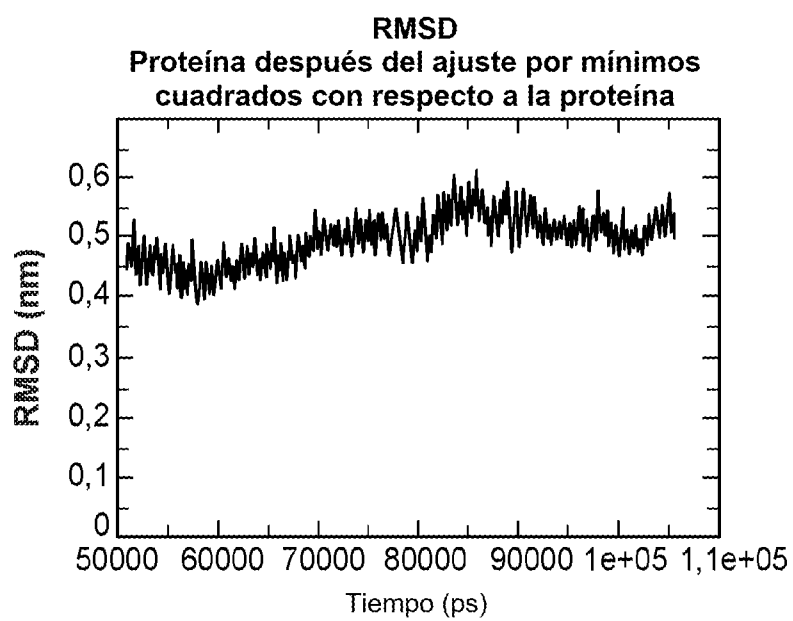


FIG. 3B

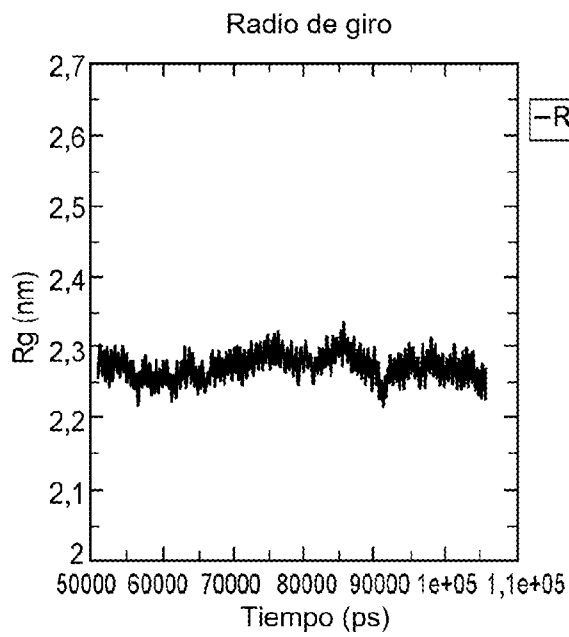


FIG. 3C

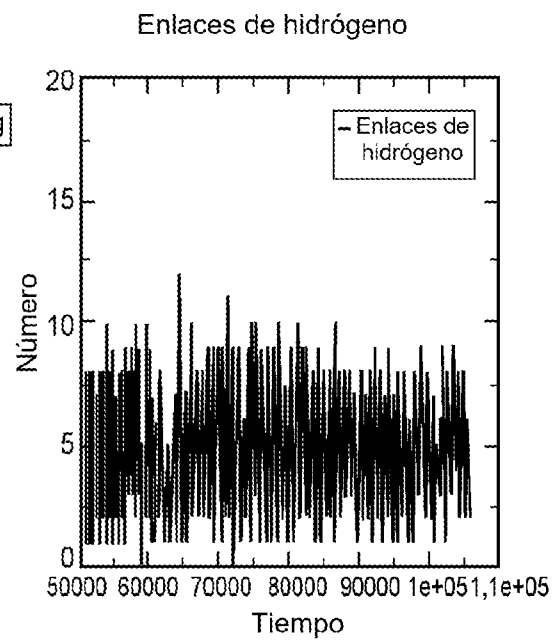
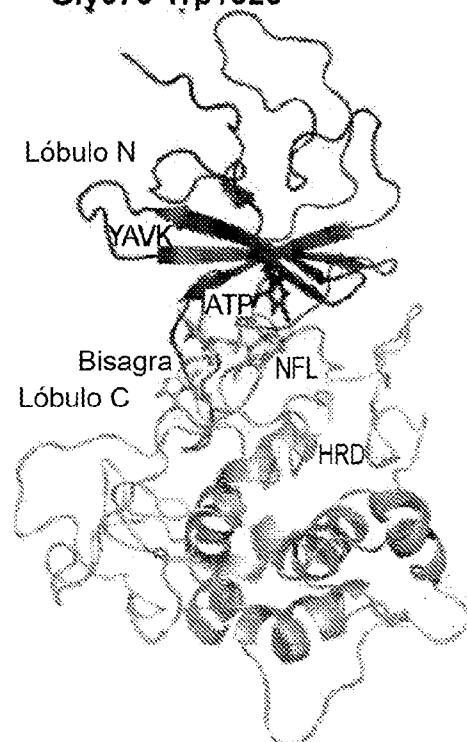


FIG. 3D

**Dominio cinasa de NACK
Gly975-Trp1326**



**Residuos de interacción
clave con ATP**

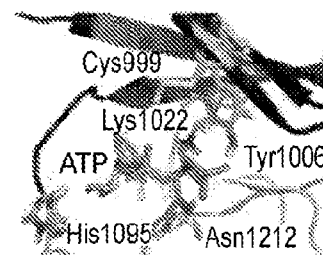


FIG. 4B

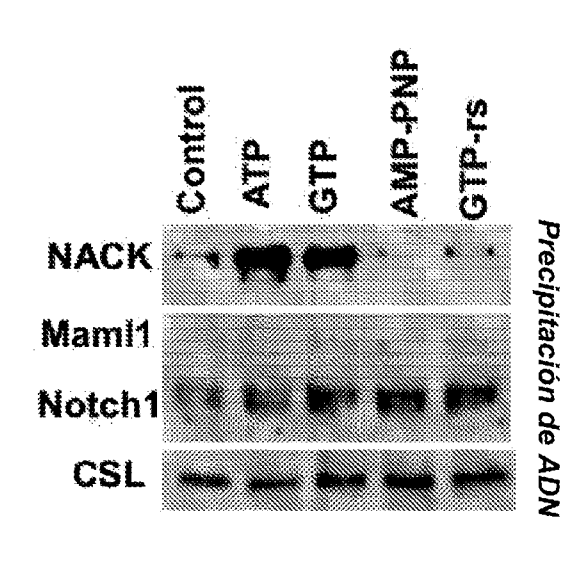


FIG. 4D

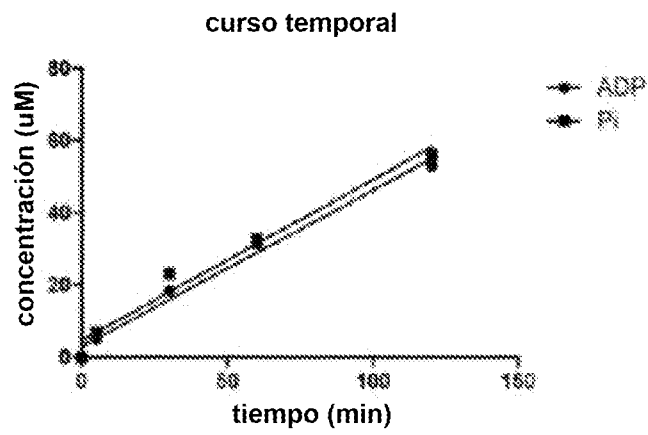


FIG. 4E

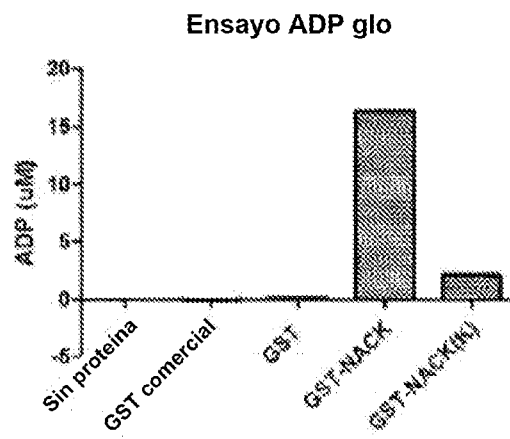


FIG. 5A

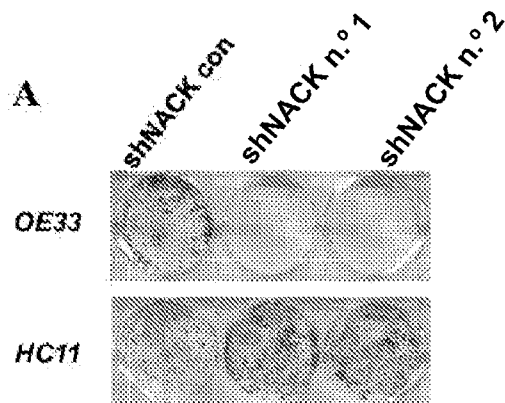


FIG. 5B

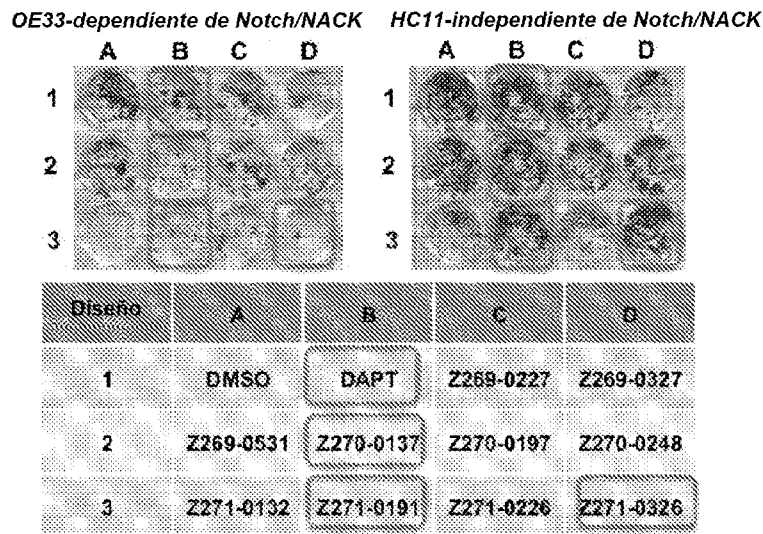


FIG. 5C

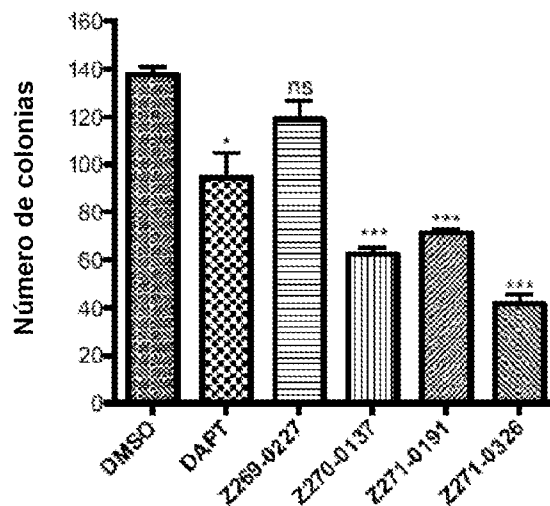


FIG. 6A

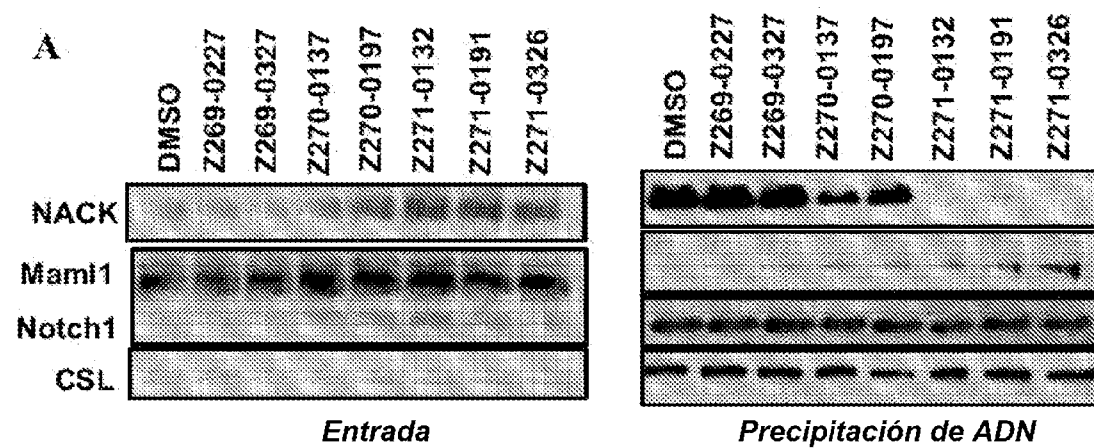


FIG. 6B

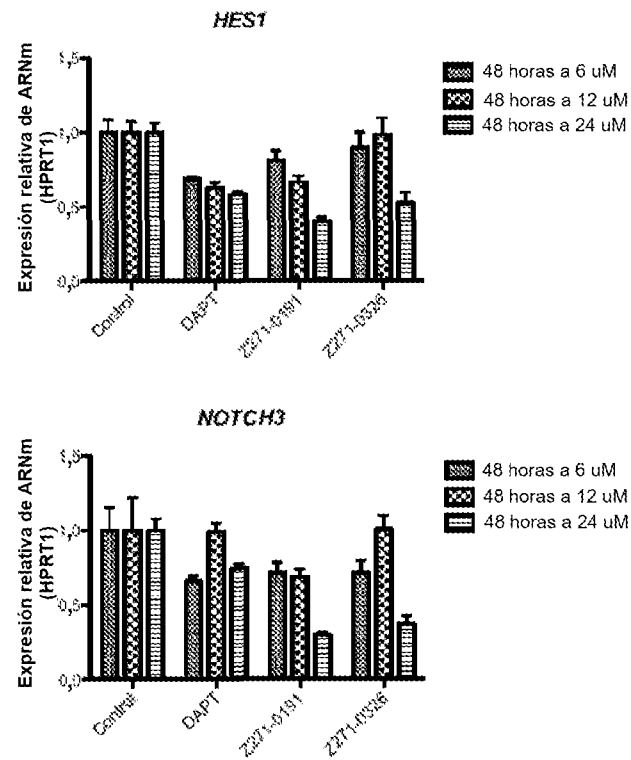


FIG. 6C

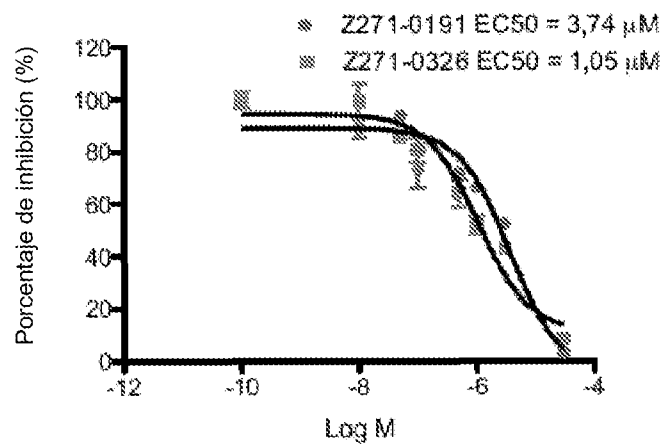


FIG. 7A

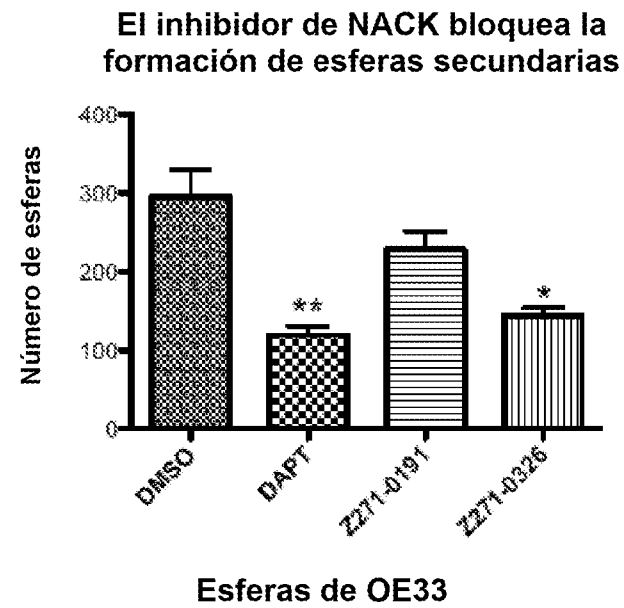


FIG. 7B

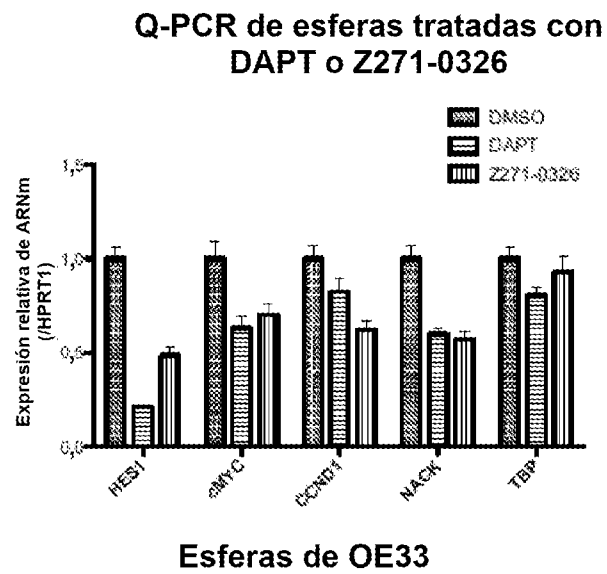


FIG. 7C

Z271-0326 inhibe la formación de esferas secundarias

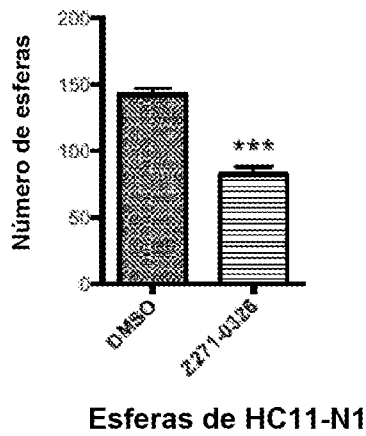


FIG. 7D

Q-PCR de esferas tratadas con Z271-0326

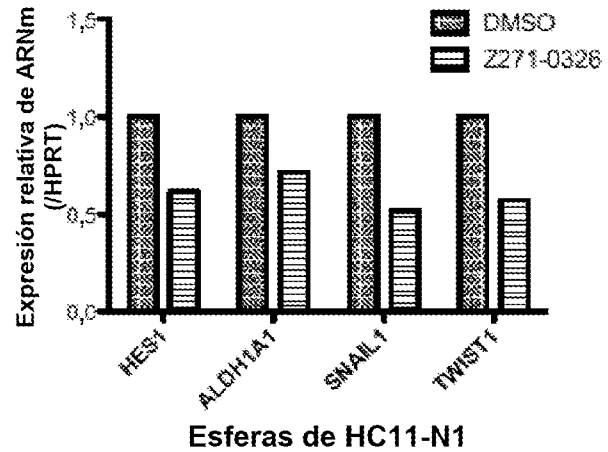


FIG. 8A

Inhibición a través de ARNhc

Clon 1A3 de shNACK inducible

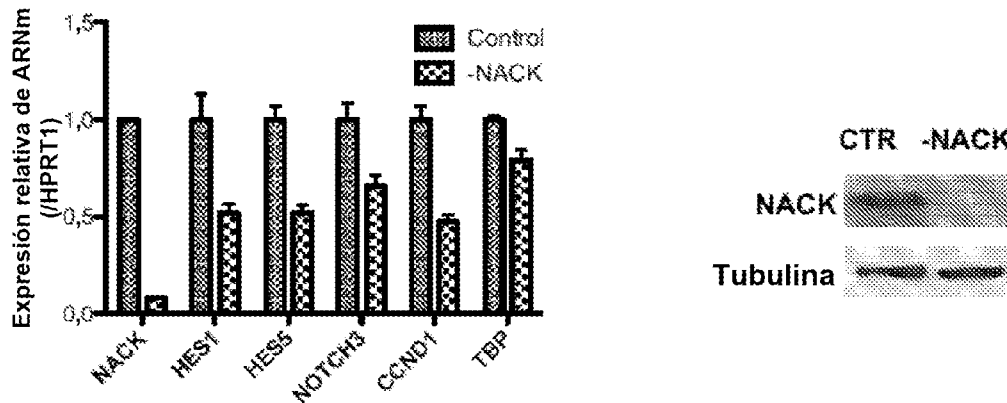


FIG. 8B

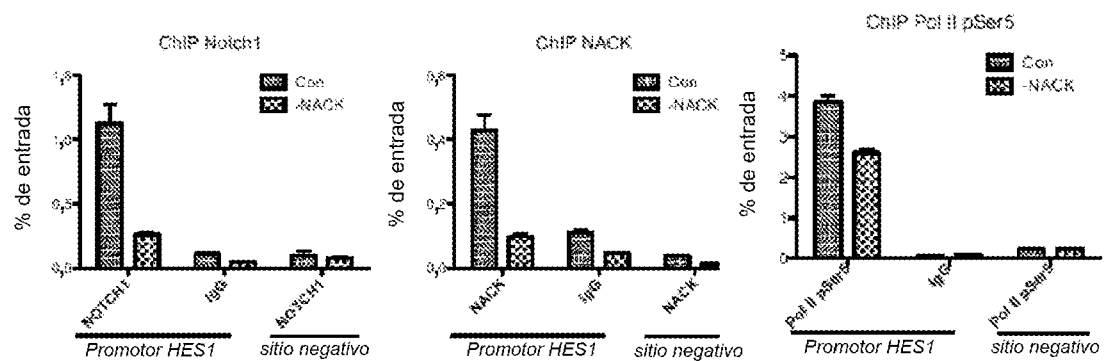


FIG. 8C

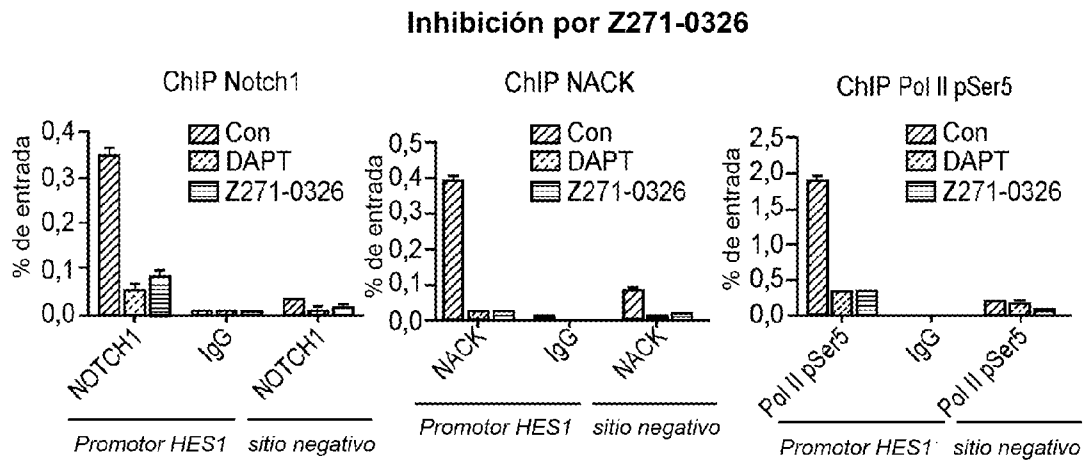


FIG. 9A

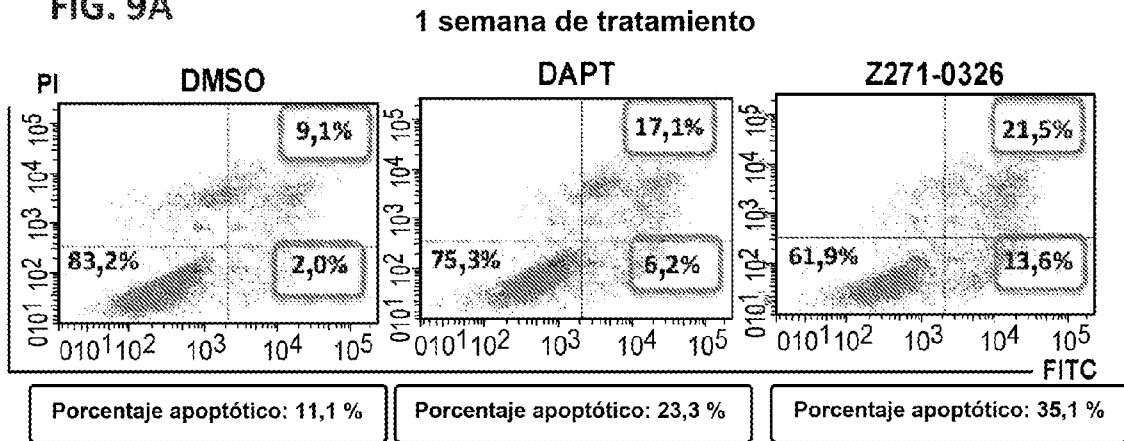


FIG. 9B

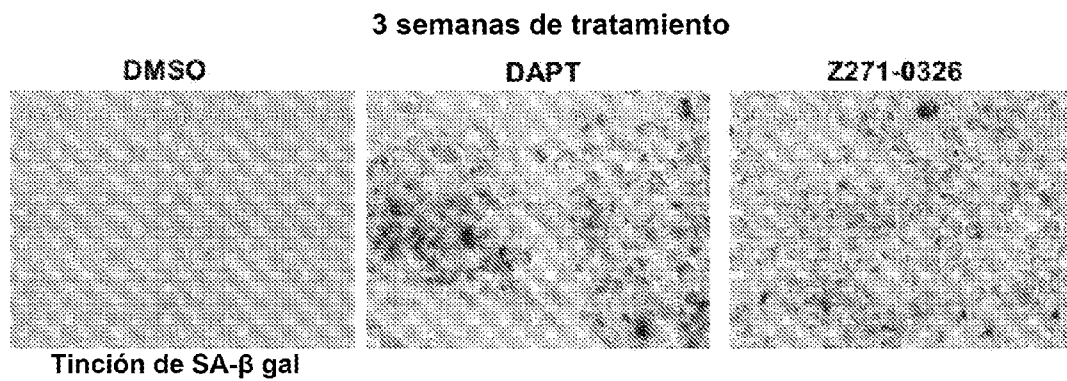


FIG. 10A

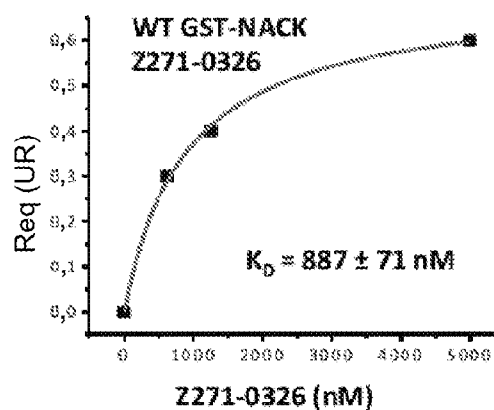
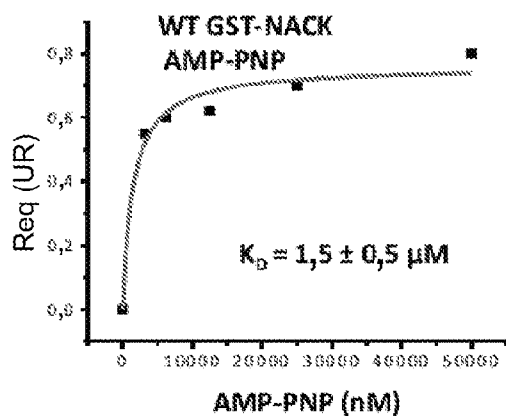


FIG. 10B

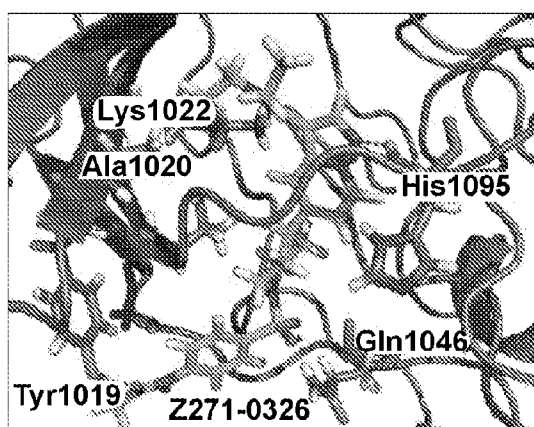


FIG. 10C

Residuos de NACK importantes responsables de la unión a Z271-0326

Residuo		Interacción
Lys 1022	Cadena lateral -NH ₃ ⁺	Enlace de H
His 1095	Cadena principal -NH-	Enlace de H
Gln 1046	Cadena lateral -NH ₂	Enlace de H
Tyr 1019	Cadena lateral -OH	Enlace de H
Ala 1020	Cadena lateral -CH ₃	Hidrófoba

FIG. 10D

La mutación de residuos de interacción Z271-0326 putativos insensibiliza a NACK

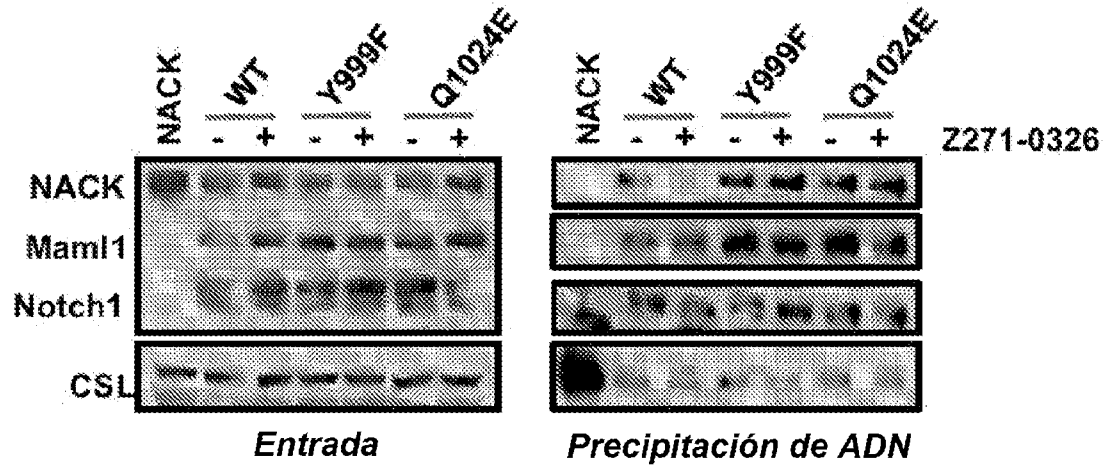


FIG. 11A

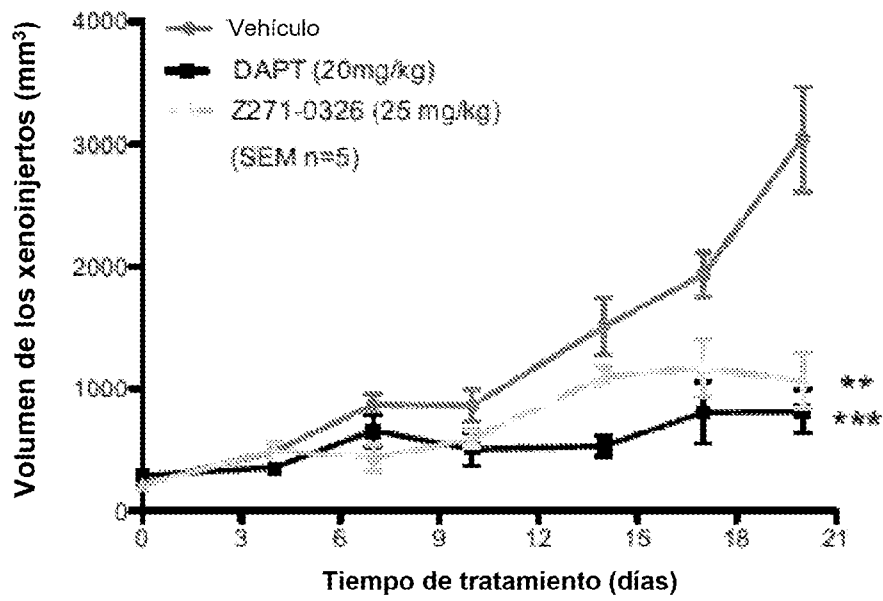


FIG. 11B

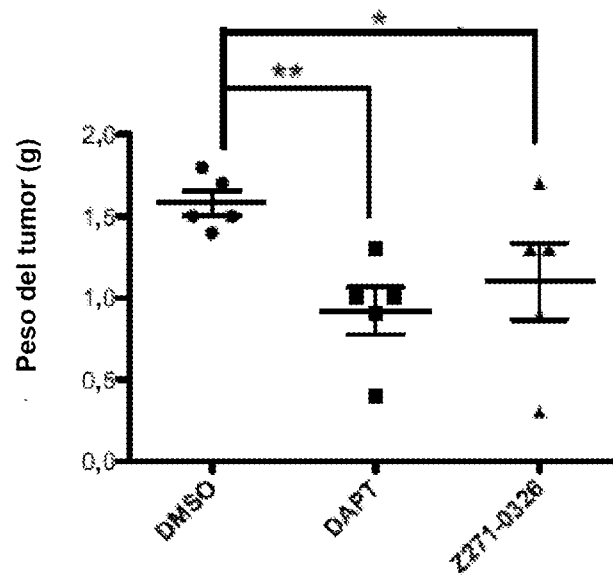


FIG. 11C

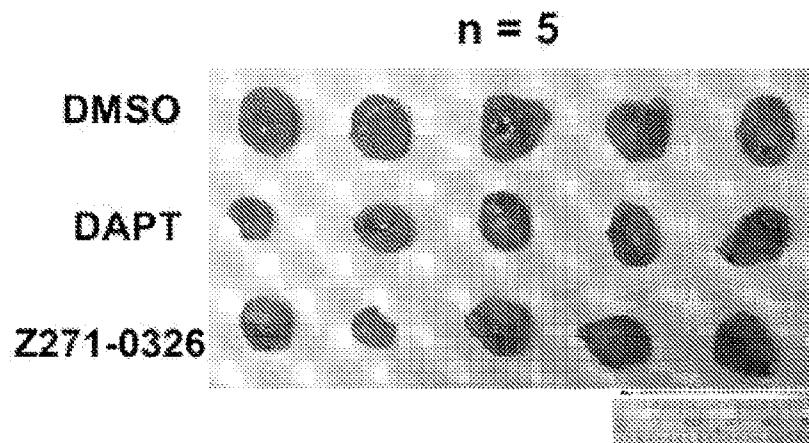


FIG. 11D

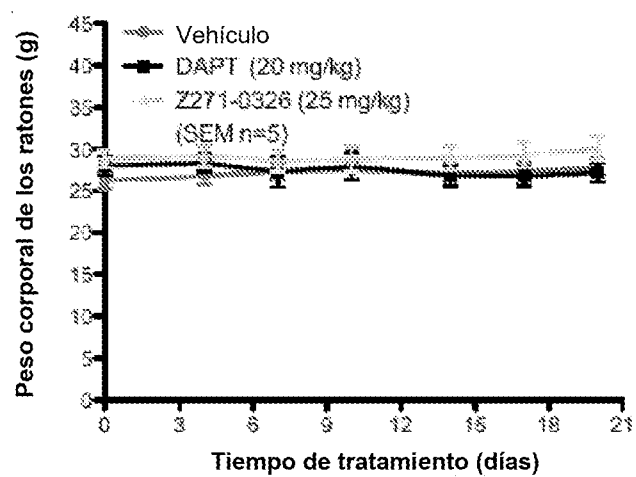


FIG. 11E

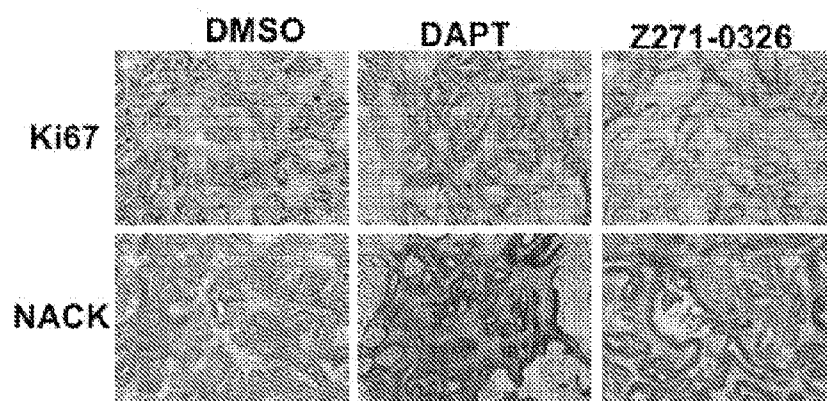


FIG. 12A

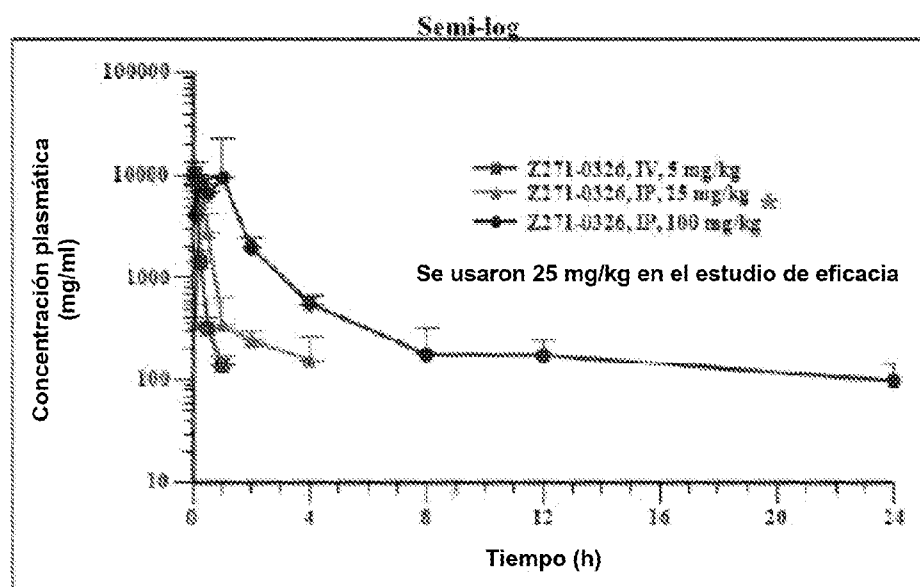


FIG. 12B

Parámetros farmacocinéticos de Z271-0326 en plasma después de una única administración intravenosa (5 mg/kg) e intraperitoneal (25 y 100 mg/kg) a ratones macho C57 BL/6

Vía	Dosis (mg/kg)	T _{máx} (h)	C ⁰ /C _{24h} (ng/ml)	AUC _{última} (h*ng/ml)	AUC _{tot} (h*ng/ml)	T _{1/2} (h)	CL (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)
IV	5	-	25078,74	2729,79	2769,49	0,23	30,09	0,21
IP	25	0,25	5344,40	2989,95	3592,35	-	-	-
IP	100	1,00	9481,07	19196,18	21767,19	-	-	-

FIG. 13A

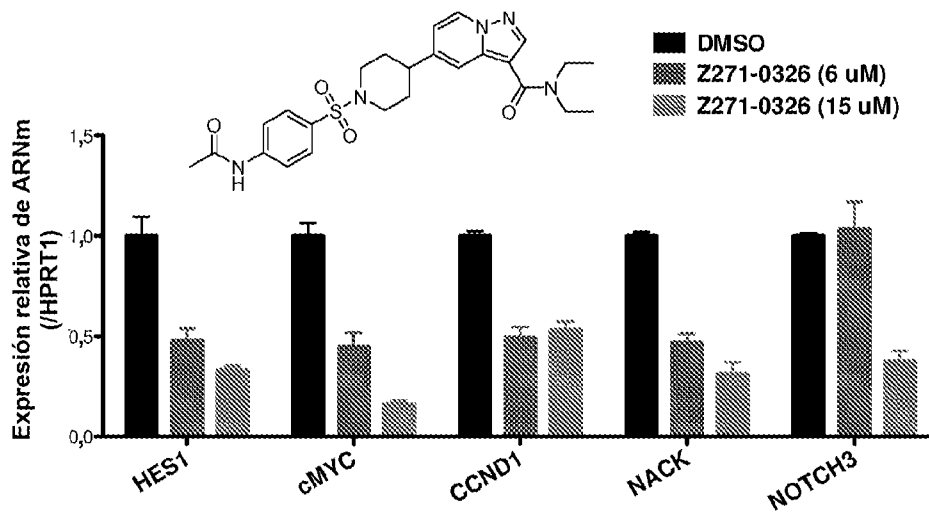


FIG. 13B

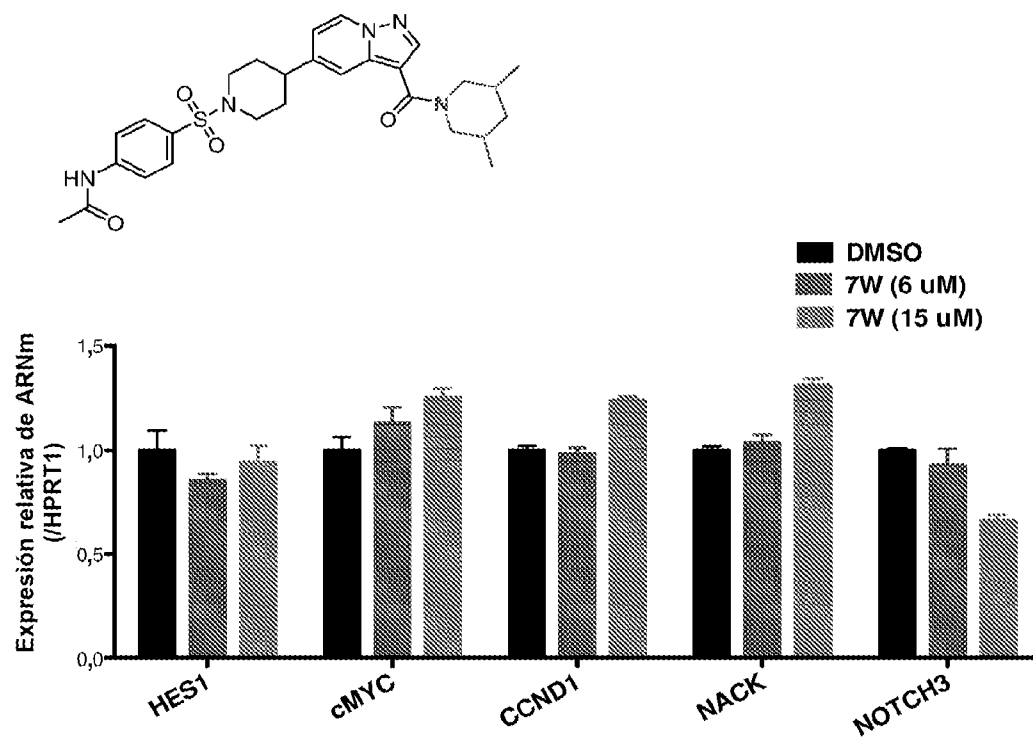


FIG. 13C

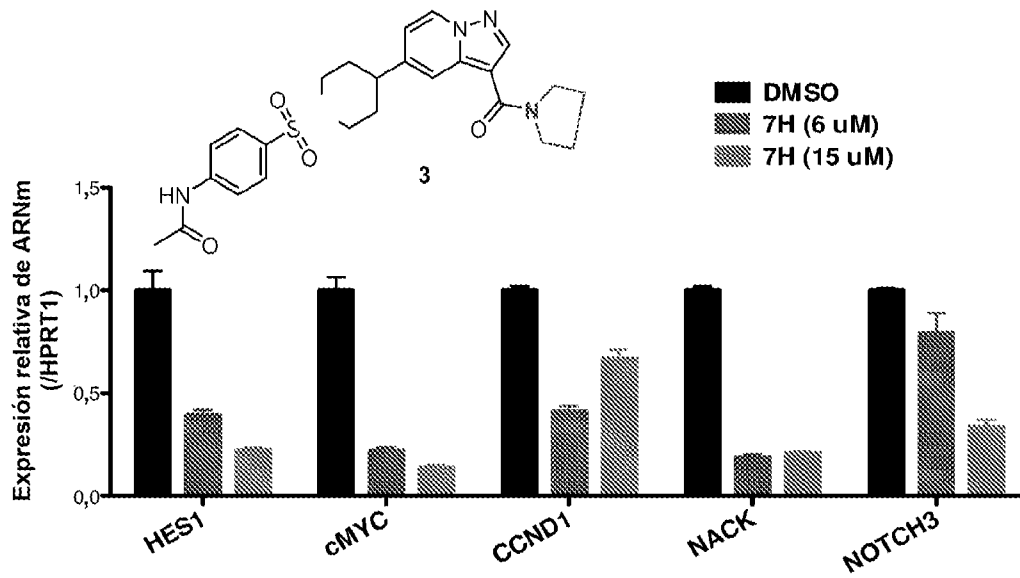
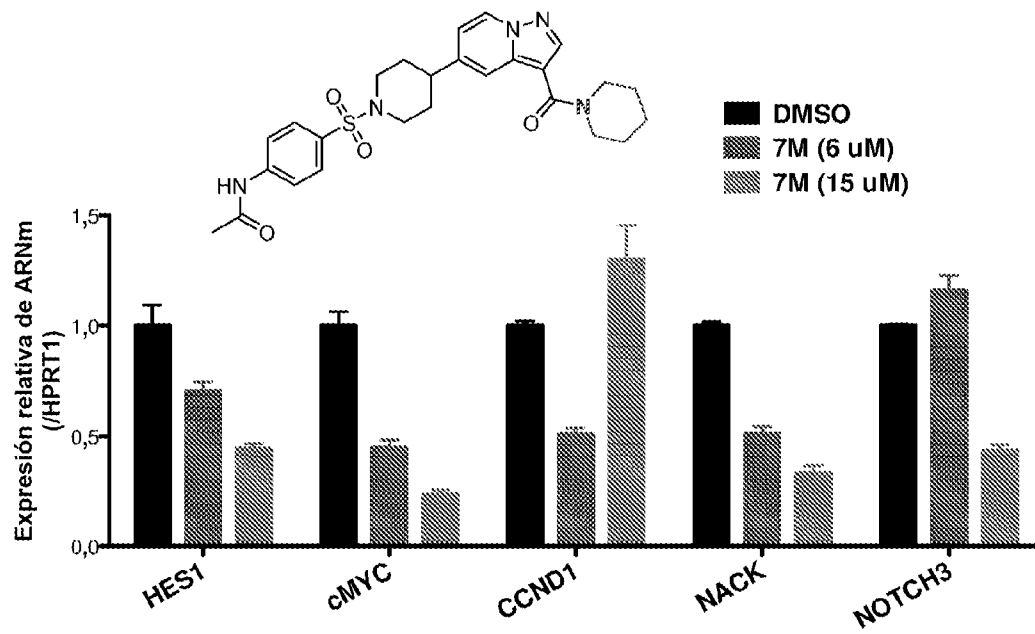


FIG. 13D



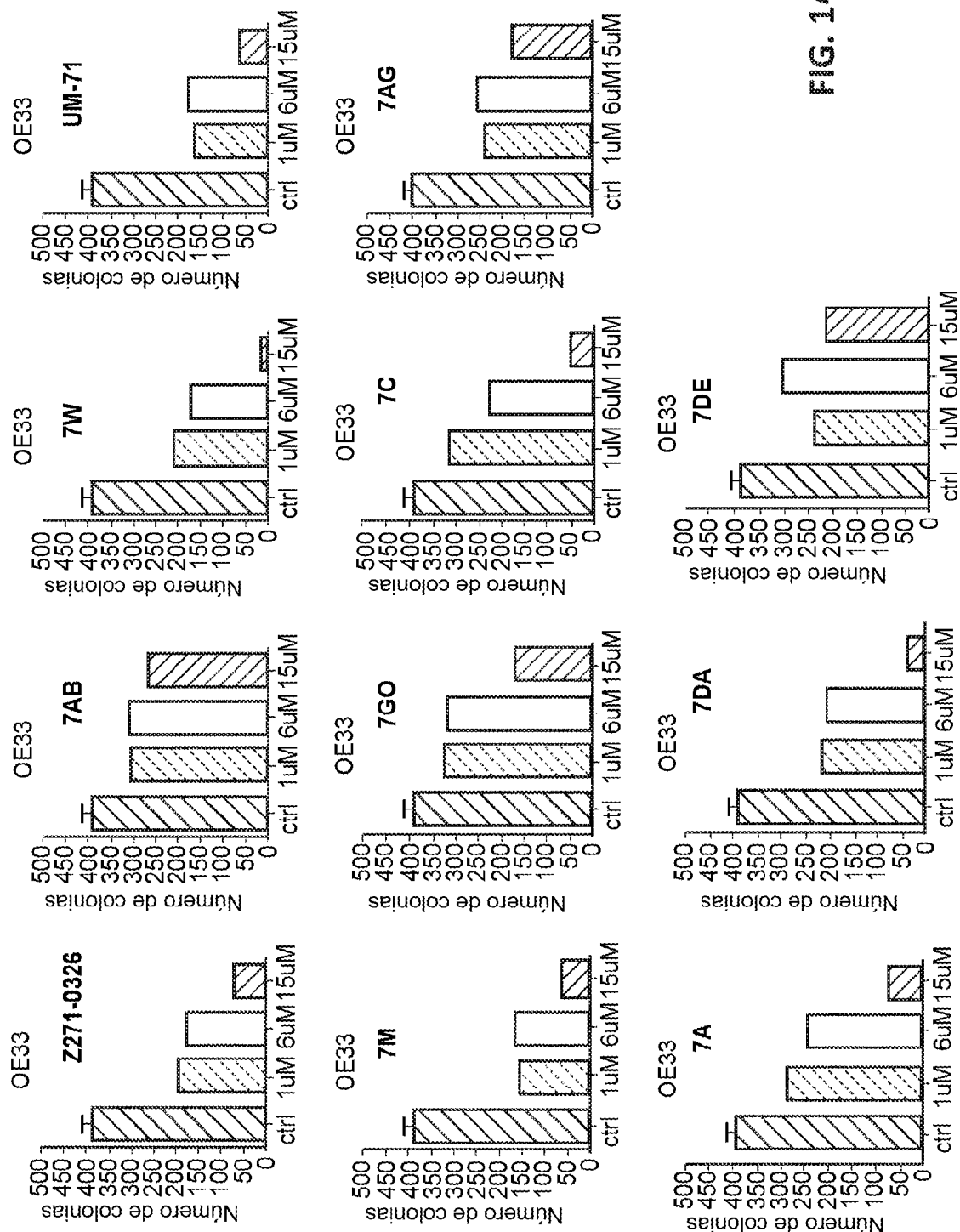


FIG. 14A

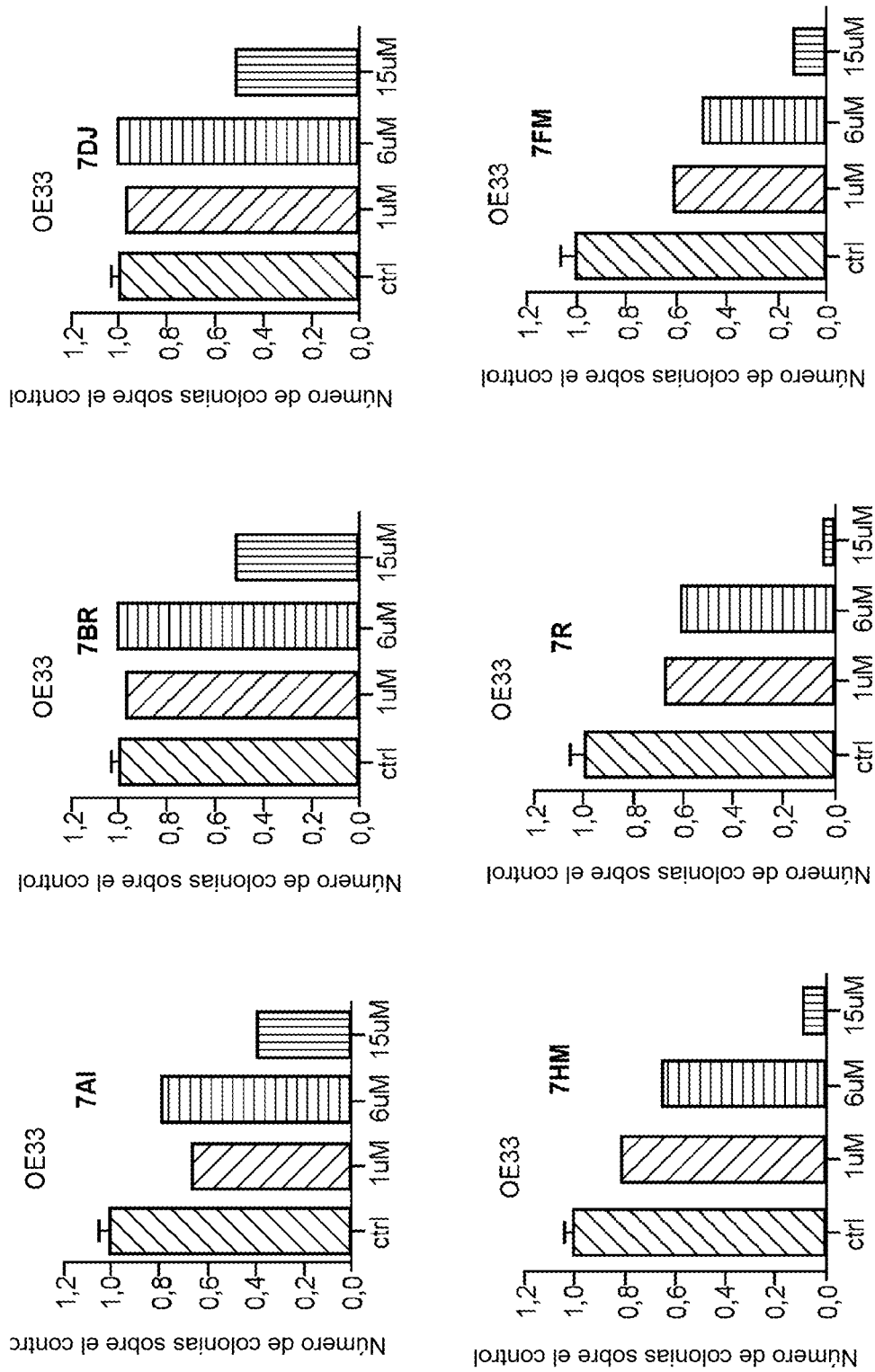


FIG. 14B

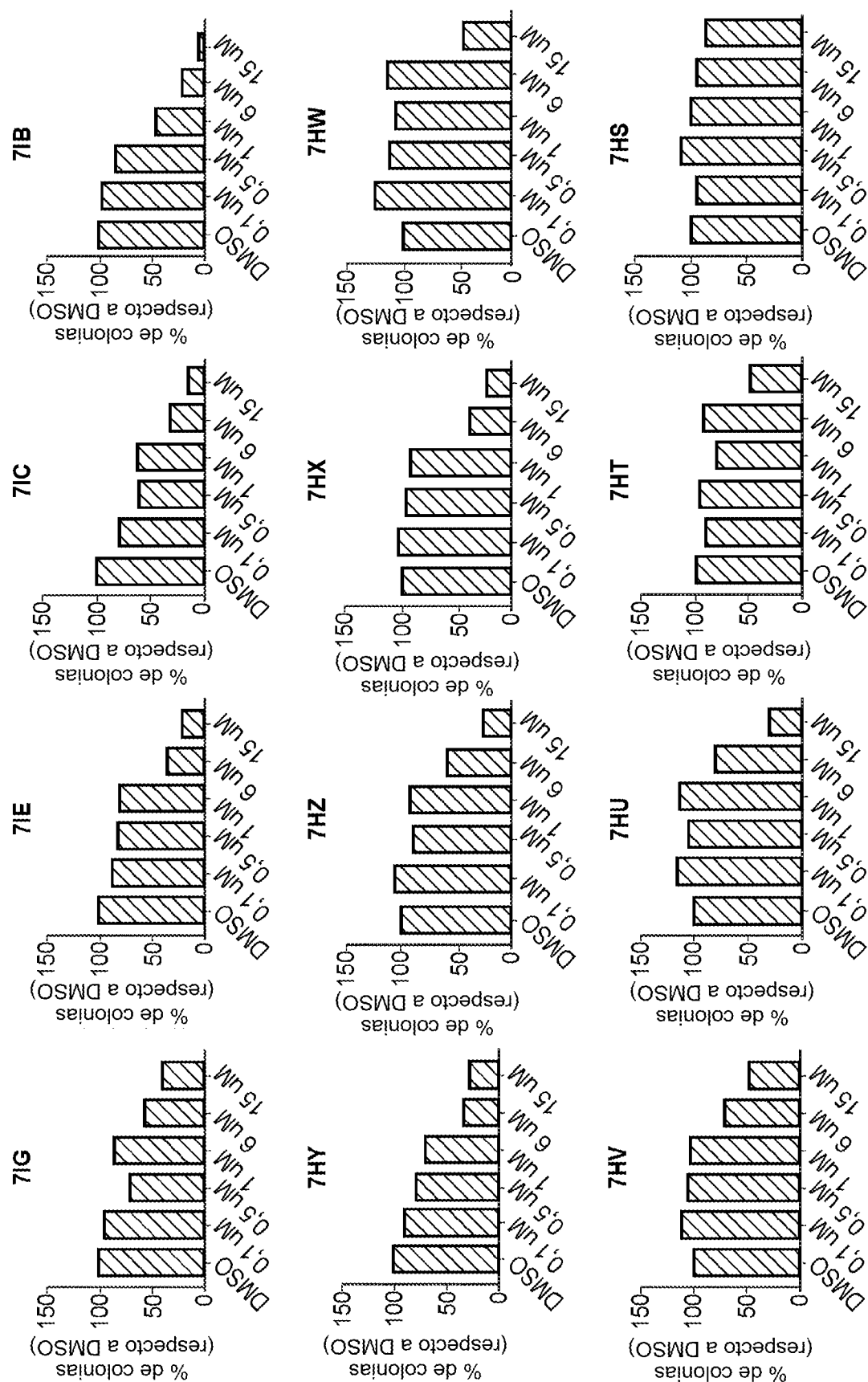


FIG. 15

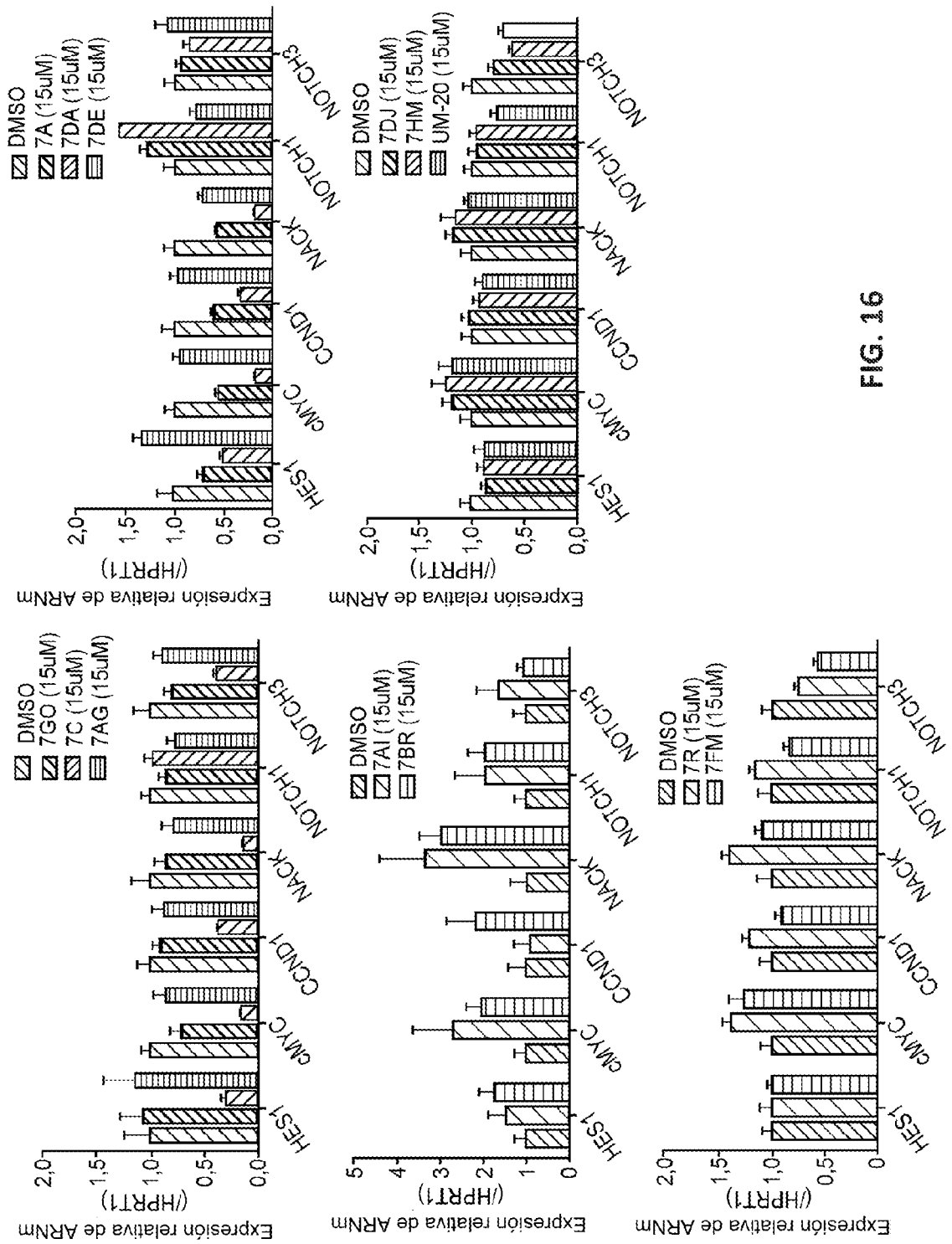


FIG. 16

FIG. 17A

Ensayo de cinasa MAP4K5

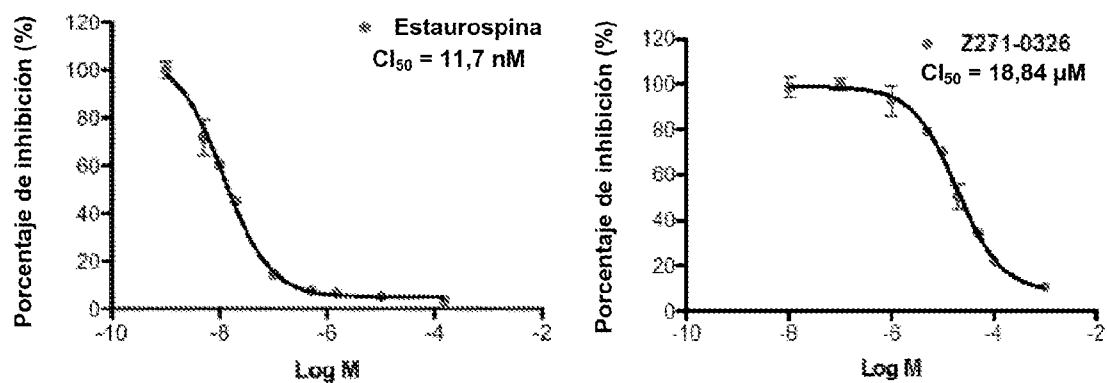


FIG. 17B

Ensayo de cinasa LCK

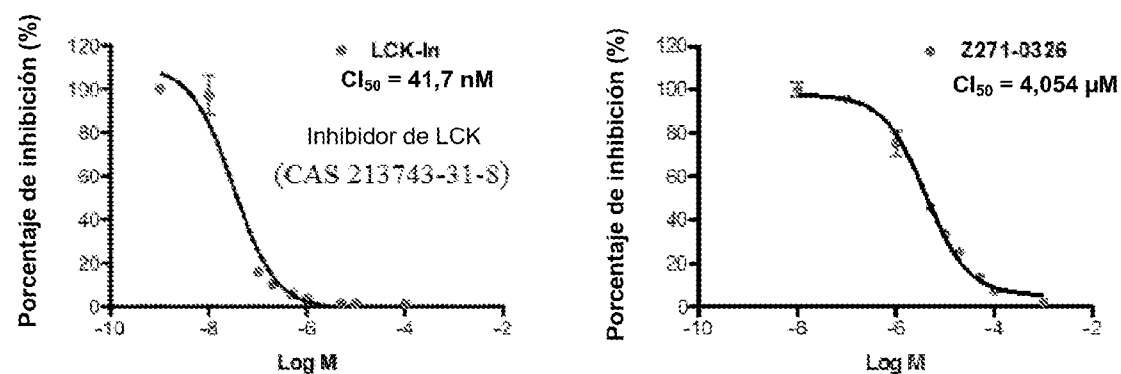


FIG. 17C

Ensayo de cinasa TNIK

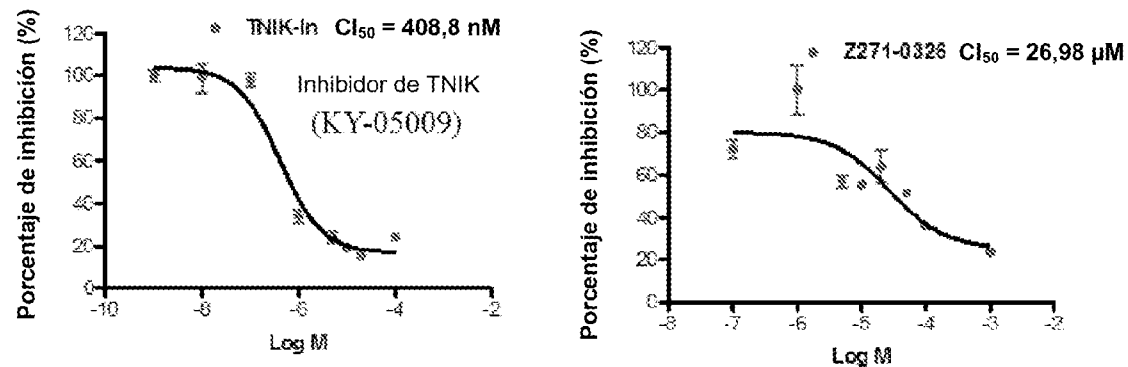


FIG. 18

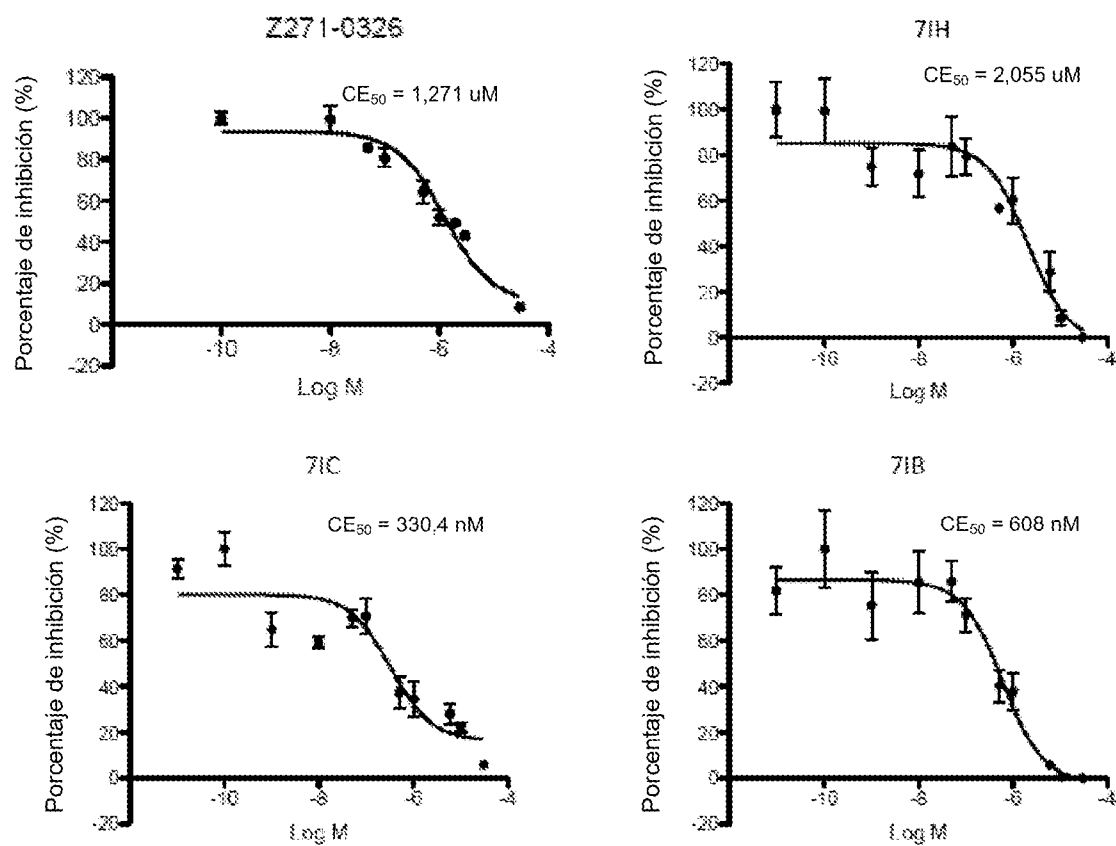


FIG. 19

