

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 382**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014** **PCT/US2014/054209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15035117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014** **E 14766634 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3041475**

54 Título: **Compuestos a base de pirazolo[1,5-a]pirimidina, composiciones que los comprenden y métodos para su uso**

30 Prioridad:

06.09.2013 US 201361874395 P

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

26.03.2025

73 Titular/es:

LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. (100.00%)
2445 Technology Forest Blvd., 11th Floor
The Woodlands, TX 77381, US

72 Inventor/es:

BI, YINGZHI;
GARDYAN, MICHAEL WALTER;
GREEN, MICHAEL ALAN;
KUMI, GODWIN y
ZHANG, YULIAN

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

ES 3 009 382 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos a base de pirazolo[1,5-a]pirimidina, composiciones que los comprenden y métodos para su uso

5 **1. CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] Esta invención se refiere a compuestos a base de pirazolo[1,5-a]pirimidina útiles como inhibidores de la cinasa 1 asociada con adaptador (AAK1), a composiciones que los comprenden y a métodos para su uso.

10 **2. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

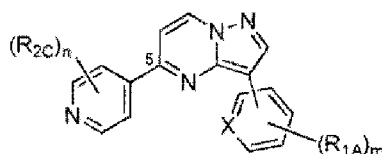
[0002] La cinasa 1 asociada con adaptador (AAK1) es un miembro de la familia Ark1/Prk1 de las serina/treonina cinasas. El ARNm de AAK1 existe en dos formas de corte y empalme denominadas corta y larga. La forma predominante es la larga y se expresa abundantemente en el cerebro y el corazón (Henderson y Conner, Mol. Biol. Cell. 2007, 18, 2698-2706). AAK1 está enriquecida en preparaciones sinaptosómicas y se localiza conjuntamente con estructuras endocíticas en células cultivadas. AAK1 modula la endocitosis recubierta de clatrina, un proceso que es importante en el reciclaje de vesículas sinápticas y en la endocitosis mediada por receptor. AAK1 se asocia con el complejo AP2, un heterotetrámero que une la carga del receptor al recubrimiento de clatrina. La unión de la clatrina a AAK1 estimula la actividad cinasa de AAK1 (Conner *et al.*, Traffic 2003, 4, 885-890; Jackson *et al.*, J. Cell. Biol. 2003, 163, 231-236). AAK1 fosforila la subunidad mu-2 de AP-2, que promueve la unión de mu-2 a los motivos de clasificación que contienen tirosina en los receptores de carga (Ricotta *et al.*, J. Cell Bio. 2002, 156, 791-795; Conner y Schmid, J. Cell Bio. 2002, 156, 921-929). No es necesaria la fosforilación de Mu2 para la captación por el receptor, pero su fosforilación potencia la eficiencia de la internalización (Motely *et al.*, Mol. Biol. Cell. 2006, 17, 5298-5308).

[0003] Se ha identificado a AAK1 como un inhibidor de la señalización de Neuregulina-1/ERbB4 en células PC12. La pérdida de expresión de AAK1 a través de silenciamiento génico mediado por interferencia de ARN o tratamiento con el inhibidor de cinasa K252a (que inhibe la actividad cinasa de AAK1) da como resultado la potenciación del crecimiento de neuritas inducido por Neuregulina-1. Estos tratamientos dan como resultado una expresión aumentada de ErbB4 y una acumulación de ErbB4 en o próxima a la membrana plasmática (Kuai *et al.*, Chemistry and Biology 2011, 18, 891-906). NRG1 y ErbB4 son supuestos genes de susceptibilidad a la esquizofrenia (Buonanno, Brain Res. Bull. 2010, 83, 122-131). Se han asociado SNP en ambos genes con múltiples endofenotipos de esquizofrenia (Greenwood *et al.*, Am. J. Psychiatry 2011, 168, 930-946). Algunos modelos de ratón KO para neuregulina 1 y ErbB4 han demostrado cambios morfológicos para la esquizofrenia y fenotipos conductuales relevantes (Jaaro-Peled *et al.*, Schizophrenia Bulletin 2010, 36, 301-313; Wen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010, 107, 1211-1216). Además, se ha asociado un polimorfismo de un solo nucleótido en un intrón del gen de AAK1 con la edad de aparición de la enfermedad de Parkinson (Latourelle *et al.*, BMC Med. Genet. 2009, 10, 98). Estos resultados sugieren que la inhibición de la actividad de AAK1 puede tener utilidad en el tratamiento de la esquizofrenia, déficits cognitivos en la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, el trastorno bipolar y la enfermedad de Alzheimer. Los documentos WO2010135581, WO20080455664, WO2011073316, WO2006099972, WO2007039439 y WO2005040171 divulgan el uso de pirazolo-pirimidinas que no forman parte de la presente invención para tratar el dolor

3. **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

[0004] La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y/o medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

[0005] Esta invención se refiere, en parte, a inhibidores de AAK1 de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

- 55 X es CH o N;
 cada R_{1A} es independientemente -OR_{1C}, -N(R_{1C})₂, -C(O)R_{1C}, -C(O)OR_{1C}, -C(O)N(R_{1C})₂, -N(R_{1C})C(O)OR_{1C}, ciano, halo o hidrocarbilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de R_{1B};
 cada R_{1B} es independientemente -OR_{1C}, -N(R_{1C})₂, -C(O)R_{1C}, -C(O)OR_{1C}, -C(O)N(R_{1C})₂, -N(R_{1C})C(O)OR_{1C}, ciano o halo;
 60 cada R_{1C} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12

miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de ciano, halo o hidroxilo;
 cada R_{2C} es independientemente $-OR_{2D}$, $-N(R_{2D})_2$, $-C(O)R_{2D}$, $-C(O)OR_{2D}$, $-C(O)N(R_{2D})_2$, $-N(R_{2D})C(O)OR_{2D}$, ciano,
 halo, oxo o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional
 es una o más sustituciones de amino, ciano, halo, hidroxilo o R_{2D} ;

cada R_{2D} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12
 miembros, cuya sustitución opcional es una o más de una sustitución de amino, ciano, halo, hidroxilo;

n es 1-3; y
 m es 0-3.

[0006] Una realización de la invención abarca composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que
 comprenden un compuesto divulgado en el presente documento (es decir, un compuesto de la invención).

[0007] Se divulgan compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en la enfermedad de
 Alzheimer, trastorno bipolar, dolor, enfermedad de Parkinson y esquizofrenia o para tratar el dolor.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0008] Los aspectos de la invención se ilustran en la figura 1, que muestra los resultados obtenidos a partir de un
 modelo de dolor con formalina usando ratones con inactivación génica homocigotos (-/-) AAK1 y sus compañeros de
 camada de tipo natural (+/+). Los ratones con inactivación génica homocigotos (-/-) AAK1 muestran una clara
 reducción tanto en la respuesta al dolor agudo como tónico en comparación con sus compañeros de camada de tipo
 natural (+/+).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0009] Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los ratones con inactivación génica AAK1
 presentan una elevada resistencia al dolor. Este descubrimiento propició una investigación que, en última instancia,
 dio lugar al descubrimiento de inhibidores de AAK1, composiciones que los comprenden y métodos de su uso.

5.1. DEFINICIONES

[0010] A menos que se indique lo contrario, las expresiones "compuestos de la invención", "compuestos de la
 presente divulgación", y similares se refieren a compuestos divulgados en el presente documento.

[0011] A menos que se indique lo contrario, el término "hidrocarbilo" significa un resto alicíclico o alifático que tiene
 una cadena principal de carbono y que consiste en átomos de hidrógeno y carbono. Los ejemplos de grupos
 hidrocarbilo incluyen aquellos que tienen 1-20, 1-12, 1-6 y 1-4 átomos de carbono (denominados hidrocarbilo C_{1-20} ,
 hidrocarbilo C_{1-12} , hidrocarbilo C_{1-6} e hidrocarbilo C_{1-4} , respectivamente). Los ejemplos particulares incluyen alquilo,
 alquenilo, alquinilo, arilo, bencilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquilalquilo, cicloalquenilalquilo, naftilo, fenilo y
 feniletilo.

[0012] Los ejemplos de restos alquilo incluyen restos de cadena lineal y ramificada que tienen 1-20, 1-12, 1-6, 1-4 y
 1-3 átomos de carbono (denominados alquilo C_{1-20} , alquilo C_{1-12} , alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-4} y alquilo C_{1-3} ,
 respectivamente). Los ejemplos particulares incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo,
 hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo.

[0013] Los ejemplos de restos alquenilo incluyen alquenilo C_{2-20} , C_{2-12} y C_{2-6} de cadena lineal y ramificada. Los
 ejemplos particulares incluyen vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-
 butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1-heptenilo, 2-heptenilo, 3-
 heptenilo, 1-octenilo, 2-octenilo, 3-octenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 1-decenilo, 2-decenilo y 3-decenilo.

[0014] Los ejemplos de restos alquinilo incluyen alquinilo C_{2-20} , C_{2-12} y C_{2-6} de cadena lineal y ramificada. Los
 ejemplos particulares incluyen etinilo y 2-propinilo (propargilo).

[0015] Los ejemplos de restos arilo incluyen antraceno, azuleno, fluoreno, indano, indenilo, naftilo, fenilo y
 fenantreno.

[0016] Los ejemplos de restos cicloalquilo incluyen cicloalquilo C_{3-12} , C_{3-7} , C_{4-6} y C_6 . Los ejemplos particulares
 incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y adamantilo.

[0017] A menos que se indique lo contrario, el término "halo" abarca flúor, cloro, bromo y yodo.

[0018] A menos que se indique lo contrario, el término "heterocarbilo" se refiere a un resto que tiene una estructura
 principal constituida por uno o más átomos de carbono y uno o más heteroátomos. Los heteroátomos particulares son
 nitrógeno, oxígeno y azufre. Un resto heterocarbilo puede considerarse como un resto hidrocarbilo en donde al menos
 un átomo de carbono, un grupo CH , CH_2 o CH_3 se reemplaza por uno o más heteroátomos y el número requerido de

átomos de hidrógeno para satisfacer las valencias. Los ejemplos de heterocarbilo incluyen restos heterocarbilo de 2-20, 2-12, 2-8, 2-6 y 2-4 miembros, en donde el intervalo numérico se refiere a la suma total de átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y/o azufre en el resto. Por lo tanto, la expresión "heterocarbilo de 2-12 miembros" se refiere a un resto heterocarbilo que tiene un total de 2-12 átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Los restos heterocarbilo particulares incluyen heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo de cadena lineal y ramificada, así como heterociclo y heteroarilo.

[0019] Los ejemplos de restos heteroalquilo incluyen restos heteroalquilo de 2-8 miembros, de 2-6 miembros y de 2-4 miembros. Los ejemplos particulares incluyen alcoxilo, acilo (por ejemplo, formilo, acetilo, benzoílo), alquilamino (por ejemplo, di-(alquil C₁₋₃)amino), arilamino, ariloxima, carbamatos, carbamidas, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilsulfanilo, arilsulfanilo, alquilsulfínilo, arilsulfínilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilamino y arilsulfonilamino.

[0020] A menos que se indique lo contrario, el término "heterociclo" se refiere a un resto heterocarbilo cíclico (monocíclico o policíclico) que puede ser aromático, parcialmente aromático o no aromático. Los heterociclos incluyen heteroarilos. Los ejemplos incluyen heterociclos de 4-10 miembros, de 4-7 miembros, de 6 miembros y de 5 miembros. Los ejemplos particulares incluyen benzo[1,3]dioxolilo, 2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxinilo, cinolinilo, furanilo, hidantoinilo, morfolinilo, oxetanilo, oxiranilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y valerolactamilo. Debido a que el término "heterociclo" se refiere a un anillo, por sí solo no abarca restos tales como oxazolidinona e imidazolidinona: dichos restos se consideran heterociclos sustituidos, es decir, heterociclos sustituidos con oxo.

[0021] Los ejemplos de restos heteroarilo incluyen acridinilo, benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzoisotiazolilo, benzoisoxazolilo, benzoquinazolinilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, indolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, ftalazinilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, tetrazolilo, tiazolilo y triazinilo.

[0022] A menos que se indique lo contrario, el término "incluyen" tiene el mismo significado que "incluyen, pero sin limitación", y el término "incluye" tiene el mismo significado que "incluye, pero sin limitación". De manera similar, la expresión "tal como" tiene el mismo significado que el término "tal como, pero sin limitación".

[0023] A menos que se indique lo contrario, los términos y expresiones "gestionar", "que gestiona" y "gestión" incluyen la prevención de la recidiva de la enfermedad o trastorno especificado en un paciente que ya ha padecido la enfermedad o trastorno y/o la prolongación del tiempo que un paciente que ha padecido la enfermedad o trastorno permanece en remisión. Los términos abarcan la modulación del umbral, el desarrollo y/o la duración de la enfermedad o trastorno o cambiar la forma en que un paciente responde a la enfermedad o trastorno.

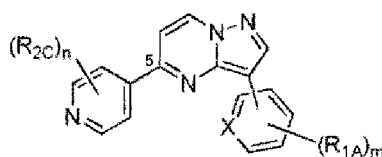
[0024] A menos que se indique lo contrario, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de una enfermedad o afección o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados a la enfermedad o afección. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o junto con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de la enfermedad o afección. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" puede abarcar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita síntomas o causas de una enfermedad o afección o mejora la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

[0025] A menos que se indique lo contrario, los términos y expresiones "tratar", "que trata" y "tratamiento" contemplan una acción que se produce mientras un paciente padece la enfermedad o trastorno especificado, que reduce la gravedad de la enfermedad o trastorno o retrasa o ralentiza la progresión de la enfermedad o trastorno.

[0026] A menos que se indique lo contrario, uno o más adjetivos que preceden inmediatamente a una serie de sustantivos debe interpretarse como aplicable a cada uno de los sustantivos. Por ejemplo, la expresión "alquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido" tiene el mismo significado que "alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido".

5.2. COMPUESTOS

[0027] Esta invención abarca compuestos de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

X es CH o N;

cada R_{1A} es independientemente $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$, $-C(O)N(R_{1C})_2$, $-N(R_{1C})C(O)OR_{1C}$, ciano, halo o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de R_{1B} ;

cada R_{1B} es independientemente $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$, $-C(O)N(R_{1C})_2$, $-N(R_{1C})C(O)OR_{1C}$, ciano o halo;

cada R_{1C} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de ciano, halo o hidroxilo;

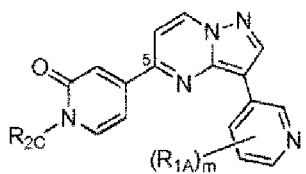
cada R_{2C} es independientemente $-OR_{2D}$, $-N(R_{2D})_2$, $-C(O)R_{2D}$, $-C(O)OR_{2D}$, $-C(O)N(R_{2D})_2$, $-N(R_{2D})C(O)OR_{2D}$, ciano, halo, oxo o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de amino, ciano, halo, hidroxilo o R_{2D} ;

cada R_{2D} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o heterocarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más de una sustitución de amino, ciano, halo, hidroxilo;

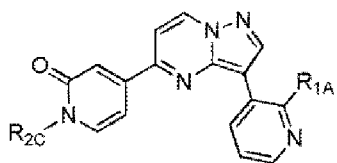
n es 1-3; y

m es 0-3.

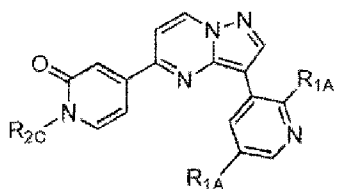
Algunos compuestos de la invención son de fórmula:



[0028] Algunos son de fórmula:



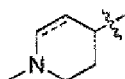
[0029] Algunos son de fórmula:



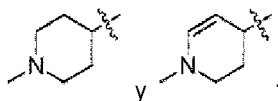
[0030] Con referencia a las diversas fórmulas divulgadas en el presente documento, las realizaciones de la invención abarcan compuestos en donde se satisface uno o más de los siguientes:

- n es 2
- R_{1A} es halo
- R_{1A} es $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$ o $-C(O)N(R_{1C})_2$
- R_{1A} es $-OR_{1C}$
- R_{1C} es hidrógeno
- R_{1C} es hidrocarbilo C_{1-12} (por ejemplo, hidrocarbilo C_{1-6} , hidrocarbilo C_{1-4} , tal como metilo, etilo, propilo)
- R_{2C} es hidrocarbilo C_{1-12}
- R_{2D} es halo
- R_{2D} es hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, cuya sustitución opcional es con uno o más de amino, ciano, halo, hidroxilo
- R_{2D} es heterocarbilo de 2-12 miembros que comprende al menos un átomo de nitrógeno

[0031] En las estructuras que se muestran en el presente documento, los enlaces representados por una línea continua y una línea discontinua son dobles enlaces sencillos. Por lo tanto, el resto



abarca ambos de los siguientes:



[0032] Los compuestos de la invención pueden tener uno o más centros asimétricos. A menos que se indique lo contrario, la presente invención abarca todos los estereoisómeros de los compuestos, así como mezclas de los mismos. Los estereoisómeros individuales de los compuestos se pueden preparar sintéticamente a partir de materiales de partida disponibles comercialmente que contienen centros quirales o mediante la preparación de mezclas de productos enantioméricos seguida de separación, tal como conversión a una mezcla de diastereómeros seguida de separación o recristalización, técnicas cromatográficas o separación directa de enantiómeros en columnas de cromatografía quiral. Los compuestos de partida de estereoquímica particular están disponibles comercialmente o se pueden preparar y resolver mediante técnicas conocidas en la técnica.

[0033] Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir también en diferentes formas conformacionales estables que pueden ser separables. La asimetría de torsión debida a la rotación restringida alrededor de un enlace sencillo asimétrico, por ejemplo, debida a un impedimento estérico o tensión en el anillo, puede permitir la separación de los diferentes conformeros. La presente divulgación incluye cada isómero conformacional de estos compuestos y mezclas de los mismos.

[0034] La presente divulgación pretende incluir todos los isótopos de los átomos que se encuentran en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Los compuestos marcados isotópicamente de la invención se pueden preparar generalmente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado de otro modo. Dichos compuestos pueden tener una diversidad de usos potenciales, por ejemplo, como patrones y reactivos para determinar la actividad biológica. En el caso de isótopos estables, dichos compuestos pueden tener el potencial de modificar favorablemente propiedades biológicas, farmacológicas o farmacocinéticas.

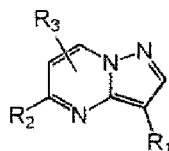
[0035] Los compuestos de la presente divulgación pueden existir como sales farmacéuticamente aceptables. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, representa sales o formas zwitteriónicas de los compuestos de la presente divulgación que son solubles o dispersables en agua o aceite, que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los pacientes sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable y son eficaces para su uso previsto. Las sales se pueden preparar durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos o por separado haciendo reaccionar un átomo de nitrógeno adecuado con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, dibromidrato, diclorhidrato, diyodhidrato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mesitilensulfonato, metanosulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, para-toluenosulfonato y undecanoato. Los ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico y cítrico.

[0036] Las sales de adición básicas se pueden preparar durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos haciendo reaccionar un grupo carboxi con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico o con amoniaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Los cationes de las sales farmacéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de aminas cuaternarias tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina y N,N'-dibenciletilendiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

[0037] Los compuestos particulares de la invención inhiben AAK1 con una CI_{50} inferior a 0,1, 0,01 o 0,001 μM , según lo medido en el ensayo de placa de filtro P81 descrito a continuación en los Ejemplos. Los compuestos particulares de la invención inhiben AAK1 con una CI_{50} inferior a 0,1, 0,01 o 0,001 μM , según lo medido en el ensayo basado en células HEK281 descrito a continuación en los Ejemplos.

5.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS

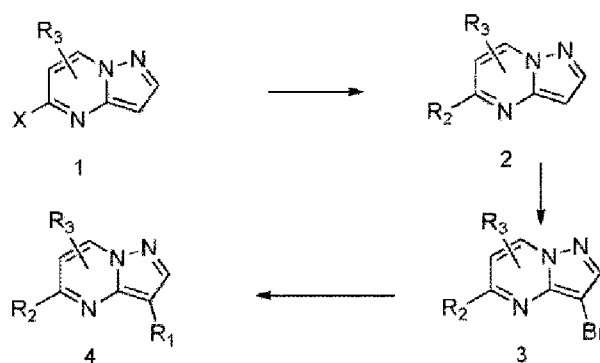
[0038] Los compuestos de la presente invención (es decir, los compuestos divulgados en el presente documento) se pueden preparar utilizando los métodos descritos a continuación y usando métodos conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica. Los compuestos particulares son de fórmula general:



en donde R_1 , R_2 y R_3 se definen en el presente documento, e incluyen sales de los mismos. Estos compuestos se pueden preparar mediante los métodos que se describen a continuación.

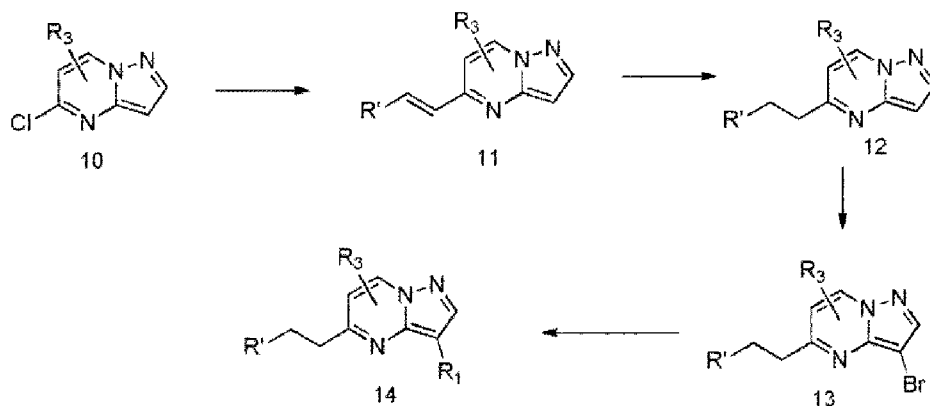
[0039] Los compuestos de la fórmula mostrada anteriormente se pueden preparar mediante los métodos que se describen a continuación. El Esquema 1 muestra un enfoque útil para preparar compuestos de la invención en donde R_2 es arilo (incluyendo análogos de heteroarilo y piridona). En este caso, el acoplamiento de Suzuki del compuesto **1** con un ácido o éster borónico apropiado $[R_3B(OR)_2]$ proporciona **2**. La bromación de **2** proporciona el intermedio **3**. El segundo acoplamiento de Suzuki da el compuesto **4**.

Esquema 1



[0040] El Esquema 2 muestra un enfoque útil para preparar compuestos de la invención en donde R_2 es hidrocarbilo y R' es R_{2C} , R_{2D} o un precursor de los mismos. En este caso, el acoplamiento de Suzuki, Heck u otro del compuesto **10** con un ácido borónico, éster $[R_3B(OR)_2]$ o alqueno apropiado proporciona **11**. La reducción del alqueno en **11** da el compuesto **12**. La bromación de **12** proporciona el intermedio **13**. El segundo acoplamiento de Suzuki da el compuesto **14**.

Esquema 2



5.4. MÉTODOS DE USO

[0041] La presente invención se refiere a métodos para inhibir la cinasa 1 asociada con adaptador (AAK1), tanto *in vitro* como *in vivo*, que comprenden poner en contacto AAK1 con un compuesto de la invención.

[0042] La invención también se refiere a métodos para tratar y gestionar enfermedades y trastornos mediados por la actividad de AAK1. Las enfermedades y los trastornos mediados por la actividad de AAK1 son enfermedades y trastornos que tienen al menos un síntoma, cuya gravedad o manifestación se ve afectada por la actividad de AAK1. Se cree que los ejemplos de dichas enfermedades y trastornos incluyen enfermedad de Alzheimer, trastorno bipolar, dolor, enfermedad de Parkinson y esquizofrenia (incluyendo los déficits cognitivos en la esquizofrenia). Los métodos particulares comprenden administrar a un paciente (un ser humano u otro mamífero) que lo necesite una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de AAK1 (por ejemplo, un compuesto divulgado en el presente documento).

[0043] La invención también se refiere a un método para tratar o gestionar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de AAK1, en donde la enfermedad o el trastorno es enfermedad de Alzheimer, trastorno bipolar, dolor, enfermedad de Parkinson o esquizofrenia (incluyendo los déficits cognitivos en la esquizofrenia). Los tipos particulares de dolor incluyen dolor crónico, dolor agudo y dolor neuropático. Los tipos particulares de dolor neuropático incluyen fibromialgia y neuropatía periférica (por ejemplo, neuropatía diabética).

[0044] Cuando se usan para tratar o controlar una enfermedad o trastorno, los compuestos de la invención se administran preferentemente como parte de una composición farmacéutica que comprende uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0045] Las composiciones o formulaciones farmacéuticas, pueden presentarse en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Los niveles de dosificación de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 250 miligramos por kilogramo ("mg/kg") de peso corporal al día, preferentemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día de los compuestos de la presente divulgación son típicos en una monoterapia para la prevención y tratamiento de una enfermedad. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta divulgación se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces al día o, como alternativa, en forma de infusión continua. Dicha administración puede usarse como una terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales transportadores para producir una forma farmacéutica unitaria variarán dependiendo de la afección que se esté tratando, la gravedad de la afección, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción del compuesto empleado, la duración del tratamiento y la edad, el género, el peso y el estado del paciente. Las formulaciones farmacéuticas unitaria preferidas son las que contienen una dosis o una subdosis diaria, como se ha citado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo. El tratamiento puede iniciarse con pequeñas dosis sustancialmente menores que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosis se aumenta en aumentos pequeños hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. En general, el compuesto se administra de forma más deseable a un nivel de concentración que proporcionará generalmente resultados eficaces sin producir ningún efecto secundario perjudicial o dañino.

[0046] Los compuestos de la invención pueden administrarse junto con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales. Por ejemplo, cuando se usan para el tratamiento del dolor, los posibles agentes adicionales incluyen agentes inmunosupresores y antiinflamatorios.

[0047] Los inmunosupresores adecuados para su uso en los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen aquellos conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen aminopterina, azatioprina, ciclosporina A, D-penicilamina, sales de oro, hidroxiquina, leflunomida, metotrexato, minociclina, rapamicina, sulfasalazina, tacrolimus (FK506) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Un inmunosupresor particular es metotrexato.

[0048] Los ejemplos adicionales incluyen anticuerpos anti TNF, tales como adalimumab, certolizumab pegol, etanercept e infliximab. Otros incluyen bloqueantes de interleucina-1, tales como anakinra. Otros incluyen anticuerpos anti linfocitos B (CD20), tales como rituximab. Otros incluyen bloqueantes de la activación de linfocitos T, tales como abatacept.

[0049] Los ejemplos adicionales incluyen inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa, tales como micofenolato de mofetilo (CellCept®) y ácido micofenólico (Myfortic®).

[0050] Los fármacos antiinflamatorios adecuados para su uso en los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen los conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen glucocorticoides y AINE.

[0051] Los ejemplos de glucocorticoides incluyen aldosterona, beclometasona, betametasona, cortisona, desoxicorticosterona, dexametasona, fludrocortisona, hidrocloridona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0052] Los ejemplos de AINE incluyen salicilatos (por ejemplo, aspirina, amoxiciprina, benorilato, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, fasilamina, salicilato de metilo, salicilato de magnesio, salicilato de salicilo y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), ácidos arilalcanoicos (por ejemplo, diclofenaco, aceclofenaco,

acemetacina, bromfenaco, etodolaco, indometacina, nabumetona, sulindaco, tolmetina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), ácidos arilpropiónicos (por ejemplo, ibuprofeno, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, ketorolaco, loxoprofeno, naproxeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, suprofen y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), ácidos arilntranílicos (por ejemplo, ácido meclofenámico, ácido mefenámico y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), derivados de pirazolidina (por ejemplo, azapropazona, metamizol, oxifenbutazona, fenilbutazona, sulfiprazona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), oxicams (por ejemplo, lornoxicam, meloxicam, piroxicam, tenoxicam y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib, valdecoxib y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) y sulfonanilidas (por ejemplo, nimesulida y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas).

[0053] Otros agentes usados en el tratamiento del dolor (incluyendo, pero sin limitación, dolor neuropático y dolor inflamatorio) incluyen agentes tales como pregabalina, lidocaína, duloxetina, gabapentina, carbamazepina, capsaicina y otros inhibidores de la recaptación de serotonina/norepinefrina/dopamina y opiáceos (tales como oxicontina, morfina y codeína).

[0054] En el tratamiento del dolor provocado por una enfermedad o afección conocida, tal como diabetes, infección (por ejemplo, herpes zóster o infección por VIH) o cáncer, los compuestos de la presente invención pueden administrarse junto con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos dirigidos a la enfermedad o afección subyacente. Por ejemplo, cuando se usan para tratar la neuropatía diabética, los compuestos de la invención pueden administrarse junto con uno o más agentes antidiabéticos, agentes antihiper glucemiantes, agentes hipolipidémicos/reductores de lípidos, agentes antiobesidad, agentes antihipertensivos y supresores del apetito. Los ejemplos de agentes antidiabéticos incluyen biguanidas (por ejemplo, metformina, fenformina), inhibidores de la glucosidasa (por ejemplo, acarbosa, miglitol), insulinas (incluyendo secretagogos de la insulina y sensibilizantes de la insulina), meglitinidas (por ejemplo, repaglinida), sulfonilureas (por ejemplo, glimepirida, gliburida, gliclazida, clorpropamida y glipizida), combinaciones de biguanida/gliburida (por ejemplo, Glucovance), tiazolidinedionas (por ejemplo, troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona), agonistas de PPAR-alfa, agonistas de PPAR-gamma, agonistas duales de PPAR alfa/gamma, inhibidores de glucógeno fosforilasa, inhibidores de proteína de unión a ácidos grasos (aP2), péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) u otros agonistas del receptor de GLP-1, inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP4) e inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2) (por ejemplo, dapagliflozina, canagliflozina y LX-4211).

5.5. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0055] Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para su administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, mediante la vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intracutánea, intramuscular, intra-articular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa, o inyecciones o infusiones intradérmicas). Dichas formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, poniendo en asociación el principio activo con el uno o más portadores o excipientes. Se prefieren la administración oral o la administración por inyección.

[0056] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite.

[0057] Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente activo del fármaco se puede combinar con un portador inerte farmacéuticamente aceptable, no tóxico y oral, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un portador farmacéutico triturado de forma similar, tal como un carbohidrato comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. También puede estar presente un agente saborizante, conservante, dispersante y colorante.

[0058] Las cápsulas se producen preparando una mezcla en polvo, como se ha descrito anteriormente y rellenando vainas de gelatina formadas. Pueden añadirse agentes deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido a la mezcla en polvo antes de la operación de relleno. Puede añadirse también un agente disgregante o solubilizante tales como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

[0059] Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y similares. Los lubricantes usados en estas formas farmacéuticas incluyen oleato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por

ejemplo, preparando una mezcla en polvo, mediante granulación o aglomeración, añadiendo un lubricante y disgregante y prensando para formar comprimidos. Se prepara una mezcla en polvo mezclando el compuesto, triturado de forma adecuada, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante, tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, una solución retardante, tal como parafina, un acelerador de la resorción, tal como una sal cuaternaria, y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo se puede granular humedeciéndola con un aglutinante, tal como un jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a pasar a través de un tamiz. Como una alternativa a la granulación, la mezcla en polvo se puede procesar a través de la máquina compresora y el resultado son lingotes formados imperfectamente separados en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para impedir que se adhieran a las matrices para la formación de comprimidos mediante la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. A continuación, la mezcla lubricada se comprime formando comprimidos. Los compuestos de la presente divulgación también se pueden combinar con un vehículo inerte de flujo libre y comprimirse en forma de comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o aglomeración. Se puede proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en una capa de sellado de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento de pulido de cera. Se pueden añadir colorantes a estos recubrimientos para distinguir las diferentes dosificaciones unitarias.

[0060] Los fluidos orales, tales como soluciones, jarabes y elixires, se pueden preparar en una forma farmacéutica unitaria de modo que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Se pueden preparar jarabes disolviendo el compuesto en una solución acuosa aromatizada adecuada, mientras que los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos de sabor, tales como aceite de menta piperita o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

[0061] Cuando sea apropiado, las formulaciones farmacéuticas unitarias para la administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación como, por ejemplo, recubriendo o embebiendo el material en partículas en polímeros, cera o similares.

[0062] Los compuestos de fórmula (I), y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden administrar en forma de sistemas de suministro liposómicos, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

[0063] Los compuestos de fórmula (I), y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también pueden suministrarse mediante el uso de anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos también pueden acoplarse con polímeros solubles como portadores farmacológicos direccionables. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidafenol, polihidroxietilaspirtamidafenol o polietileno oxidopoliisina sustituidos con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr una liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

[0064] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos previstos para permanecer en estrecho contacto con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, el principio activo puede suministrarse a través del parche mediante iontoforesis como se describe generalmente en Pharmaceutical Research 1986, 3(6), 318.

[0065] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.

[0066] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden presentarse como supositorios o como enemas.

[0067] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal, en donde el portador es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administran por aspiración por la nariz, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente con el polvo sujeto cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas, en donde el portador es un líquido, para su administración como aerosol nasal o gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleaginosas del principio activo.

[0068] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para su administración por inhalación incluyen partículas finas de polvo o nebulizaciones, que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores de dosis medida y presurizados.

[0069] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador.

[0070] Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados herméticamente, y se pueden almacenar en un estado criodesecado (liofilizado) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para preparaciones inyectables, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

[0071] Debería entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, las adecuadas para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

5.6. EJEMPLOS

[0072] Determinados aspectos de la invención pueden entenderse a partir de los siguientes ejemplos.

5.6.1. Ratones con inactivación génica AAK1

[0073] Se prepararon ratones homocigotos (-/-) para la alteración del gen AAK1 mediante dos métodos; atrapamiento génico y recombinación homóloga.

[0074] El atrapamiento génico es un método de mutagénesis insercional aleatoria que usa un fragmento de ADN que codifica un gen indicador o marcador de selección como un mutágeno. Los vectores de atrapamiento génico se han diseñado para integrarse en intrones o genes de una manera que permita que la maquinaria de corte y empalme celular corte y empalme los exones codificados en los vectores con ARNm celulares. Comúnmente, los vectores de atrapamiento génico contienen secuencias de marcadores de selección que están precedidas por secuencias aceptoras de corte empalme fuertes y no están precedidas por un promotor. Por lo tanto, cuando tales vectores se integran en un gen, la maquinaria de corte y empalme celular corta y empalma los exones del gen atrapado en el extremo 5' de la secuencia del marcador seleccionable. Típicamente, tales genes marcadores de selección solo pueden expresarse si el vector que codifica el gen se ha integrado en un intrón. Los sucesos de atrapamiento génico resultantes se identifican posteriormente mediante la selección de células que pueden sobrevivir en el cultivo de selección.

[0075] Las células madre embrionarias (células Lex-1 de la cepa murina A129 derivada) se mutaron mediante un proceso que implica la inserción de al menos una porción de una secuencia de vector genomanipulada en el gen de interés, las células madre embrionarias mutadas se microinyectaron en blastocistos que se introdujeron posteriormente en hospedadoras pseudopreñadas y se llevaron a término usando métodos establecidos. Véase, por ejemplo, "Mouse Mutagenesis", 1998, Zambrowicz *et al.*, eds., Lexicon Press, The Woodlands, TX. Los animales quiméricos resultantes se criaron posteriormente para producir descendientes capaces de la transmisión por la estirpe germinal de un alelo que contiene la mutación modificada por ingeniería genética en el gen de interés.

[0076] También se prepararon ratones con alteración del gen AAK1 por recombinación homóloga. En este caso, el segundo exón codificante del gen AAK1 murino (véase número de referencia de GenBank NM_177762) se retiró por métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 5.487.992, 5.627.059 y 5.789.215.

[0077] Se estudiaron ratones homocigotos (-/-) para determinar la alteración del gen AAK1 junto con los ratones heterocigotos (+/-) para determinar la alteración del gen AAK1 y sus compañeros de camada de tipo natural (+/+). Durante este análisis, los ratones se sometieron a pruebas complementarias médicas usando un conjunto integrado de procedimientos de diagnóstico médico diseñados para evaluar la función de los principales aparatos y sistemas en un sujeto mamífero. Se estudiaron los ratones "con inactivación génica" homocigotos (-/-) junto con sus compañeros de camada heterocigotos (+/-) y de tipo natural (+/+). La alteración del gen AAK1 fue confirmada por análisis Southern. La expresión del homólogo murino de AAK1 se detectó mediante RT-PCR en cerebro murino; médula espinal; ojo; timo; bazo; pulmón; riñón; hígado; músculo esquelético; hueso; estómago, intestino delgado y colon; corazón; tejido adiposo; pulmón asmático; hígado LPS; sangre; corazón con banda; árbol aórtico; próstata; y glándula mamaria (virgen de 5 semanas, virgen madura, 12 DPC, 3 días postparto (lactante), 3 días después del destete (involución temprana) y 7 días después del destete (involución tardía).

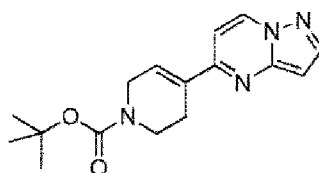
[0078] Los homocigotos (-/-) AAK1 y sus compañeros de camada de tipo natural (+/+) se analizaron usando la prueba de la pata con formalina para evaluar sus respuestas nociceptivas agudas y tónicas. Para estas pruebas, se usaron los analizadores automáticos de nocicepción (adquiridos en el laboratorio Ozaki de la Universidad de California, San Diego). Se colocó una banda de metal alrededor de la pata trasera izquierda de cada ratón 30 minutos antes de la prueba. Después de un período de aclimatación de 30 minutos, se inyectaron 20 µl de formalina al 5 % por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata trasera izquierda. Los ratones se alojaron individualmente en cámaras cilíndricas durante 45 minutos. Un ordenador grabó los retraimientos por minuto, retraimientos totales para la fase I

(fase aguda = primeros 8 minutos), y retraimientos totales para la fase II (fase tónica = tiempo entre los minutos 20-40) a través de un campo electromagnético. Véanse Yaksh TL, Ozaki G, McCumber D, Rathbun M, Svensson C, Malkmus S, Yaksh MC. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. J Appl Physiol., 2001; 90:2386-402.

[0079] Como se muestra en la figura 1, los datos de fase 1 y fase 2 se obtuvieron usando ratones homocigotos (-/-) hembra (n = 16), hembras de tipo natural (n = 15), ratones homocigotos (-/-) macho (n = 9) y machos de tipo natural (n = 18). En todos los grupos y en ambas fases, los ratones homocigotos (-/-) AAK1 mostraron un retraimiento de la pata registrado significativamente menor que sus compañeros de camada de tipo natural (+/+).

5.6.2. Síntesis de 4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *terc*-butilo

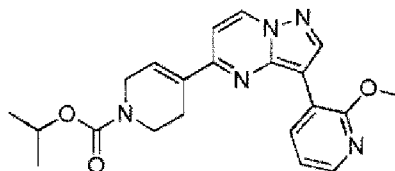
[0080]



[0081] Se recogió 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina (307 mg, 2 mmol) en 4 ml de DME y 2 ml de agua. Se añadieron 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *terc*-butilo (650 mg, 2,2 mmol), carbonato de sodio (421 mg, 4 mmol) y Pd(dppf)Cl₂:DCM (164 mg, 0,2 mmol) y la reacción se agitó en un microondas en un tubo cerrado herméticamente a 150 °C durante 15 minutos. La mezcla de reacción se enfrió, se filtró a través de celite, se lavó con acetato de etilo y se concentró. El producto puro se obtuvo a partir de HPLC prep. ¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 1,52 (s, 9 H) 2,71-2,76 (m, 2 H) 3,66 (t, *J* = 5,68 Hz, 2 H) 4,20 (s a, 2 H) 6,63 (d, *J* = 2,27 Hz, 1 H) 6,82 (s a, 1 H) 7,28 (d, *J* = 7,58 Hz, 1 H) 8,10 (d, *J* = 2,27 Hz, 1 H) 8,75 (d, *J* = 7,58 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 301,0 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₆H₂₀N₄O₂: 300,4.

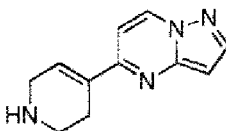
5.6.3. Síntesis de 4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de isopropilo

[0082]



Parte A. 5-(1,2,3,6-Tetrahidropiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina

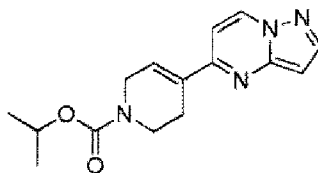
[0083]



[0084] A una solución de 4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *terc*-butilo (2,4 g, 8 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió cloruro de acetilo (5,7 ml). La mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró para dar el compuesto del título (1,9 g). La muestra analítica se obtuvo a partir de HPLC prep. en forma de una sal fórmica. ¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 3,00 (ddt, *J* = 6,06, 4,04, 2,02, 2,02 Hz, 2 H) 3,48 (t, *J* = 6,19 Hz, 2 H) 3,95-3,98 (m, 2 H) 6,68 (d, *J* = 2,27 Hz, 1 H) 6,88 (dt, *J* = 3,54, 1,77 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J* = 7,58 Hz, 1 H) 8,15 (d, *J* = 2,27 Hz, 1 H) 8,53 (s a, 0,5 H) 8,84 (d, *J* = 7,58 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 201,0 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₁H₁₂N₄: 200,25.

Parte B. 4-(Pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de isopropilo

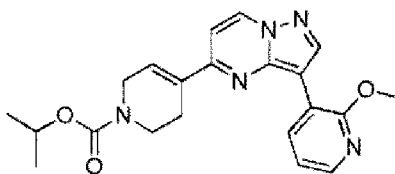
[0085]



[0086] Una mezcla de 5-(1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina (1,9 g, 8 mmol), cloroformiato de isopropilo (1 M en tolueno, 9,6 ml, 9,6 mmol) y TEA (3,2 ml, 24 mmol) en DCM (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se lavó con agua, se secó y se concentró. El residuo se sometió a ISCO para dar el carbamato de isopropilo (1,3 g).

Parte C. 4-(3-(2-Metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de isopropilo

[0087]

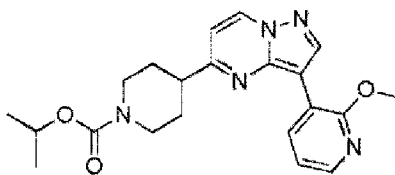


[0088] Una mezcla de 4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de isopropilo (1,2 g, 4,2 mmol) y Br₂ (0,32 ml, 6,3 mmol) en AcOH (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró para dar 2,5 g de aceite de color pardo.

[0089] Una mezcla del aceite de color pardo anterior, ácido (2-metoxipiridin-3-il)borónico (851 mg, 5 mmol), carbonato de sodio (1,33 g, 12,6 mmol) y Pd(dppf)Cl₂:DCM (343 mg, 0,42 mmol) en DME (20 ml) y agua (10 ml) se agitó a 90 °C durante una noche. La reacción se enfrió, se filtró y se concentró. El residuo se sometió a ISCO y a continuación a HPLC prep. para proporcionar el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,32 (d, J = 6,32 Hz, 6 H) 2,81 (s a, 2 H) 3,73 (t, J = 5,56 Hz, 2 H) 4,10 (s, 3 H) 4,26 (s a, 2 H) 4,96 (m, 1 H) 6,90 (s a, 1 H) 7,08 (dd, J = 7,58, 5,05 Hz, 1 H) 7,34 (d, J = 7,58 Hz, 1 H) 8,04 (dd, J = 5,05, 1,77 Hz, 1 H) 8,71 (s, 1 H) 8,76 (d, J = 7,58 Hz, 1 H) 8,95 (dd, J = 7,58, 1,77 Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 394,1 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₁H₂₃N₅O₃: 393,45.

5.6.4. Síntesis de 4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piperidin-1-carboxilato de isopropilo

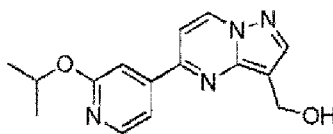
[0090]



[0091] Se sometió 4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de isopropilo a hidrogenación con Pd al 5 %/C en MeOH para proporcionar el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 1,30 (d, J = 6,32 Hz, 6 H) 1,76-1,87 (m, 2 H) 2,05-2,08 (m, 2 H) 2,97-3,14 (m, 3 H) 4,09 (s, 3 H) 4,27-4,31 (m, 2 H) 4,92 (m, 1 H) 7,04 (d, J = 7,07 Hz, 1 H) 7,08 (dd, J = 7,58, 1,77 Hz, 1 H) 8,04 (dd, J = 4,93, 1,89 Hz, 1 H) 8,74 (s, 1 H) 8,82 (d, J = 7,07 Hz, 1 H) 8,96 (dd, J = 7,58, 1,77 Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 396,1 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₁H₂₅N₅O₃: 395,46.

5.6.5. Síntesis de (5-(2-isopropoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)metanol

[0092]

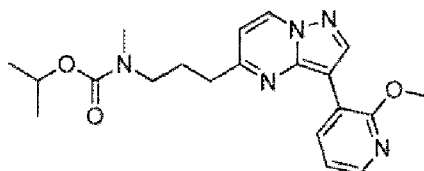


[0093] Se recogió (5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)metanol (600 mg, 3,9 mmol) en 3 ml de acetonitrilo y 1,5 ml de agua. Se añadieron 2-isopropoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (1 g, 3,9 mmol), carbonato de potasio (1,07 g, 7,8 mmol) y Pd(dppf)Cl₂:DCM (319 mg, 0,39 mmol) y la reacción se agitó en un microondas en un

tubo cerrado herméticamente a 120 °C durante 12 minutos. La reacción se enfrió, se filtró a través de celite y se redujo al vacío. La reacción se purificó por liofilización prep. de fase neutra Shimadzu para obtener 96 mg de producto. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 9,21 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,33 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,74 (dd, J = 5,4, 1,4 Hz, 1H), 7,71 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 5,28-5,40 (m, 1H), 5,03 (s, 1H), 4,75 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 1,34 (d, J = 6,1 Hz, 6H) LRMS (ESI) m/z 285 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₅H₁₆N₄O₂: 284,32.

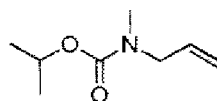
5.6.6. Síntesis de (3-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)(metil)carbamato de isopropilo

[0094]



Parte A. Alil(metil)carbamato de isopropilo

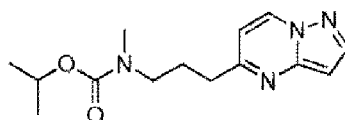
[0095]



[0096] A 213 mg (3,00 mmol) de N-metilprop-2-en-1-amina en 20 ml de EtOAc se le añadieron 3,6 ml (3,6 mmol) de cloroformiato de isopropilo (solución 1 M en tolueno), seguido de 0,83 ml (6,00 mmol) de trietilamina. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se diluyó con EtOAc, se inactivó con 5 ml de agua, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se concentró en el evaporador rotatorio y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional. Se supuso que el rendimiento era teórico.

Parte B. Metil(3-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)carbamato de isopropilo

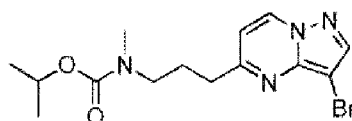
[0097]



[0098] A 3 mmol de alil(metil)carbamato de isopropilo disuelto en 10 ml de THF a 0 °C se le añadieron 7,8 ml (3,9 mmol) de 9-BBN (solución 0,5 M en THF), y la mezcla resultante. La temperatura se mantuvo a 0 °C durante 0,25 h y a continuación se calentó a 60 °C durante 2,5 h. A esto se le añadieron 554 mg (3,6 mmol) de 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina, 828 mg (6,00 mmol) de K₂CO₃, 346 mg (0,3 mmol) de Pd(PPh₃)₄, 20 ml de THF, 4 ml de agua y 1 ml de DMF. La mezcla resultante se calentó a reflujo (65 °C) durante una noche. Se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se concentró en el evaporador rotatorio y se purificó en la ISCO para obtener 483 mg del producto deseado (58 % de rendimiento en dos etapas). ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,23 (d, J = 6,06 Hz, 6 H) 2,05 (quint., J = 7,26 Hz, 2 H) 2,81-2,99 (m, 5 H) 3,39 (s a, 2 H) 4,91 (dt, J = 12,06, 5,97 Hz, 1 H) 6,59 (d, J = 1,77 Hz, 1 H) 6,72 (s a, 1 H) 8,09 (d, J = 2,27 Hz, 1 H) 8,57 (d, J = 7,33 Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 277 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₄H₂₀N₄O₂: 276.

Parte C. (3-(3-Bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)(metil)carbamato de isopropilo

[0099]

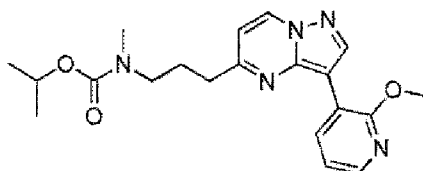


[0100] A 276 mg (1,00 mmol) de metil(3-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)carbamato de isopropilo disuelto en 10 ml de AcOH a temperatura ambiente se le añadieron 77 µl (1,50 mmol) de bromo, y el disolvente resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 0,25 h, el análisis por LCMS indica que la reacción se había completado. Se concentró a sequedad en el evaporador rotatorio y a continuación se diluyó con EtOAc. A continuación, esto se lavó con Na₂CO₃ acuoso, se secó sobre MgSO₄ y se concentró de nuevo en el evaporador rotatorio. La mezcla en bruto

se purificó en la ISCO, eluyendo con EtOAc al 20-100 %/hex para obtener 241 mg (68 %) del producto deseado. LRMS (ESI) m/z 355 [(M+H)]⁺, (doblete en 357), calc. para C₁₄H₁₉BrN₄O₂: 354.

Parte D. (3-(3-(2-Metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)(metil)carbamato de isopropilo

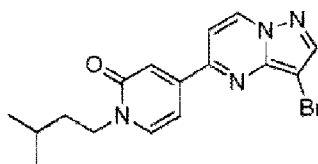
[0101]



A 100 mg (0,28 mmol) de (3-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)(metil) carbamato de isopropilo en un vial para microondas se le añadieron 86 mg (0,563 mmol) de ácido (2-metoxipiridin-3-il)borónico, seguido de 178 mg (0,84 mmol) de K₃PO₄, 32 mg (0,03 mmol) de Pd(PPh₃)₄, 3 ml de MeCN y 1,5 ml de agua. A continuación, esto se sometió a microondas durante 0,5 h a 140 °C. Se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se concentró y se purificó por HPLC PREP. para obtener el producto deseado. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,24 (s a, 6 H) 2,12 (quint., J = 7,14 Hz, 2 H) 2,92 (t, J = 7,45 Hz, 5 H) 3,43 (t, J = 6,82 Hz, 2 H) 4,12 (s, 3 H) 4,86-5,00 (m, 1 H) 6,76 (s a, 1 H) 7,04 (dd, J = 7,45, 4,93 Hz, 1 H) 8,10 (dd, J = 4,93, 1,89 Hz, 1 H) 8,60 (d, J = 7,07 Hz, 1 H) 8,79 (s, 1 H) 8,88 (d, J = 7,07 Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 384 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₀H₂₅N₅O₃: 383.

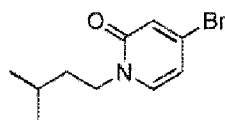
5.6.7. Síntesis de 4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

[0103]



Parte A. 4-Bromo-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

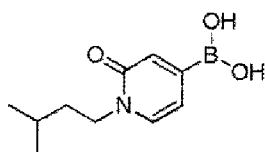
[0104]



Se recogió 4-bromo-2-hidroxi piridina (600 mg, 3,4 mmol) en DMF seca en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió hidruro de sodio al 60 % en aceite (165 mg, 4,1 mmol) y se agitó 30 minutos. Se añadió bromuro de litio (598 mg, 6,8 mmol) y se agitó durante 1 hora. Se añadió 1-bromo-3-metil butano (870 μ l, 6,8 mmol) y se agitó durante una noche. La reacción se redujo al vacío y se recogió en DCM. Esta se lavó con agua, NaOH 1 N, a continuación se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se redujo al vacío para obtener 840 mg de producto en bruto que se usó tal cual en la siguiente etapa. LRMS (ESI) m/z 245 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₀H₁₄BrNO: 244,13.

Parte B. Ácido (1-isopentil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)borónico

[0106]

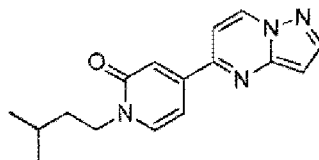


Se recogió 4-bromo-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona (840 mg, 3,4 mmol) en 10 ml de DMF seca en una atmósfera de nitrógeno. Se añadieron bis(pinacolato)diborano (1,3 g, 5,1 mmol), acetato de potasio (1,01 g, 10,2 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ diclorometano (281 mg, 0,34 mmol), la reacción se calentó a 85 °C y se agitó durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de celite con DCM. Esta se redujo al vacío, se recogió en NaOH 1 N y se lavó con DCM. A continuación, la capa ac. se hizo ácida con HCl 1 N y se extrajo con DCM. La

capa de DCM se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se redujo al vacío para producir 600 mg del producto en bruto para su uso en la siguiente etapa. LRMS (ESI) m/z 210 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₀H₁₆BN₃O₃: 209,05.

Parte C. 1-Isopentil-4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

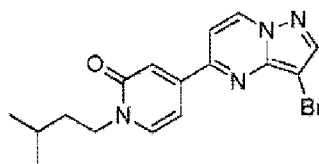
[0108]



[0109] Se recogió 6-cloro-imidazo[1,2-b]piridazina (400 mg, 2,6 mmol) en 20 ml de acetonitrilo y 10 ml de agua. Se añadieron ácido (1-isopentil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)borónico (654 mg, 3,1 mmol), carbonato de potasio (721 mg, 5,2 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ diclorometano (197 mg, 0,26 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 85 °C durante 2 horas. Se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite con DCM y se redujo al vacío. A continuación, se pasó a través de un lecho de sílice usando DCM y se secó al vacío para obtener 646 mg de producto en bruto que llevó tal cual a la siguiente etapa. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,19-9,26 (m, 1H), 8,30 (d, *J* = 2,27 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 7,07 Hz, 1H), 7,67 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 2,02 Hz, 1H), 7,01 (dd, *J* = 2,02, 7,07 Hz, 1H), 6,85 (dd, *J* = 0,63, 2,40 Hz, 1H), 3,91-3,99 (m, 2H), 1,48-1,65 (m, 3H), 0,94 (d, *J* = 6,32 Hz, 6H) LRMS (ESI) m/z 283 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₆H₁₈N₄O: 282,35.

Parte D. 4-(3-Bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

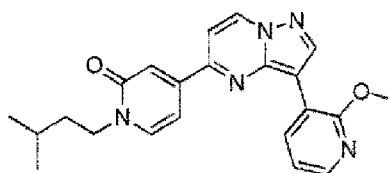
[0110]



[0111] Se recogió 1-isopentil-4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona (646 mg, 2,3 mmol) en acetonitrilo. Se añadió N-bromo succinimida (400 mg, 2,3 mmol) y la reacción se agitó durante 4 horas. A continuación, la reacción se destiló al vacío, se recogió en acetato de etilo y se lavó con agua, NaOH 1 N, salmuera y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se redujo al vacío para obtener 653 mg de producto en bruto que se usará en reacciones adicionales. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,28 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,88 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 2,02 Hz, 1H), 7,03 (dd, *J* = 1,89, 7,20 Hz, 1H), 3,93-3,99 (m, 2H), 1,53-1,63 (m, 3H), 0,94 (d, *J* = 6,32 Hz, 6H). LRMS (ESI) m/z 361/363 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₆H₁₇BrN₄O: 361,24.

5.6.8. Síntesis de 1-isopentil-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

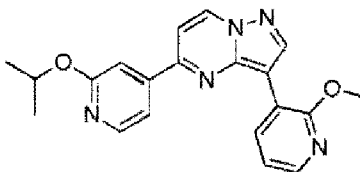
[0112]



[0113] Se recogieron 4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona (150 mg, 0,41 mmol), ácido 2-metoxipiridin-3-borónico (127 mg, 0,82 mmol), carbonato de potasio (172 mg, 1,23 mmol), Pd(OAc)₂ (2 mg, 0,0082 mmol) y x-Phos (8 mg, 0,0164 mmol) en 2 ml de dioxano y 1 ml de agua en un tubo cerrado herméticamente y se calentaron a 85 °C durante 2 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite con acetonitrilo y DCM, se redujo al vacío. Se purificó por liofilización prep. de fase neutra Shimadzu para obtener 56 mg de producto. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,31 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 8,88 (dd, *J* = 1,77, 7,58 Hz, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,13 (dd, *J* = 1,77, 4,80 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 7,07 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 1,77 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 4,80, 7,58 Hz, 1H), 7,07 (dd, *J* = 2,02, 7,07 Hz, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,97 (t, *J* = 7,20 Hz, 2H), 1,58 (t, *J* = 6,44 Hz, 3H), 0,95 (d, *J* = 6,32 Hz, 6H). LRMS (ESI) m/z 390 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₂H₂₃N₅O₂: 389,46.

5.6.9. Síntesis de 5-(2-isopropoxipiridin-4-il)-3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina

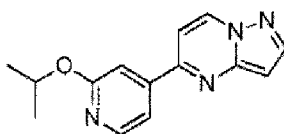
[0114]



5

Parte A. 5-(2-Isopropoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina

[0115]



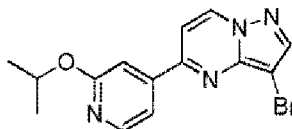
10

[0116] Se recogió 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina (500 mg, 3,25 mmol) en 3 ml de acetonitrilo y 1,5 ml de agua. Se añadieron 2-isopropoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (1 g, 3,9 mmol), carbonato de potasio (902 mg, 6,5 mmol) y Pd(dppf)Cl₂:DCM (267 mg, 0,325 mmol) y la reacción se agitó en un microondas en un tubo cerrado herméticamente a 120 °C durante 12 minutos. La reacción en enfrió, se filtró a través de celite, se lavó con acetato de etilo y se redujo al vacío. La reacción se recogió en 1:1 de acetato de etilo: hexano y se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se recogió y se secó al vacío para obtener 740 mg de producto en bruto que se usará tal cual en la siguiente etapa. LRMS (ESI) *m/z* 255 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₄H₁₄N₄O: 254,2.

15

20 Parte B. 3-Bromo-5-(2-isopropoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina

[0117]



25

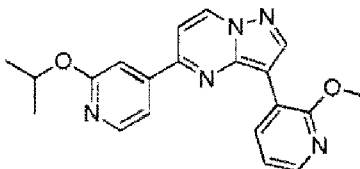
[0118] Se recogió 5-(2-isopropoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina (740 mg, 2,9 mmol) en acetonitrilo y se añadió N-bromo succinimida (570 mg, 3,19 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se destiló al vacío, a continuación se recogió en acetato de etilo, se lavó con salmuera, NaOH 1 N y agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se redujo al vacío para obtener 970 mg de producto en bruto que se usará tal cual en la siguiente etapa. LRMS (ESI) *m/z* 334 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₄H₁₃BrN₄O: 333,2.

30

Parte C. 5-(2-Isopropoxipiridin-4-il)-3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina

[0119]

35



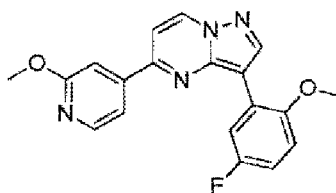
[0120] El compuesto del título se preparó usando el procedimiento de acoplamiento de Suzuki como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5.6.8. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 9,34 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 8,91 (dd, *J* = 1,89, 7,45 Hz, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,34-8,41 (m, 1H), 8,13 (dd, *J* = 1,89, 4,93 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,80 (dd, *J* = 1,52, 5,31 Hz, 1H), 7,56 (d, *J* = 0,76 Hz, 1H), 7,23 (dd, *J* = 4,93, 7,45 Hz, 1H), 5,35 (t, *J* = 6,19 Hz, 1H), 4,04 (s, 3H), 1,36 (d, *J* = 6,06 Hz, 6H). LRMS (ESI) *m/z* 362 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₀H₁₉N₅O₂: 361,4.

40

5.6.10. Síntesis de 3-(5-fluoro-2-metoxifenil)-5-(2-metoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina

45

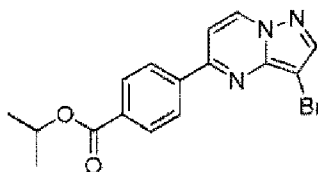
[0121]



[0122] El compuesto del título se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 5.6.9. ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 3,93 (s, 3 H) 3,95 (s, 3 H) 7,09-7,18 (m, 2 H) 7,63 (s, 1 H) 7,79-7,86 (m, 2 H) 8,37-8,42 (m, 2 H) 8,84 (s, 1 H) 9,34 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 351,1 [(M+H)] $^+$, calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_2$: 350,35.

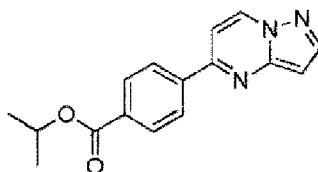
5.6.11. Síntesis de 4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo

[0123]



Parte A. 4-(Pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo

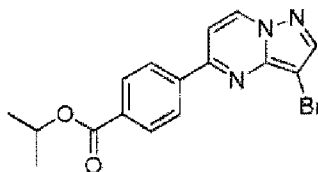
[0124]



[0125] El procedimiento de acoplamiento de Suzuki descrito como en el Ejemplo 5.6.8 se realizó usando trietilamina como base para obtener el producto deseado con un rendimiento del 99 %. ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,42 (d, $J = 6,32$ Hz, 6 H) 5,31 (dt, $J = 12,44, 6,28$ Hz, 1 H) 6,79 (d, $J = 2,02$ Hz, 1 H) 7,33 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H) 8,14-8,23 (m, 5 H) 8,77 (dd, $J = 7,33, 0,51$ Hz, 1 H).

Parte B. 4-(3-Bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo

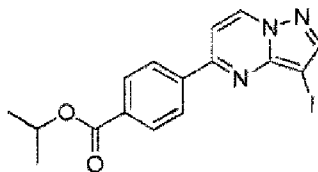
[0126]



[0127] El procedimiento de bromación descrito anteriormente en el Ejemplo 5.6.6, parte C, se usó para obtener el compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,43 (d, $J = 6,32$ Hz, 7 H) 5,32 (quint, $J = 6,25$ Hz, 1 H) 7,38 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H) 8,16-8,27 (m, 5 H) 8,72 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 360 (M+H) $^+$, (doblete en 362), calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 359.

5.6.12. Síntesis de 4-(3-yodopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo

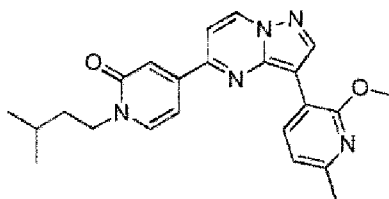
[0128]



[0129] A 100 mg (0,356 mmol) de 4-(imidazo[1,2-b]piridazin-6-il)benzoato de isopropilo disuelto en 3 ml de DMF se le añadieron 88 mg (0,391 mmol) de NIS. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se diluyó con EtOAc, se lavó dos veces con agua y a continuación con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se concentró y se purificó en una columna de 12 gramos en la ISCO eluyendo con EtOAc al 10-80 %/hexano para obtener 131 mg del producto deseado (90 % de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,43 (d, *J* = 6,32 Hz, 6 H) 5,31 (quint., *J* = 6,25 Hz, 1 H) 7,38 (d, *J* = 7,58 Hz, 1 H) 8,15-8,33 (m, 5 H) 8,73 (d, *J* = 7,33 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 408 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₆H₁₄N₃O₂: 407.

5.6.13. Síntesis de 1-isopentil-4-(3-(2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

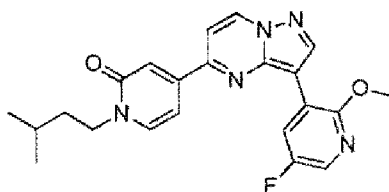
[0130]



[0131] El compuesto del título se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 5.6.8. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,28 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,73 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 7,88 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 2,02 Hz, 1H), 6,99-7,08 (m, 2 H), 4,02 (s, 3H), 3,97 (t, *J* = 7,20 Hz, 2H), 2,46 (s, 3H), 1,58 (t, *J* = 6,57 Hz, 3H), 0,94 (d, *J* = 6,06 Hz, 6H) LRMS (ESI) *m/z* 404 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₃H₂₅N₅O₂: 403,5.

5.6.14. Síntesis de 4-(3-(5-fluoro-2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

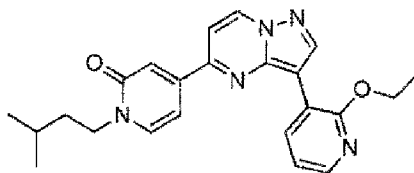
[0132]



[0133] El compuesto del título se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 5.6.8. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,36 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 8,90 (s, 1H), 8,85 (dd, *J* = 3,03, 10,11 Hz, 1H), 8,11 (d, *J* = 2,78 Hz, 1H), 7,95 (d, *J* = 7,07 Hz, 1H), 7,83 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,28 (d, *J* = 1,77 Hz, 1H), 7,04 (dd, *J* = 2,15, 7,20 Hz, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,89-4,02 (m, 2H), 1,58 (t, *J* = 6,06 Hz, 3H), 0,95 (d, *J* = 6,06 Hz, 6H) LRMS (ESI) *m/z* 408 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₂H₂₂FN₅O₂: 407,4.

5.6.15. Síntesis de 4-(3-(2-etoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

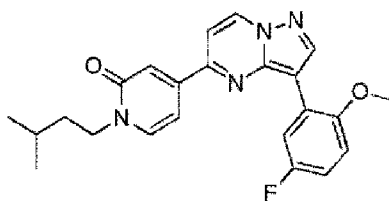
[0134]



[0135] El compuesto del título se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 5.6.8. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,31 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 8,83-8,88 (m, 2 H), 8,11 (dd, *J* = 1,89, 4,93 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 7,07 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 2,02 Hz, 1H), 7,16-7,20 (m, 1H), 7,07 (dd, *J* = 2,02, 7,07 Hz, 1H), 4,49 (c, *J* = 7,07 Hz, 2H), 3,97 (t, *J* = 7,20 Hz, 2H), 3,29 (s a, 1H), 1,58 (t, *J* = 6,32 Hz, 3H), 1,45 (t, *J* = 7,07 Hz, 3H), 0,94 (d, *J* = 6,06 Hz, 6H) LRMS (ESI) *m/z* 403 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₃H₂₅N₅O₂: 403,49.

5.6.16. Síntesis de 4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

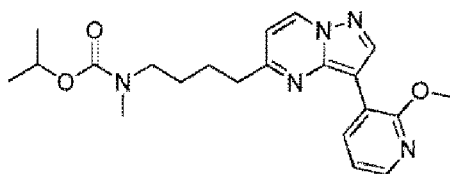
[0136]



[0137] El compuesto del título se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 5.6.8. ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,25-9,35 (m, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,31-8,42 (m, 1H), 7,89-7,98 (m, 1H), 7,72-7,81 (m, 1H), 7,23-7,31 (m, 1H), 7,08-7,21 (m, 2H), 6,94-7,06 (m, 1H), 3,94-4,01 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 1,48-1,63 (m, 3H), 0,94 (d, $J = 6,32$ Hz, 6H) (ESI) m/z 407 $[(M+H)]^+$, calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{FN}_4\text{O}_2$: 406,4.

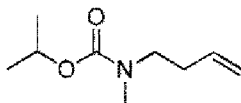
5.6.17. Síntesis de (4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)butil)(metil)carbamato de isopropilo

[0138]



Parte A. But-3-en-1-il(metil)carbamato de isopropilo

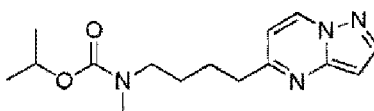
[0139]



[0140] Partiendo de N-metilbut-3-en-1-amina, se siguió el procedimiento para la síntesis de isopropil alil(metil)carbamato de isopropilo (en el Ejemplo 5.6.6, parte A) para obtener el compuesto del título.

Parte B. Metil(4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)butil)carbamato de isopropilo

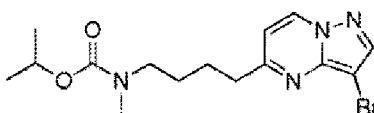
[0141]



[0142] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.6, parte B, se siguió para obtener el compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,24 (d, $J = 5,81$ Hz, 6 H) 1,57-1,67 (m, 2 H) 1,78-1,86 (m, 2 H) 2,88 (t, $J = 7,58$ Hz, 5 H) 3,32 (s a, 2 H) 4,92 (dt, $J = 12,38, 6,19$ Hz, 1 H) 6,59 (d, $J = 1,52$ Hz, 1 H) 6,70 (d, $J = 7,07$ Hz, 1 H) 8,09 (d, $J = 2,27$ Hz, 1 H) 8,58 (d, $J = 7,07$ Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 291 $[(M+H)]^+$, calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: 290.

Parte C. (4-(3-Bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)butil)(metil)carbamato de isopropilo

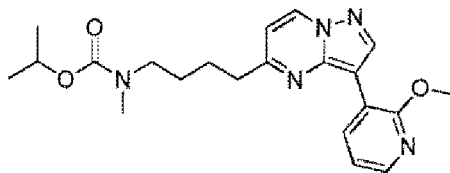
[0143]



[0144] El procedimiento de bromación descrito en el Ejemplo 5.6.6, parte C, se siguió para obtener el compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,25 (d, $J = 6,06$ Hz, 6 H) 1,63-1,68 (m, 2 H) 1,77-1,85 (m, 2 H) 2,92 (dd, $J = 15,66, 7,83$ Hz, 5 H) 3,33 (s a, 2 H) 4,92 (dt, $J = 12,19, 5,91$ Hz, 1 H) 6,70-6,82 (m, 1 H) 8,07 (s, 1 H) 8,52 (d, $J = 7,07$ Hz, 1 H). LRMS (ESI) m/z 369 $[(M+H)]^+$, (doblete en 371), calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrN}_4\text{O}_2$: 368.

Parte D. (4-(3-(2-Metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)butil)(metil)carbamato de isopropilo

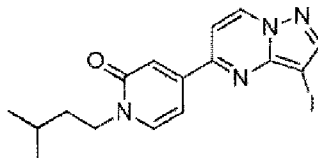
[0145]



[0146] El procedimiento de Suzuki descrito en el Ejemplo 5.6.6, parte D, se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,20-1,30 (m, 6 H) 1,63-1,74 (m, 2 H) 1,81-1,91 (m, 2 H) 2,84-2,99 (m, 5 H) 3,35 (s, 2 H) 4,12 (s, 3 H) 4,92 (dt, *J* = 12,44, 6,28 Hz, 1 H) 6,75 (d, *J* = 7,07 Hz, 1 H) 7,05 (dd, *J* = 7,58, 4,80 Hz, 1 H) 8,10 (dd, *J* = 4,93, 1,89 Hz, 1 H) 8,60 (d, *J* = 7,07 Hz, 1 H) 8,79 (s, 1 H) 8,89 (d, *J* = 7,33 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 398 [(*M*+*H*)⁺], calc. para C₂₁H₂₇N₅O₃: 397.

5.6.18. Síntesis de 4-(3-yodopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

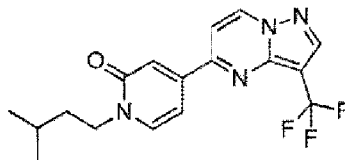
[0147]



[0148] El procedimiento de yodación descrito en el Ejemplo 5.6.12 se siguió para preparar el compuesto del título con un rendimiento del 87 %. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,02 (d, *J* = 6,32 Hz, 6 H) 1,66-1,74 (m, 3 H) 4,00-4,07 (m, 2 H) 7,14-7,21 (m, 2 H) 7,26 (s, 1 H) 7,43 (d, *J* = 7,07 Hz, 1 H) 8,21 (s, 1 H) 8,73 (d, *J* = 7,33 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 409 [(*M*+*H*)⁺], calc. para C₁₆H₁₇IN₄O: 408.

5.6.19. Síntesis de 1-isopentil-4-(3-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

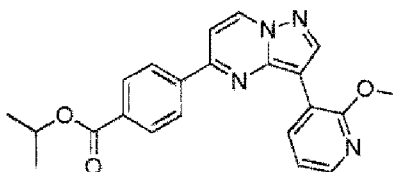
[0149]



[0150] A 123 mg (0,301 mmol) de 4-(3-yodopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona disuelta en 5 ml de DMF se le añadieron 94 mg (0,301 mmol) de trifluorometil(1,10-fenantrolina)cobre, CAS n.º 1300746-79-5. Esta mezcla se calentó a 40 °C y se agitó durante dos días. A continuación se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se concentró y se purificó por HPLC PREP. para obtener el compuesto del título con un rendimiento del 18 %. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,02 (d, *J* = 6,32 Hz, 6 H) 1,65-1,75 (m, 3 H) 4,00-4,07 (m, 2 H) 7,14 (dd, *J* = 7,07, 2,02 Hz, 1 H) 7,20 (d, *J* = 2,02 Hz, 1 H) 7,44 (dd, *J* = 7,20, 3,41 Hz, 2 H) 8,38 (s, 1 H) 8,82 (d, *J* = 7,33 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 351 [(*M*+*H*)⁺], calc. para C₁₇H₁₇F₃N₄O: 350.

5.6.20. Síntesis de 4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo

[0151]



[0152] El procedimiento de Suzuki descrito en el Ejemplo 5.6.6, parte D, se siguió para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,41-1,46 (m, 6 H) 4,14 (s, 3 H) 5,26-5,39 (m, 1 H) 7,10 (dd, *J* = 7,45, 4,93 Hz, 1 H) 7,38 (d, *J* = 7,33 Hz, 1 H) 8,14 (dd, *J* = 4,80, 1,77 Hz, 1 H) 8,20-8,26 (m, 4 H) 8,78 (d, *J* = 7,33 Hz, 1 H) 8,87 (s, 1 H) 8,99 (dd, *J* = 7,45, 1,89 Hz, 1 H). LRMS (ESI) *m/z* 389 [(*M*+*H*)⁺], calc. para C₂₂H₂₀N₄O₃: 388.

5.6.21. Síntesis de 4-(3-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona y 3-cloro-4-(3-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona

[0153]



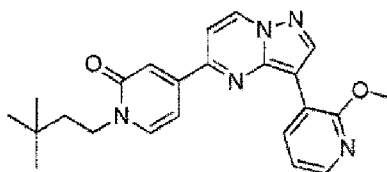
[0154] Se recogió 1-(3-metil-butil)-4-pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il-1H-piridin-2-ona (940 mg, 3,33 mmol) en acetonitrilo. Se añadió N-cloro succinimida (445 mg, 6,6 mmol) y la reacción se agitó a 40 °C durante una noche. A continuación, la mezcla de reacción se destiló al vacío y se purificó por prep. neutra Shimadzu para obtener ambos productos después de la liofilización.

[0155] **A**, 19 mg obtenidos. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,26 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,88 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 1,77 Hz, 1H), 7,03 (dd, *J* = 2,15, 7,20 Hz, 1H), 3,91-3,99 (m, 2H), 1,53-1,63 (m, 3H), 0,91-0,96 (m, 6H). LRMS (ESI) *m/z* 317 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₆H₁₇ClN₄O: 316,7.

[0156] **B**, 112 mg obtenidos. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,23-9,31 (m, 1H), 8,47-8,51 (m, 1H), 7,90 (d, *J* = 7,07 Hz, 1H), 7,42 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H), 6,53 (d, *J* = 6,82 Hz, 1H), 3,95-4,07 (m, 2 H), 1,55-1,65 (m, 3H), 0,91-0,98 (m, 6H). LRMS (ESI) *m/z* 351 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₆H₁₆Cl₂N₄O: 351,2.

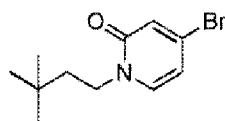
5.6.22. Síntesis de 1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

[0157]



Parte A. 4-Bromo-1-(3,3-dimetilbutil)piridin-2(1H)-ona

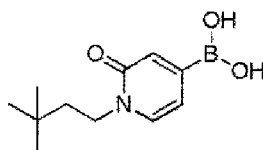
[0158]



[0159] Se recogió 4-bromo-2-hidroxi piridina (600 mg, 3,4 mmol) en DMF seca en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió hidruro de sodio al 60 % en aceite (165 mg, 4,1 mmol) y se agitó 30 minutos. Se añadió bromuro de litio (598 mg, 6,8 mmol) y se agitó durante 1 hora. Se añadió 1-bromo-3-metil butano (870 ul, 6,8 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 3 días. La mezcla de reacción se redujo al vacío y se recogió en DCM. Esta se lavó con agua, NaOH 1 N, a continuación se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se redujo al vacío para obtener 860 mg de producto en bruto que se usará tal cual en la siguiente etapa. LRMS (ESI) *m/z* 258/260 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₁H₁₆BrNO: 258,16.

Parte B. ácido (1-(3,3-dimetilbutil)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)borónico

[0160]

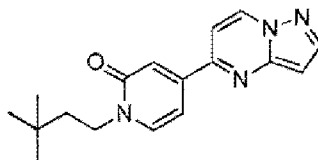


[0161] Se recogió 4-bromo-1-(3,3-dimetilbutil)piridin-2(1H)-ona (860 mg, 3,3 mmol) en 10 ml de DMF seca en una

atmósfera de nitrógeno. Se añadieron bis(pinacolato)diborano (1,26 g, 5 mmol), acetato de potasio (985 mg, 10 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ diclorometano (272 mg, 0,33 mmol), la reacción se calentó a 85 °C y se agitó durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de celite con DCM. Esta se redujo al vacío, se recogió en NaOH 1 N y se lavó con DCM. A continuación, la capa acuosa se hizo ácida con HCl 1 N y se extrajo con DCM. La

Parte C. 1-(3,3-Dimetilbutil)-4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

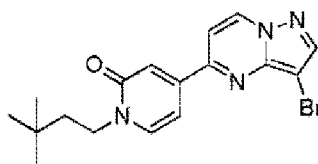
[0162]



[0163] Se recogió 6-cloro-imidazo[1,2-b]piridazina (420 mg, 2,74 mmol) en 20 ml de acetonitrilo y 10 ml de agua. Se añadieron ácido 1-(3,3-dimetilbutil)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)borónico (740 mg, 3,3 mmol), carbonato de potasio (755 mg, 5,48 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ diclorometano (224 mg, 0,274 mmol) y la reacción se agitó a 85 °C durante 2 h. Se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite con DCM y se redujo al vacío. El residuo se pasó a través de un lecho de sílice usando DCM y se secó al vacío, para obtener 438 mg de producto en bruto que se llevará tal cual a la siguiente etapa. LRMS (ESI) m/z 297 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₇H₂ON₄O: 296,38.

Parte D. 4-(3-Bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3-dimetilbutil)piridin-2(1H)-ona

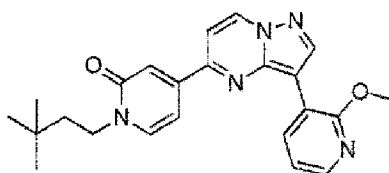
[0164]



[0165] Se recogió 1-(3,3-dimetilbutil)-4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona (438 mg, 1,48 mmol) en acetonitrilo. Se añadió N-bromo succinimida (263 mg, 1,48 mmol) y la reacción se agitó durante 4 horas. A continuación, la mezcla de reacción se destiló al vacío, se recogió en acetato de etilo y se lavó con agua, NaOH 1 N, salmuera y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se redujo al vacío para obtener 522 mg de producto en bruto que se usará en reacciones adicionales. LRMS (ESI) m/z 375/377 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₇H₁₉BrN₄O: 375,27.

Parte E. 1-(3,3-Dimetilbutil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

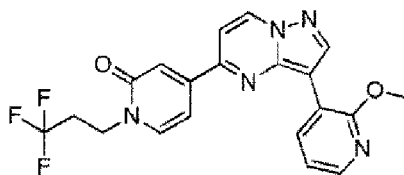
[0166]



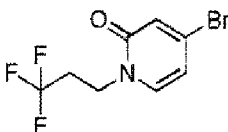
[0167] Se recogieron 4-(3-bromo-pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3-metil-butil)-1H-piridin-2-ona (150 mg, 0,4 mmol), ácido 2-metoxipiridin-3-borónico (122 mg, 0,8 mmol), carbonato de potasio (165 mg, 1,2 mmol), Pd(OAc)₂ (2 mg, 0,08 mmol) y x-Phos (8 mg, 0,16 mmol) en 2 ml de dioxano y 1 ml de agua en un tubo cerrado herméticamente y se calentaron a 85 °C durante 2 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite con acetonitrilo y DCM, se redujo al vacío. Se purificó por liofilización prep. de fase neutra Shimadzu para obtener 26 mg de producto. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,31 (d, J = 7,33 Hz, 1H), 8,83 (s, 2H), 8,11-8,15 (m, 1H), 7,91 (d, J = 7,07 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 7,33 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 2,02 Hz, 1H), 7,16-7,22 (m, 1H), 7,04-7,09 (m, 1H), 4,04 (s, 5H), 1,50-1,60 (m, 2H), 0,98 (s, 9H). LRMS (ESI) m/z 404 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₃H₂₅N₅O₂: 403,49.

5.6.23. Síntesis de 4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

[0168]

5 Parte A. 4-Bromo-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

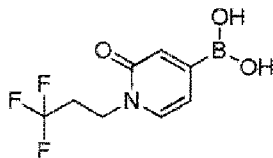
[0169]



10 **[0170]** Se recogieron 4-bromo-2-hidroxi piridina (400 mg, 2,3 mmol), 1-yodo-3,3,3-trifluoropropano (3 g, 13,8 mmol) y carbonato de potasio (3,17 g, 23 mmol) en THF en un tubo cerrado herméticamente y se agitó a 80 °C durante una noche. La reacción se redujo al vacío y se purificó en una columna de sílice ISCO con hexano y acetato de etilo al 5-100 %. Las fracciones del producto se redujeron al vacío para obtener 445 mg de producto. LRMS (ESI) m/z 270/272 [(M+H)]⁺, calc. para C₈H₇BrF₃NO: 270,05.

15 Parte B. Ácido (2-oxo-1-(3,3,3-trifluoropropil)-1,2-dihidropiridin-4-il)borónico

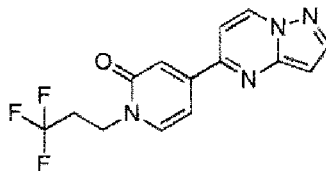
[0171]



20 **[0172]** Se recogió 4-bromo-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona (445 mg, 1,65 mmol) en dioxano en una atmósfera de nitrógeno. Se añadieron bis(pinacolato)diborano (627 mg, 2,48 mmol), acetato de potasio (242 mg, 2,48 mmol), Pd₂(dba)₃ (10 mg, 0,0165 mmol) y trifenilfosfina (9 mg, 0,033 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 85 °C y se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de celite con DCM. Esta se redujo al vacío para producir 500 mg de producto en bruto, para su uso en una reacción adicional. LRMS (ESI) m/z 235 [(M+H)]⁺, calc. para C₈H₉BF₃NO₃: 234,97.

25 Parte C. 4-(Pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

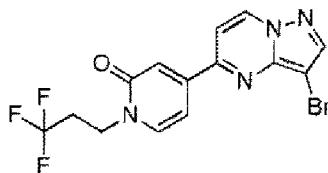
[0173]



35 **[0174]** Se recogió 6-cloro-imidazo[1,2-b]piridazina (243 mg, 0,766 mmol) en 20 ml de acetonitrilo y 10 ml de agua. Se añadieron ácido (2-oxo-1-(3,3,3-trifluoropropil)-1,2-dihidropiridin-4-il)borónico (500 mg, 0,766 mmol), carbonato de potasio (653 mg, 2,3 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ diclorometano (13 mg, 0,00766 mmol) y la reacción se agitó a 85 °C durante 2 h. Se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite con DCM y se redujo al vacío para obtener 260 mg de producto en bruto que se llevará tal cual a la siguiente etapa. LRMS (ESI) m/z 309[(M+H)]⁺, calc. para C₁₄H₁₁F₃N₄O: 308,27.

40 Parte D. 4-(3-Bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

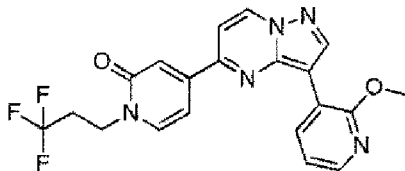
45 **[0175]**



[0176] Se recogió 4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona (260 mg, 0,84 mmol) en acetonitrilo. Se añadió N-bromo succinimida (151 mg, 0,84 mmol) y la reacción se agitó durante 4 horas. A continuación, la reacción se destiló al vacío, se recogió en acetato de etilo y se lavó con agua, NaOH 1 N, salmuera y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, se redujo al vacío y se purificó en una columna de sílice Isco con hexano: acetato de etilo al 5-100 %, las fracciones de producto se redujeron al vacío para obtener 70 mg de producto que se usará en reacciones adicionales. LRMS (ESI) m/z 387/389 [(M+H)]⁺, calc. para C₁₄H₁₀BrF₃N₄O: 387,1.

Parte E. 4-(3-(2-Metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

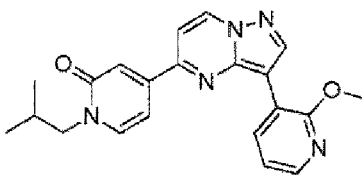
[0177]



[0178] Se recogieron 4-(3-bromopirazol[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona (70 mg, 0,18 mmol), ácido 2-metoxipiridin-3-borónico (55 mg, 0,36 mmol), trietilamina (151 μ l, 1,08 mmol) y Pd132 (4 mg, 0,0054 mmol) en 4 ml de dioxano y 1 ml de agua en un tubo cerrado herméticamente y se calentaron a 85 °C durante 2 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de celite con acetonitrilo y DCM, se redujo al vacío. El producto recristalizó en acetonitrilo y se secó para obtener 47 mg de producto. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ d 9,34 (d, J = 7,33 Hz, 1H), 8,88 (dd, J = 1,89, 7,45 Hz, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,13 (dd, J = 1,89, 4,93 Hz, 1H), 7,93 (d, J = 7,07 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 7,33 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 1,77 Hz, 1H), 7,21 (dd, J = 4,80, 7,58 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 2,02, 7,07 Hz, 1H), 4,22 (t, J = 6,82 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 2,80 (d, J = 11,37 Hz, 2H) LRMS (ESI) m/z 416 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₀H₁₆F₃N₅O₂: 415,3.

5.6.24. Síntesis de 1-isobutil-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

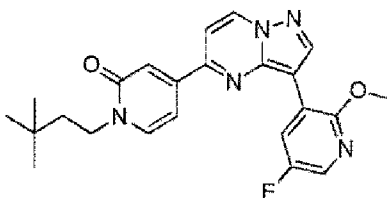
[0179]



[0180] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ : 9,33 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,90 (dd, J = 7,5, 1,9 Hz, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,13 (dd, J = 4,9, 1,9 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,21 (dd, J = 7,5, 4,9 Hz, 1H), 7,08 (dd, J = 7,2, 2,1 Hz, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,79 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 1,98-2,19 (m, 1H), 0,86-0,94 (m, 6H) LRMS (ESI) m/z 376 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₁H₂₁N₅O₂: 375,43.

5.6.25. Síntesis de 1-(3,3-Di metilbutil)-4-(3-(5-fluoro-2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

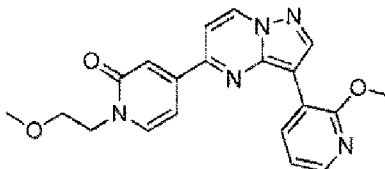
[0181]



[0182] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 9,37 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,81-8,89 (m, 1H), 8,12 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 6,96-7,10 (m, 1H), 4,06 (s, 3H), 3,87-4,02 (m, 2H), 1,51-1,64 (m, 2H), 0,99 (s, 9H) LRMS (ESI) m/z 422 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₃H₂₄FN₅O₂: 421,48.

5.6.26. Síntesis de 1-(2-metoxietil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

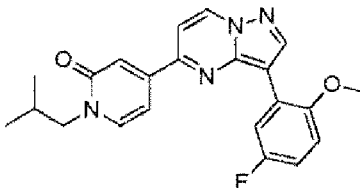
[0183]



[0184] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 9,31 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,89 (dd, J = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,13 (dd, J = 4,8, 1,8 Hz, 1H), 7,79 (dd, J = 13,0, 7,2 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,21 (dd, J = 7,5, 4,9 Hz, 1H), 7,06 (dd, J = 7,2, 1,9 Hz, 1H), 4,14 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,63 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,27 (s, 3H) LRMS (ESI) m/z 378 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₀H₁₉N₅O₃: 377,41.

5.6.27. Síntesis de 4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isobutilpiridin-2(1H)-ona

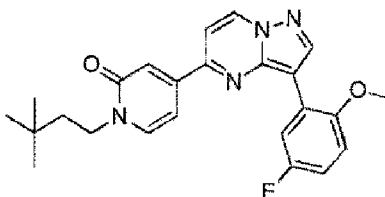
[0185]



[0186] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 9,30 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,36 (dd, J = 10,6, 3,0 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,07-7,20 (m, 2H), 7,02 (dd, J = 7,2, 1,9 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,78 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 2,13 (s, 1H), 0,90 (d, J = 6,8 Hz, 6H). LRMS (ESI) m/z 393 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₂H₂₁FN₄O₂: 392,44.

Síntesis de 1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

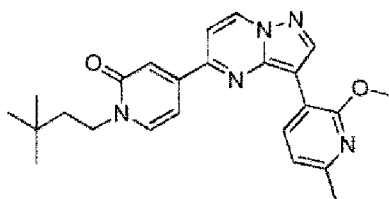
[0187]



[0188] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 9,29 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,32-8,41 (m, 1H), 7,92-7,99 (m, 1H), 7,74-7,81 (m, 1H), 7,25 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,08-7,20 (m, 2H), 6,98-7,06 (m, 1H), 3,93 (s, 5H), 1,47-1,64 (m, 2H), 0,98 (s, 9H) LRMS (ESI) m/z 421 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₄H₂₅FN₄O₂: 420,49.

5.6.28. Síntesis de 1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

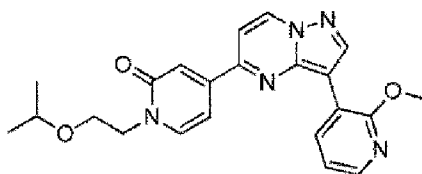
[0189]



[0190] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 9,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,73 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,75 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,00-7,07 (m, 2 H), 4,02 (s, 3H), 3,92-4,00 (m, 2H), 2,46 (s, 3H), 1,50-1,61 (m, 2H), 0,98 (s, 9H) LRMS (ESI) m/z 418 $[(M+H)]^+$, calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2$: 417,52.

5.6.29. Síntesis de 1-(2-isopropoxietil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona

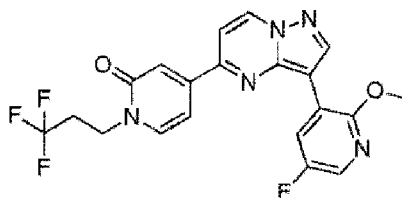
[0191]



[0192] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 9,32 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,89 (dd, $J = 7,5, 1,9$ Hz, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,13 (dd, $J = 4,9, 1,9$ Hz, 1H), 7,80 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,29 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,21 (dd, $J = 7,6, 4,8$ Hz, 1H), 7,07 (dd, $J = 7,1, 2,0$ Hz, 1H), 4,09 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,65 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 3,49-3,60 (m, 1H), 1,05 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H) LRMS (ESI) m/z 406 $[(M+H)]^+$, calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3$: 405,46.

5.6.30. Síntesis de 4-(3-(5-fluoro-2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

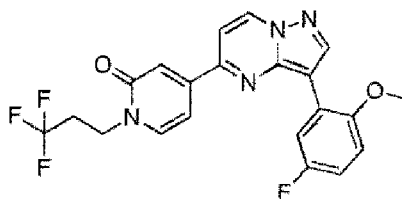
[0193]



[0194] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,35 (d, $J = 7,33$ Hz, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,81 (dd, $J = 3,03, 9,85$ Hz, 1H), 8,08 (d, $J = 3,03$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J = 7,07$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J = 7,33$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 1,77$ Hz, 1H), 7,05 (dd, $J = 1,89, 7,20$ Hz, 1H), 4,21 (t, $J = 6,95$ Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 2,72-2,90 (m, 2H) LRMS (ESI) m/z 434 $[(M+H)]^+$, calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_4\text{N}_5\text{O}_2$: 433,37.

5.6.31. Síntesis de 4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

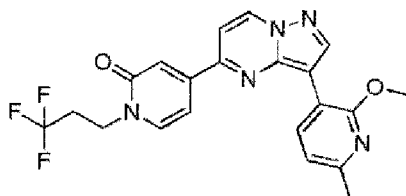
[0195]



[0196] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,32 (d, $J = 7,58$ Hz, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,36 (dd, $J = 3,03, 10,61$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J = 7,07$ Hz, 1H), 7,80 (d, $J = 7,33$ Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,09-7,23 (m, 2H), 7,06 (dd, $J = 1,77, 7,07$ Hz, 1H), 4,21 (t, $J = 6,95$ Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 2,71-2,89 (m, 2H) LRMS (ESI) m/z 4433 $[(M+H)]^+$, calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_2$: 432.

5.6.32. Síntesis de 4-(3-(2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona

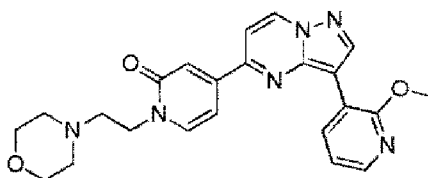
5 [0197]



10 [0198] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 9,28 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,72 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,08 (dd, J = 7,1, 2,0 Hz, 1H), 7,03 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,21 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 4,01 (s, 3H), 2,72-2,88 (m, 2H), 2,45 (s, 3H) LRMS (ESI) m/z 430 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₁H₁₈F₃N₅O₂: 429,3.

5.6.33. Síntesis de 4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(2-morfolinoetil)piridin-2(1H)-ona

15 [0199]



20 [0200] El procedimiento descrito en el Ejemplo 5.6.23 se usó para obtener el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,31 (d, J = 7,28 Hz, 1H), 8,88 (dd, J = 1,76, 7,53 Hz, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,13 (dd, J = 1,88, 4,89 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 7,28 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 7,53 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 2,01 Hz, 1H), 7,21 (dd, J = 4,77, 7,53 Hz, 1H), 7,07 (dd, J = 2,13, 7,15 Hz, 1H), 4,07 (t, J = 6,27 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,49-3,61 (m, 4H), 2,61 (t, J = 6,40 Hz, 2H), 2,46 (d, J = 4,27 Hz, 4H) LRMS (ESI) m/z 433 [(M+H)]⁺, calc. para C₂₃H₂₄N₆O₃: 432,49.

25

5.6.34. Ensayo de placa de filtro P81

[0201] Los compuestos se diluyeron en serie en una placa Labcyte LDV (Labcyte, n.º de cat. LP-0200) usando un Mutiprobe (PerkinElmer) y Biomek FX (Beckman Coulter) de tal manera que la concentración más alta de compuesto fuera de 96 µM. A continuación, los compuestos se introdujeron (75 nl por pocillo) en una placa de reacción Greiner de 384 pocillos (Greiner, n.º 781076) usando un manipulador de líquidos ECHO 550 (Labcyte). A continuación, se añadió un total de 12 µl de tampón de reacción (tampón IMAp que contenía Tween y DTT, de Molecular Devices) a cada pocillo de las columnas 1 y 13 para los controles negativos y 12 µl de 2X AAK1 (proteína humana de longitud completa 0,2 nM, N.º de registro del NCBI NP_055726.2) a los pocillos restantes. A continuación, la enzima se preincubó con el compuesto durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se iniciaron con la adición de Minitrak (PerkinElmer) de 12 µl de mezcla de sustrato que contenía 2X Mu2 (0,2 µM, proteína humana de longitud completa), ATP 2x frío (2 µM) y 1,3 pCi de ³³P-ATP caliente. Las reacciones prosiguieron durante una hora a TA. Por otra parte, se colocaron placas de filtro P81 de 384 pocillos Millipore (Millipore, n.º de catálogo MZPHNOW10) en un lavador de placas (Zoom ZW, de Titertek) y se humedecieron previamente con 50 µl de ácido fosfórico al 1 %. A continuación, reacciones de la cinasa se detuvieron tras la adición de 24 µl de ácido fosfórico al 2 % a cada pocillo y a continuación se usó el Minitrak para transferir 40 µl de cada pocillo a las placas de filtro Millipore P81 de 384 pocillos prehumedecidos. Las mezclas de reacción se incubaron durante 10 minutos a TA en las placas P81, seguido de cinco lavados con 100 µl/pocillo de ácido fosfórico al 1 % usando el lavador de filtros Zoom. El fondo de cada placa de filtro se selló seguido de la adición de 20 µl de Microscint 40 a cada pocillo, sellando la parte superior de las placas con la cubierta Flashplate y a continuación esperando una hora hasta la lectura en el TopCount (PerkinElmer).

45

5.6.35. Ensayos basados en células HEK281

50 [0202] Se cultivaron células HEK293F en medio que contenía DMEM (Gibco, n.º de cat. 11965), FBS al 10 % (SAFC Biosciences, n.º de cat. 12103C), GPS 1X (glutamina, penicilina y estreptomicina). El día uno, las células se colocaron en una placa de 10 cm, de tal forma que alcanzaron una confluencia de ~80 % en el momento de la transfección. Había aproximadamente 12 millones de células en una placa de 10 cm en el momento de la transfección. El día dos, cada placa se transfectó con 48 µg de ADN y 144 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n.º de cat. 11668-019). El ADN estaba compuesto por una mezcla (por cada placa de 10 cm) que contenía 3 µg de AAK1/HA/pIRES (humano de

longitud completa, n.º de registro del NCBI NP_055726.2), 45 µg de Flag/AP2MI/pcDNA (humano de longitud completa) y 1,5 ml de OPTI-MEM. La Lipofectamine 2000 está compuesta por una mezcla (por cada placa de 10 cm) que contiene 144 µl de Lipofectamine 2000 y 1,5 ml de OPTI-MEM. Cada mezcla se transfirió a tubos individuales de 15 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, a continuación, las dos mezclas se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se aspiró el medio de crecimiento de cada placa de 10 cm y se reemplazó por 10 ml de DMEM+SFB al 10 % (sin GPS). Finalmente, se añadieron 3 ml de mezcla de ADN/Lipofectamine a cada placa de 10 cm y se mezcló suavemente, seguido de la incubación de la placa durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5 %.

[0203] El día tres, los compuestos se diluyeron en DMSO al 100 % a una concentración final de 1000X, seguido de diluciones en serie de 3 veces para obtener un total de 5 concentraciones analizadas. Se ensayaron cuatro compuestos por cada placa de 10 cm. a continuación, se añadió por pipeteo un ul de cada dilución de compuesto en una placa de 96 pocillos, de pocillos profundos, seguido de la adición de 500 µl de DMEM + SFB al 0,5 % en cada pocillo, hasta una concentración final de 2X de cada compuesto. Las células se resuspendieron en una placa de 10 cm mediante simple pipeteo (las células HEK293 se desprenden de la placa fácilmente en este punto) y a continuación se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml y se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. A continuación, los sedimentos celulares se suspendieron de nuevo en 2,75 ml de DMEM + SFB al 0,5 % por cada placa de 10 cm, y se transfirieron 100 µl de suspensión de células a cada pocillo de una placa TC de 96 pocillos. Finalmente, se añadieron 100 µl de compuesto diluido a 2X en DMEM + SFB al 0,5 % en pocillos que contenían suspensión de células, para obtener una concentración final de 1X. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 3 horas, seguido de la transferencia de las suspensiones de células de cada pocillo a tiras para PCR de 12 tubos. Las tiras para PCR se centrifugaron en una gradilla para puntas a 1000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células y, a continuación, el medio se eliminó mediante pipeteo sin alterar el sedimento celular.

[0204] Para preparar el análisis de transferencia de Western, se suspendieron de nuevo los sedimentos celulares en 40 ul de tampón de muestra LDS-PAGE 1X (Invitrogen, n.º de cat. NP0008) + fosfatasa Halt 2X y cóctel inhibidor de proteasa (Thermo Scientific, n.º de cat. 1861284), seguido de tratamiento con ultrasonidos con un emisor de ultrasonidos de micropuntas ajustado a 5 durante 8-10 segundos. Se añadieron cinco ul de agente reductor de muestras NuPage 10X (con TDT 50 mM) a cada muestra, seguido de desnaturalización térmica a 70 °C durante 10 min en la máquina de PCR. Se cargaron un total de 10 µl por muestra en cada carril de un gel de 26 pocillos de tris-glicina al 4-20 % Criterion (Biorad, n.º de cat. 345-0034) para la transferencia de fosfo-mu2 y 10 µl por carril en un gel de 26 pocillos de Bis-Tris al 4-12 % (+tampón MES) NuPAGE (Invitrogen, n.º de cat. WG1403BX10) para la transferencia de mu2. Para los controles, se cargaron 2 ng de fosfo-mu2 o 20 ng de proteínas mu2/Flag en el último pocillo de cada gel. Después del análisis por SDS-PAGE, las muestras en cada gel se transfirieron a una membrana de PVDF usando un iBlot y se bloquearon las membranas durante una hora en TBST + leche al 5 %, seguido de lavado 3 veces durante 5-10 min con TBST. Los geles Criterion se sondaron con anti fosfo-mu2 de conejo (1:5000; un anticuerpo policlonal de conejo producido por New England Peptide y purificado por afinidad en Lexicon) en TBST + BSA al 5 %, mientras que, los geles NuPAGE se sondaron con anti Flag de ratón (1:500; Sigma, n.º de cat. F1804) en TBST + leche al 5 % y estos anticuerpos primarios se incubaron durante una noche a 4 °C en un agitador.

[0205] El día cuatro, las transferencias de Western se lavaron 3 veces durante 5-10 minutos con TBST, se sondaron con anti conejo-HRP (1:2000; BioRad, n.º de cat. 170-6515) o anti ratón-HRP (1:2000; Biorad, n.º de cat. 170-6516) en TBST + leche al 5 % durante 1 hora a TA, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST y se revelaron con reactivo ECL (GE Healthcare, n.º de cat. RPN2132) en un Versadoc. Finalmente, la cámara se configuró para tomar una fotografía cada 30 segundos durante 10 minutos y se conservó la mejor imagen con señal no saturada (cuando la señal esté saturada, las bandas se resaltarán en rojo) para cada transferencia. Se realizó un análisis de volumen en cada banda para obtener valores de densidad. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada muestra mediante normalización en primer lugar con respecto a los niveles totales de expresión de Mu2 y, a continuación, se comparó con los controles del 0 % y 100 %. A continuación, los valores de CI₅₀ se calcularon usando el programa informático de ajuste Excel.

5.6.36. Datos *in vitro*

[0206] Los datos *in vitro* obtenidos para diversos compuestos de la invención se proporcionan a continuación en la Tabla 1, donde "PM" significa peso molecular, "Ensayo P81" se refiere al ensayo de placa de filtro P81 descrito anteriormente, "CBA" se refiere al ensayo basado en células HEK281 descrito anteriormente, "--" significa que no se obtuvieron resultados para el ensayo dado, "***" significa inferior o igual a 1,0 µM, "****" significa un valor inferior o igual a 0,1 µM y "*****" significa inferior o igual a 0,01 µM.

Tabla 1

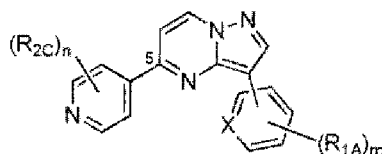
Compuesto	PM	CI ₅₀ de CBA, µM	CI ₅₀ de P81, µM
4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de <i>tert</i> -butilo	300,4	**	--
5-(1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina	200,2	>0,3	--

(continuación)

Compuesto	PM	Cl ₅₀ de CBA, μ M	Cl ₅₀ de P81, μ M
4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-5,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de isopropilo	393,4	***	***
4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piperidin-1-carboxilato de isopropilo	395,5	***	>0,3
3-(5-fluoro-2-metoxifenil)-5-(2-metoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina	350,3	***	*
(5-(2-isopropoxipiridin-4-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)metanol	284,3	>0,3	--
metil(3-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)carbamato de isopropilo	276,3	>0,3	>0,1
(3-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)propil)(metil)carbamato de isopropilo	383,4	**	-
5-(2-isopropoxipiridin-4-il)-3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidina	361,4	***	**
1-isopentil-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	389,5	***	***
4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	361,2	***	***
1-isopentil-4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	282,3	**	-
4-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo	281,3	*	-
4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo	360,2	**	-
4-(3-yodopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo	407,2	**	-
1-isopentil-4-(3-(2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	403,5	***	***
4-(3-(5-fluoro-2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	407,4	***	***
4-(3-(2-etoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	403,5	***	***
4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	406,5	***	***
4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)butil)(metil)carbamato de isopropilo	369,3	>0,3	-
(4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)butil)(metil)carbamato de isopropilo	397,5	**	-
4-(3-yodopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	408,2	***	***
1-isopentil-4-(3-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	350,3	**	-
4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)benzoato de isopropilo	388,4	***	-
4-(3-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	316,8	***	**
3-cloro-4-(3-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isopentilpiridin-2(1H)-ona	351,2	**	--
4-(3-bromopirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3-dimetilbutil)piridin-2(1H)-ona	375,3	**	-
1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	403,5	***	***
4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona	415,4	***	***
1-isobutil-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	375,4	***	***
1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(5-fluoro-2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	421,5	***	***
1-(2-metoxietil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	377,4	***	***
4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-isobutilpiridin-2(1H)-ona	392,4	***	***
1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	420,5	***	***
1-(3,3-dimetilbutil)-4-(3-(2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	417,5	-	-
1-(2-isopropoxietil)-4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piridin-2(1H)-ona	405,4	***	**
4-(3-(5-fluoro-2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona	433,4	***	***
4-(3-(5-fluoro-2-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona	432,4	***	**
4-(3-(2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(3,3,3-trifluoropropil)piridin-2(1H)-ona	429,4	***	**
4-(3-(2-metoxipiridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)-1-(2-morfolinoetil)piridin-2(1H)-ona	432,5	***	***

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

X es CH o N;

cada R_{1A} es independientemente $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$, $-C(O)N(R_{1C})_2$, $-N(R_{1C})C(O)OR_{1C}$, ciano, halo o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de R_{1B} ;

cada R_{1B} es independientemente $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$, $-C(O)N(R_{1C})_2$, $-N(R_{1C})C(O)OR_{1C}$, ciano o halo;

cada R_{1C} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de ciano, halo o hidroxilo;

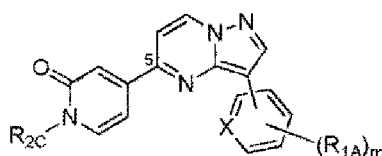
cada R_{2C} es independientemente $-OR_{2D}$, $-N(R_{2D})_2$, $-C(O)R_{2D}$, $-C(O)OR_{2D}$, $-C(O)N(R_{2D})_2$, $-N(R_{2D})C(O)OR_{2D}$, ciano, halo, oxo o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de amino, ciano, halo, hidroxilo o R_{2D} ;

cada R_{2D} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más de una sustitución de amino, ciano, halo, hidroxilo;

n es 1-3; y

m es 0-3.

2. Un compuesto que es de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

X es CH o N;

cada R_{1A} es independientemente $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$, $-C(O)N(R_{1C})_2$, $-N(R_{1C})C(O)OR_{1C}$, ciano, halo o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de R_{1B} ;

cada R_{1B} es independientemente $-OR_{1C}$, $-N(R_{1C})_2$, $-C(O)R_{1C}$, $-C(O)OR_{1C}$, $-C(O)N(R_{1C})_2$, $-N(R_{1C})C(O)OR_{1C}$, ciano o halo;

cada R_{1C} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de ciano, halo o hidroxilo;

R_{2C} es $-C(O)R_{2D}$, $-C(O)OR_{2D}$, o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más de una sustitución de amino, ciano, halo, hidroxilo o R_{2D} ;

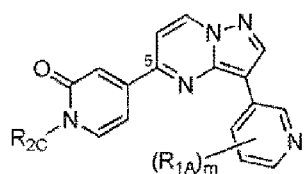
cada R_{2D} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C_{1-12} opcionalmente sustituido o hetercarbilo de 2-12 miembros, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de amino, ciano, halo o hidroxilo;

n es 1-3; y

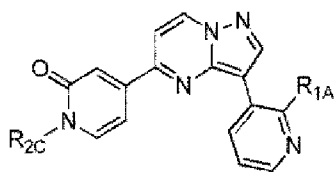
m es 0-3.

3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde X es N y m es 1 o 2.

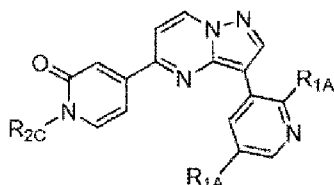
4. El compuesto de la reivindicación 2, que es de fórmula:



5. El compuesto de la reivindicación 4, que es de fórmula:



6. El compuesto de la reivindicación 2, que es de fórmula:



7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos un R_{1A} es halo.

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos un R_{1A} es -OR_{1C}.

9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_{1C} es hidrocarbilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de ciano, halo o hidroxilo.

10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_{2C} es hidrocarbilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, cuya sustitución opcional es una o más sustituciones de amino, ciano, halo, hidroxilo o R_{2D}.

11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada R_{2D} es independientemente hidrógeno o hidrocarbilo C₁₋₁₂.

12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos un R_{2D} es hidrocarbilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, cuya sustitución opcional es una o más de una sustitución de amino, ciano, halo, hidroxilo.

13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_{2D} es heterocarbilo de 2-12 miembros que comprende al menos un átomo de nitrógeno.

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o una composición farmacéutica de la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento o gestión del dolor.

