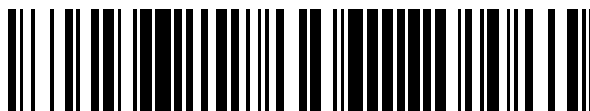


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 527**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4162 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2015 PCT/US2015/024231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2015 E 15773088 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3125884**

54 Título: **Inhibidores de molécula pequeña de mcl-1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.04.2014 US 201461975297 P

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

29.05.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, US**

72 Inventor/es:

**NIKOLOVSKA-COLESKA, ZANETA;
ABULWERDI, FARDOKHT;
SHOWALTER, HOLLIS;
MIAO, LEI;
STUCKEY, JEANNE y
MADY, AHMED**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 763 527 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de molécula pequeña de mcl-1 y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la química medicinal. En particular, la invención se refiere a una nueva clase de moléculas pequeñas que tienen una estructura de pirazolopiridina que funcionan como inhibidores de la proteína Mcl-1 y a su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

INTRODUCCIÓN

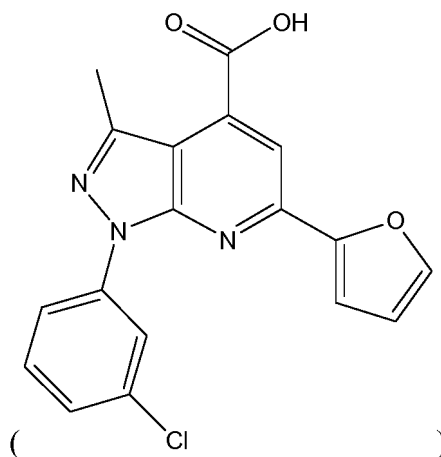
10 Un sello distintivo de las células cancerosas son los defectos en el programa de muerte celular apoptótica (véase, por ejemplo, Hanahan D y col., Cell. 2000;100:57-70). La amplia resistencia de muchos tipos de cánceres a los agentes quimioterapéuticos existentes y a la radioterapia se debe, en gran parte, a defectos en las vías de señalización apoptótica.

Se necesitan procedimientos mejorados para prevenir y/o reparar defectos en las vías de señalización apoptótica.

Sumario de la invención

15 Mcl-1 es una potente proteína antiapoptótica y un importante factor de supervivencia para muchos cánceres humanos, incluyendo de mama, pancreático, de colon, de pulmón, ovárico, de próstata, melanoma, mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda. La Mcl-1 está altamente amplificada en el cáncer humano y su sobreexpresión se ha asociado con el inicio del tumor, su progresión y resistencia a las terapias actuales contra el cáncer. Estudios independientes recientes que utilizan un enfoque genético para la regulación por disminución de la Mcl-1 han proporcionado una prueba de concepto significativa de que los inhibidores selectivos de molécula pequeña de Mcl-1 pueden tener potencial como un nuevo tratamiento para los cánceres humanos al superar la resistencia a la apoptosis de las células cancerosas a los agentes terapéuticos actuales. La Mcl-1 es una proteína homóloga relacionada con otras proteínas antiapoptóticas, tales como Bcl-2 y Bcl-x_L, pero tiene una estructura claramente diferente y exhibe unión selectiva a las proteínas proapoptóticas de BH3 solamente. Esto sugiere que la focalización específica de la proteína Mcl-1 es posible y que se pueden desarrollar fármacos específicos para Mcl-1.

25 Aplicando un enfoque de detección de alto rendimiento (HTS), los experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones para la presente invención identificaron y validaron una nueva clase de moléculas pequeñas que tienen una estructura de pirazolopiridina que funcionan como inhibidores de la proteína Mcl-1. De hecho, se ha desarrollado una clase de inhibidores de molécula pequeña de Mcl-1 basados en un HTS principal 1.



30 La eliminación sistemática de cadenas laterales de **1** y el análisis RMN detallado de los fragmentos obtenidos mapeó el sitio de unión de esta clase de inhibidores en la ranura de unión a BH3 de Mcl-1. La optimización de principal basada en la estructura se guió mediante modelado computacional apoyado por RMN y estudios de rayos X. Utilizando una ruta sintética eficiente, se sintetizaron una serie de análogos y se determinó su afinidad de unión mediante un ensayo basado en FP. Se ha desarrollado un potente análogo **57** con un K_i de 127 nM y una multiplicación por 21 de la potencia de unión en comparación con el compuesto principal **1**. El perfil de selectividad del análogo **57** además ilustró que inhibía Mcl-1 de forma más potente, con una disminución por 15 veces de la afinidad de unión a Bcl-2, y ausencia de unión a Bcl-x_L de hasta 20 μ M. La Tabla 1 muestra varios compuestos de pirazolopiridina con sus valores de CI_{50} y K_i para la unión a Mcl-1.

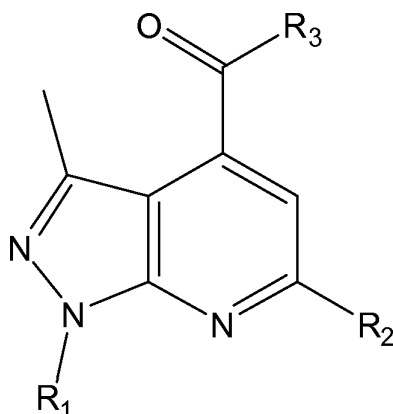
40 Como tales, la presente invención proporciona una nueva clase de moléculas pequeñas que tienen una estructura de pirazolopiridina que funcionan como inhibidores de la proteína Mcl-1 y como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

En consecuencia, la presente invención contempla la exposición de animales (por ejemplo, seres humanos) que padecen cáncer (por ejemplo, y/o trastornos relacionados con cáncer) a cantidades terapéuticamente efectivas de fármaco(s) que tienen una estructura de pirazolopiridina (por ejemplo, moléculas pequeñas que tienen una estructura de pirazolopiridina) que inhiben la actividad de Mcl-1 inhibirá el crecimiento de células cancerosas o células de soporte directamente y/o hará que tales células sean más susceptibles a la actividad inductora de muerte celular de fármacos terapéuticos contra el cáncer o radioterapia. En algunas realizaciones, la inhibición de la actividad de Mcl-1 se produce a través de, por ejemplo, la inhibición de la interacción entre Mcl-1 y Bak y/o Bax. En algunas realizaciones, la inhibición de la actividad de Mcl-1 se produce a través de, por ejemplo, la unión de la ranura de unión a BH3 de Mcl-1. La presente invención contempla que los inhibidores de la actividad de Mcl-1 satisfacen una necesidad insatisfecha para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer, cuando se administra como monoterapia para inducir la inhibición del crecimiento celular, apoptosis y/o detención del ciclo celular en células cancerosas o cuando se administra en una relación temporal con agentes adicionales, tales como otros fármacos que inducen la muerte celular o que interrumpen el ciclo celular, fármacos terapéuticos contra el cáncer o radioterapia (terapias combinadas), para hacer que una mayor proporción de las células cancerosas o células de soporte sean susceptibles de ejecutar el programa de apoptosis en comparación con la proporción correspondiente de células en un animal tratado solo con el fármaco terapéutico contra el cáncer o la radioterapia de forma individual.

En ciertos ejemplos, el tratamiento combinado de animales con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención y el curso de un agente anticanceroso produce una mayor respuesta tumoral y un beneficio clínico en tales animales en comparación con los tratados con el compuesto o los fármacos anticancerosos/radiación de forma individual. Dado que se conocen las dosis para todos los fármacos contra el cáncer y los tratamientos de radiación aprobados, la presente invención contempla las diversas combinaciones de ellos con los presentes compuestos.

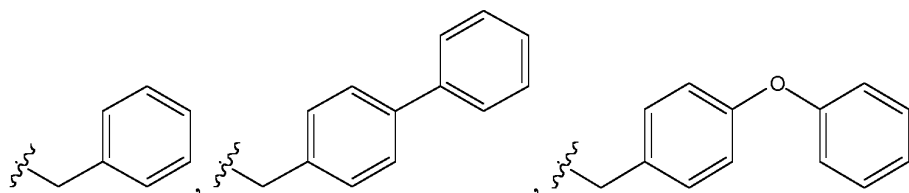
Los solicitantes han descubierto que ciertos compuestos de pirazolopiridina funcionan como inhibidores de la proteína Mcl-1 y sirven como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. Por tanto, la presente invención se refiere a compuestos de pirazolopiridina útiles para inhibir la actividad de Mcl-1 (por ejemplo, facilitando así la apoptosis celular) y aumentar la sensibilidad de las células a inductores de apoptosis y/o detención del ciclo celular. Ciertos compuestos de pirazolopiridina de la presente invención pueden existir como estereoisómeros, incluidos los isómeros ópticos. La invención incluye todos los estereoisómeros, tanto como preparaciones de estereoisómeros individuales puros como preparaciones enriquecidas de cada uno, y tanto las mezclas racémicas de tales estereoisómeros como los diastereómeros y enantiómeros individuales que pueden separarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

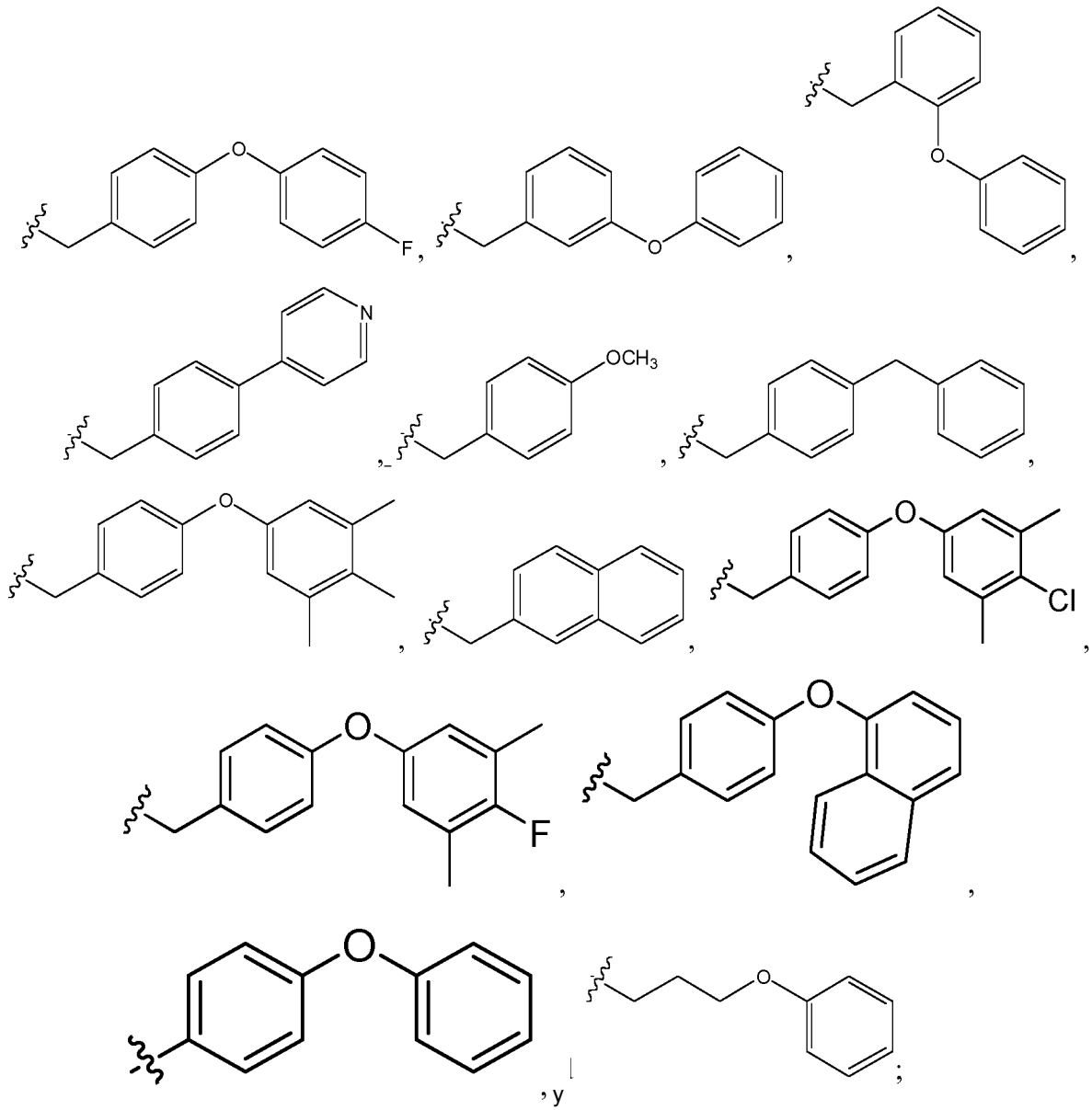
La presente invención se refiere a un compuesto que tiene Fórmula I:



incluyendo sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos de las mismos, en la que:

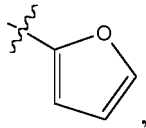
35 - R1 se selecciona entre el grupo que consiste en:



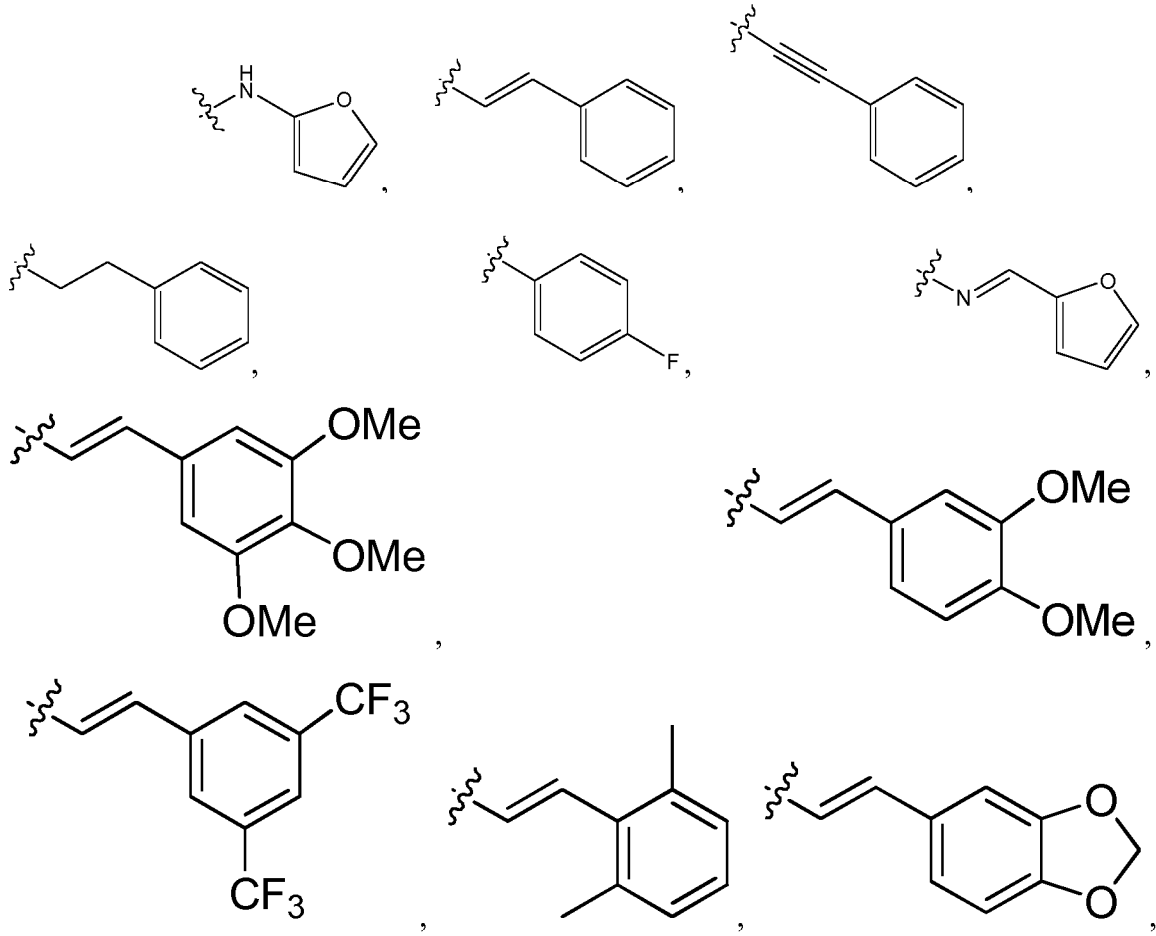


5

- R2 se selecciona entre el grupo que consiste en

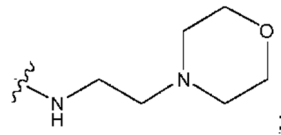


Cl, CH₃



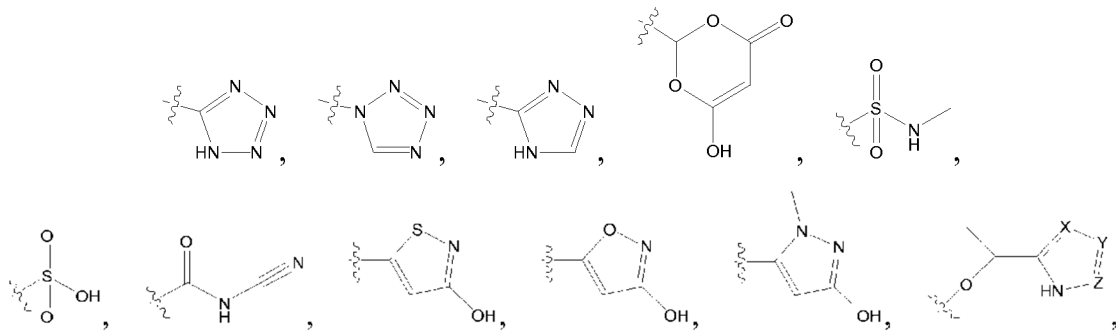
y

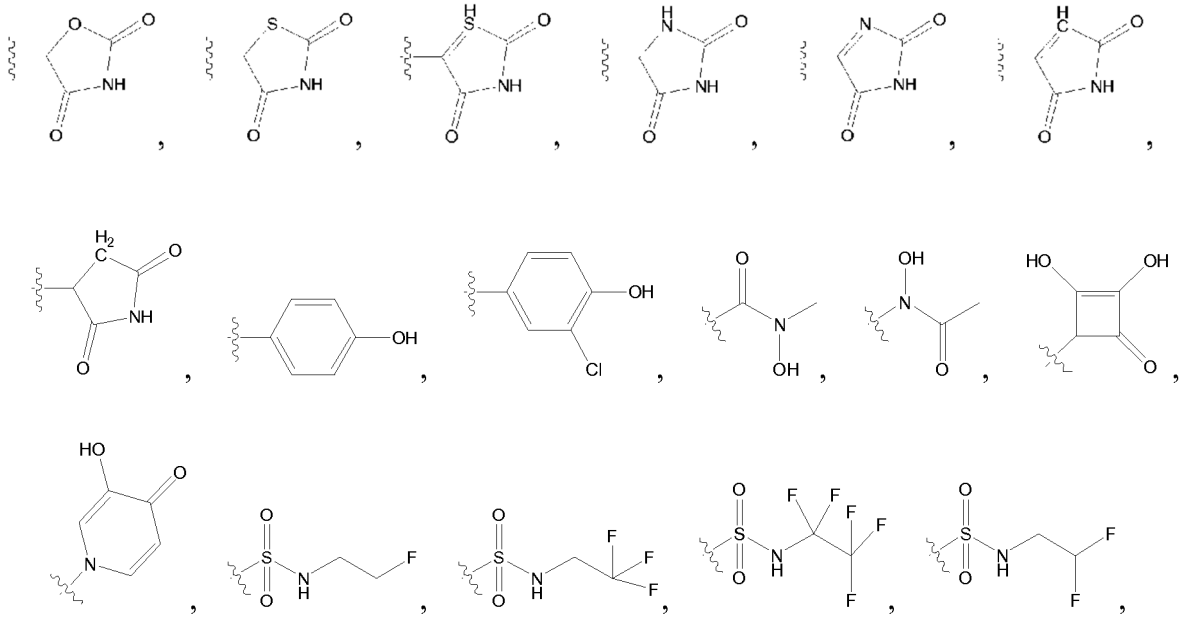
5



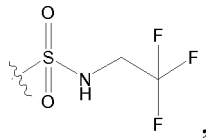
y

- R3 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, COOH, COOCH₃, COOCH₂CH₃,





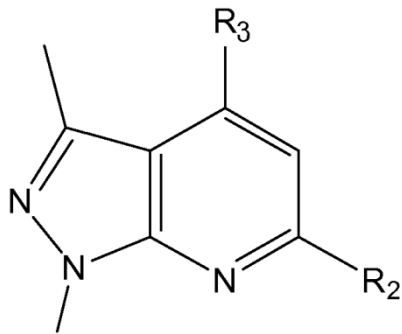
y



5

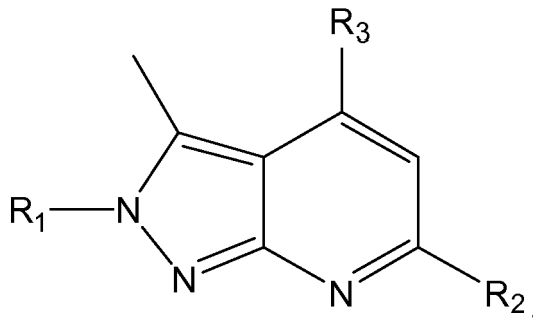
en el que X, Y, Z son independientemente N, C o CO.

Además se desvelan compuestos de pirazolopiridina abarcadas dentro de cualquiera de las Fórmulas I, II, III o IV:

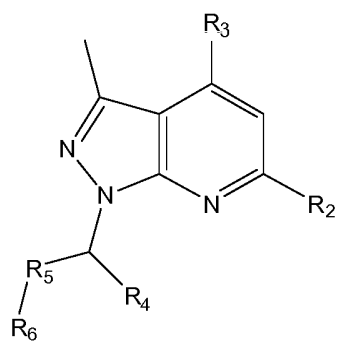


Fórmula I: R_1

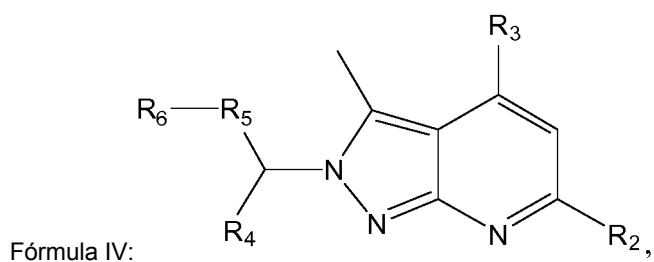
, Fórmula II:



Fórmula III:



o



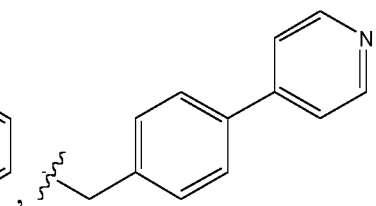
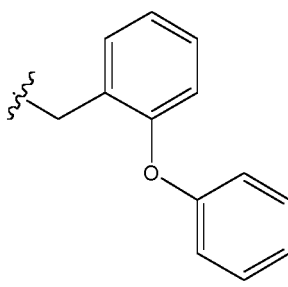
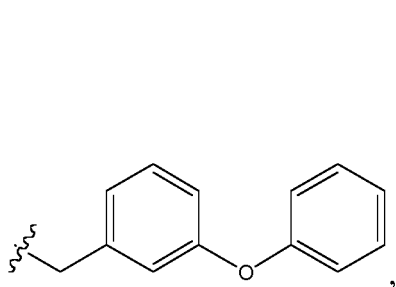
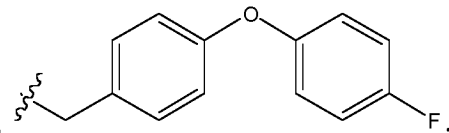
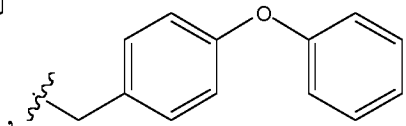
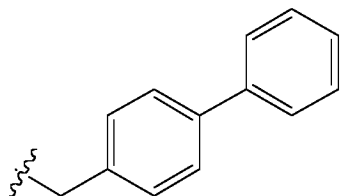
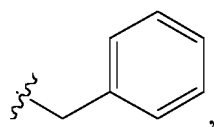
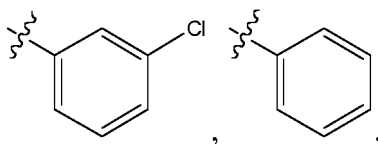
incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y/o profármacos de los mismos.

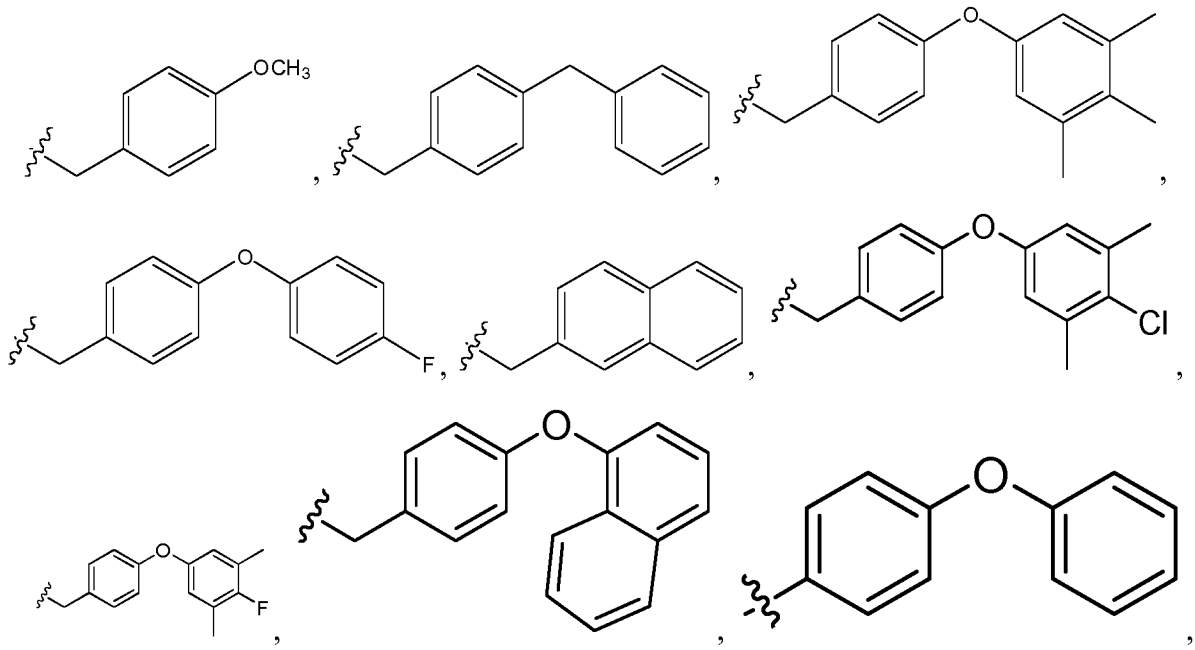
- 5 Las fórmulas I, II, III o IV no se limitan a un resto químico particular para R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆. El resto químico particular para R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ independientemente puede incluir cualquier resto químico que permita que el compuesto resultante se una con una proteína Mcl-1.

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R₁ es un resto arilo sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R₁ es un resto alcarilo sustituido o no sustituido. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R₁ se selecciona entre

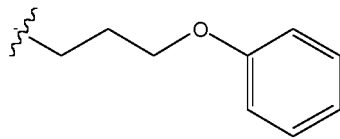
10

CH₃,





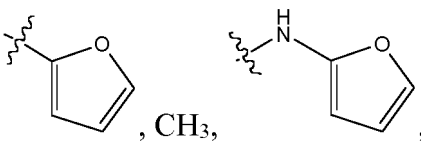
y



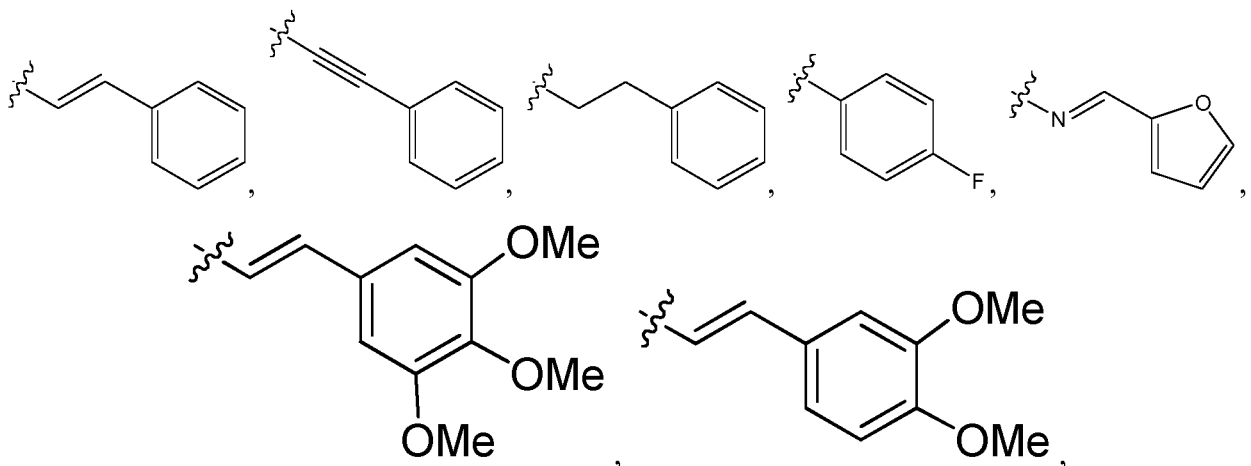
5

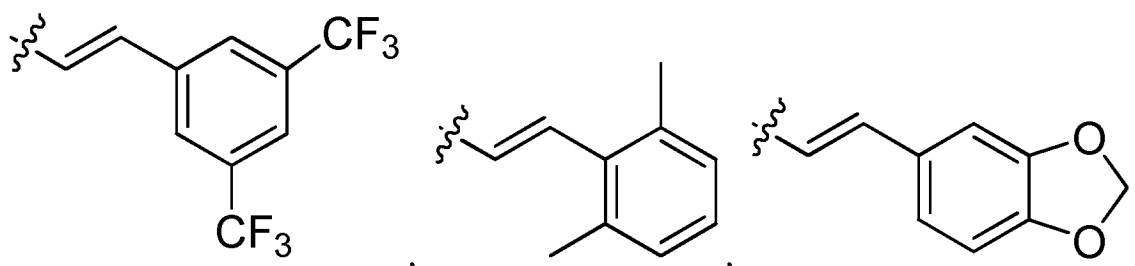
En algunos ejemplos de lo que se desvela, R1 es hidrógeno.

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R2 es un resto alquilo, un resto alquilenilo, un resto alquinilo, un resto aminoalquilo, un resto fenilo, un resto estirilo, un resto feniletinilo, un resto halógeno o un resto (furan-2-ilmetil)amino. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R2 se selecciona entre halógeno (por ejemplo, Cloro),

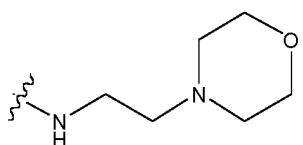


10





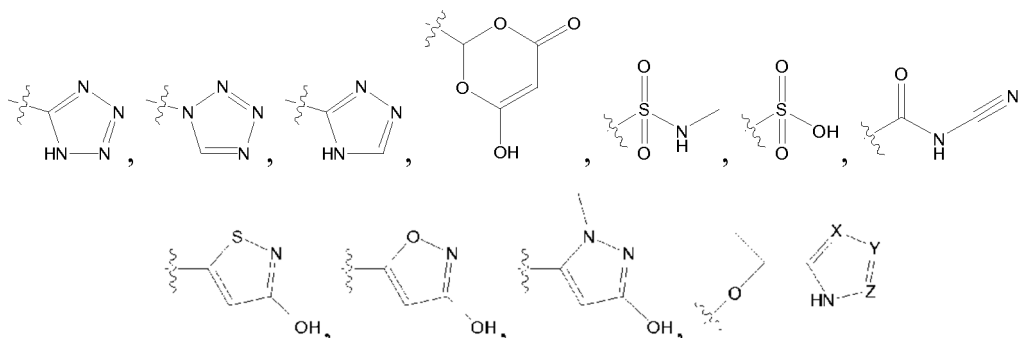
y



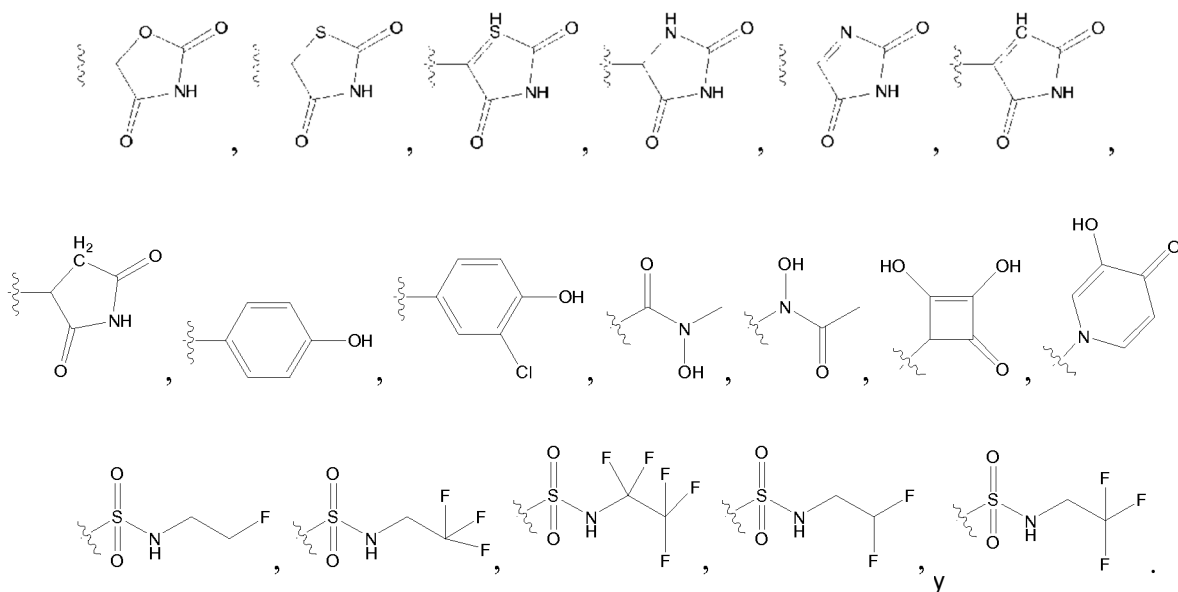
En algunos ejemplos de lo que se desvela, R2 es hidrógeno.

- 5 En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es un resto ácido. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es un resto éster. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es hidrógeno. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es CH₃. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es OH. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es un resto bioisómero de ácido carboxílico. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 se selecciona entre H, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, COOH, COOCH₃, COOCH₂CH₃,

10

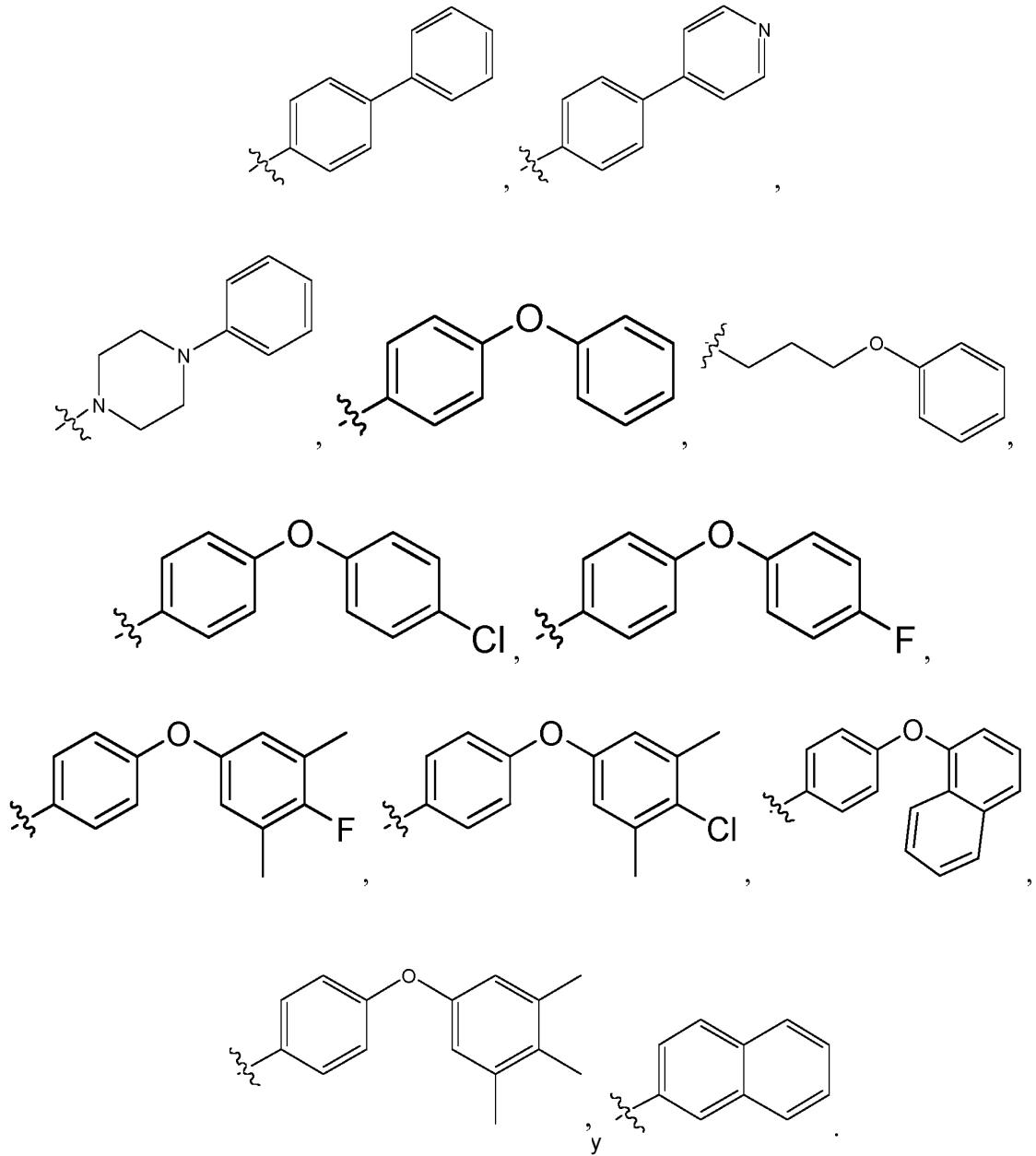


(en el que X, Y, Z son independientemente N, C o CO),



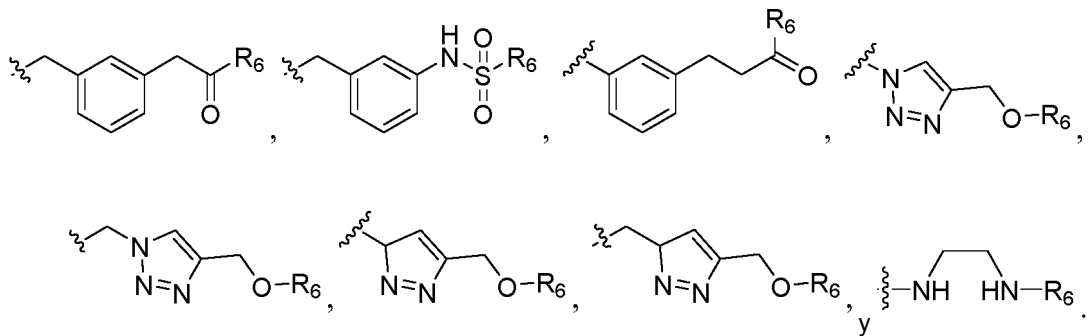
15

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R4 es un resto alquilo opcionalmente sustituido, un resto cicloalquilo, un resto arilo o un resto heterocíclico. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R4 se selecciona entre OH, hidrógeno,

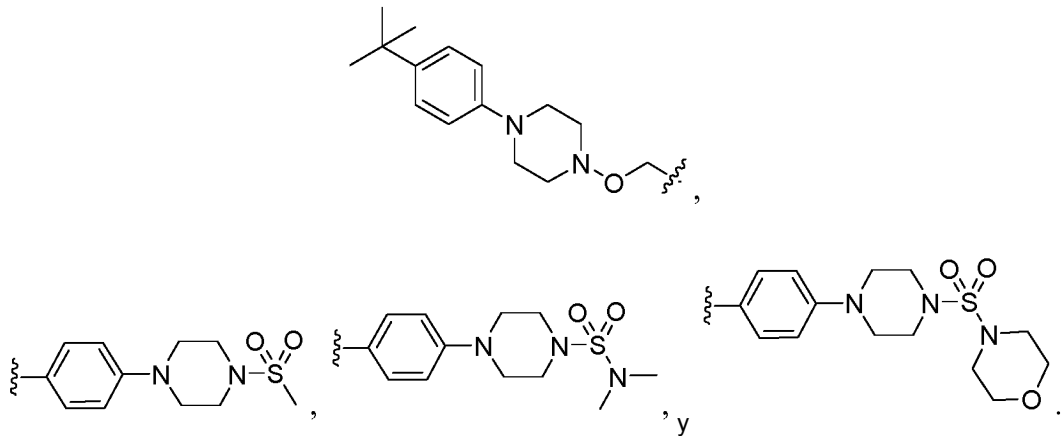


5

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R5 se selecciona entre

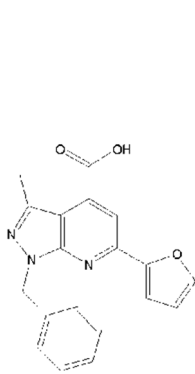


10 En algunos ejemplos de lo que se desvela, R6 está ausente. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R6 se selecciona entre el grupo que consiste en

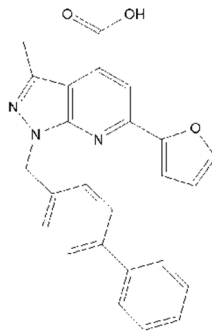


La Tabla 1 muestra las afinidades de unión (los valores de Cl_{50} se determinaron con un ensayo de unión de polarización de fluorescencia) para diversos compuestos abarcados e inhibición contra Mcl-1 dentro de las Fórmulas I, II, III y IV.

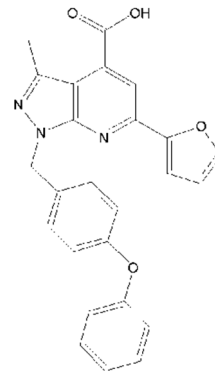
5 En una realización de la invención, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en



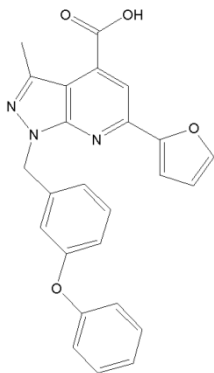
(compuesto 6),



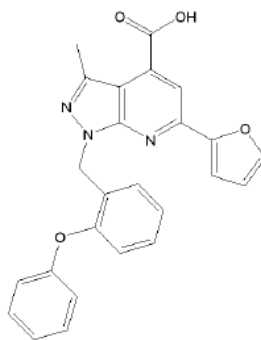
(compuesto 7),



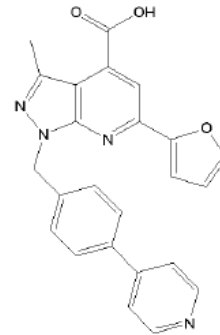
(compuesto 8),



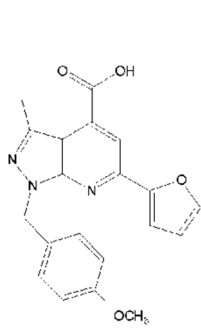
(compuesto 9),



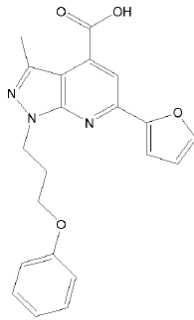
(compuesto 10),



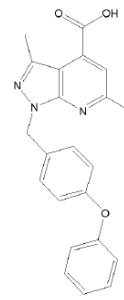
(compuesto 11),



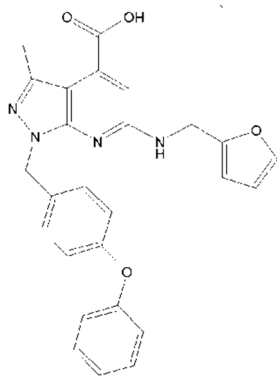
(compuesto 12),



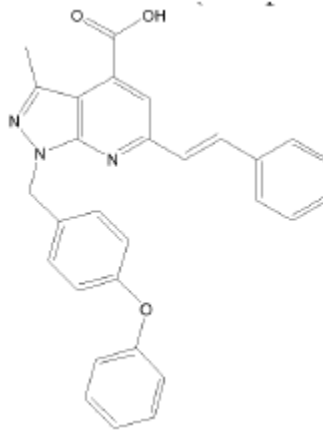
(compuesto 13),



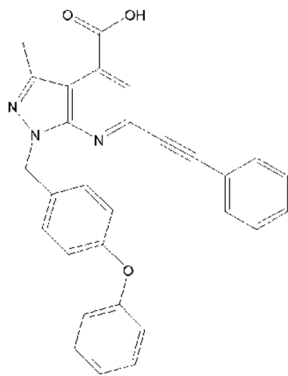
(compuesto 14),



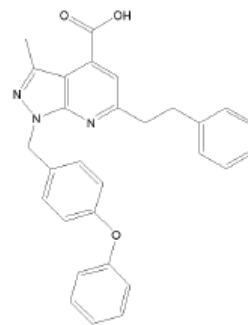
(compuesto 15),



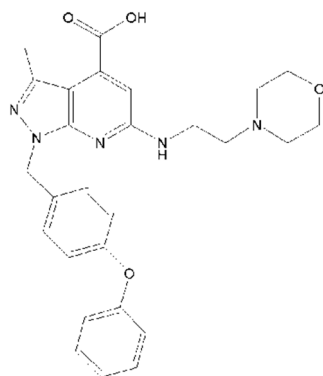
(compuesto 16),



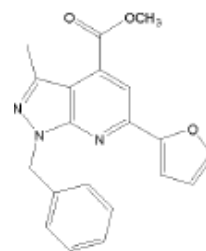
(compuesto 17),



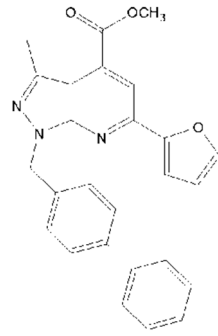
(compuesto 18),



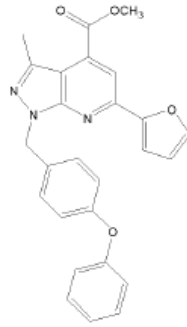
(compuesto 19),



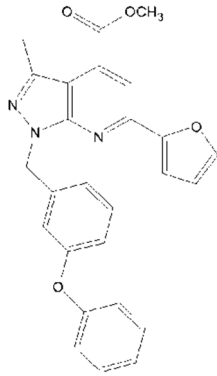
(compuesto 38),



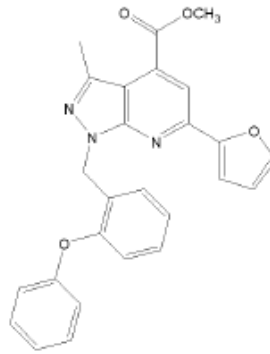
(compuesto 39),



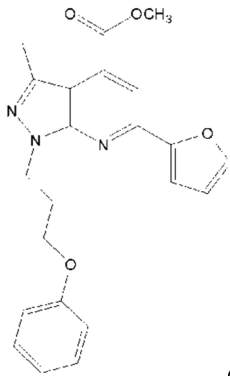
(compuesto 40),



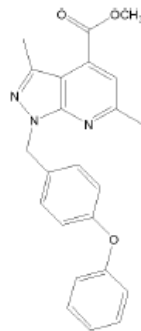
(compuesto 41),



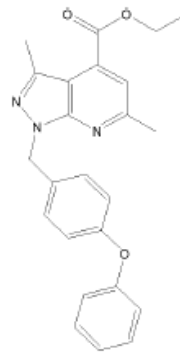
(compuesto 42),



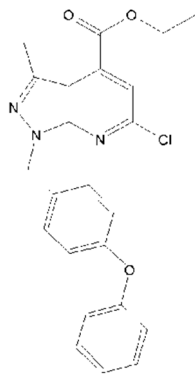
(compuesto 45),



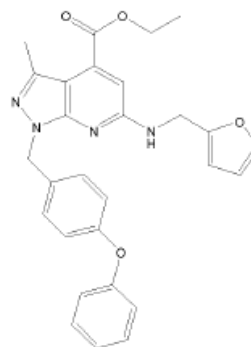
(compuesto 48),



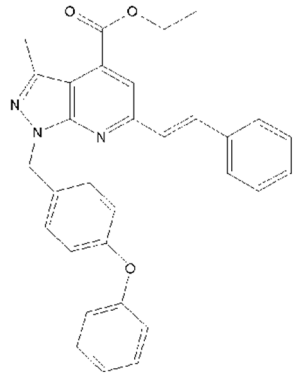
(compuesto 49),



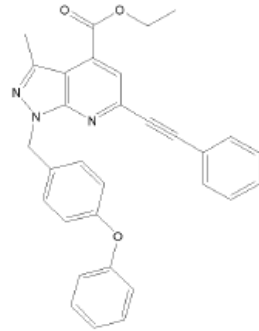
(compuesto 50),



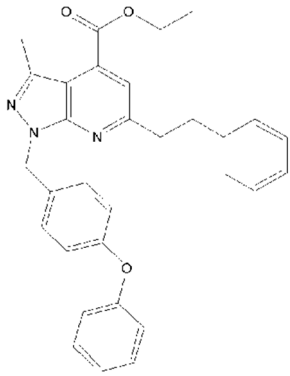
(compuesto 51),



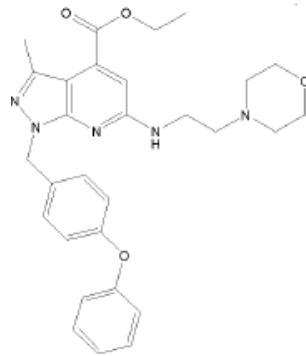
(compuesto 52),



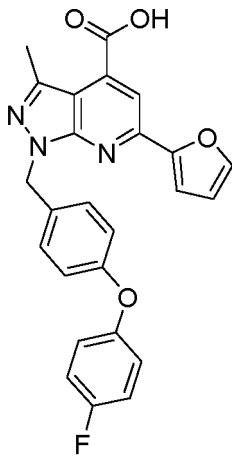
(compuesto 53),



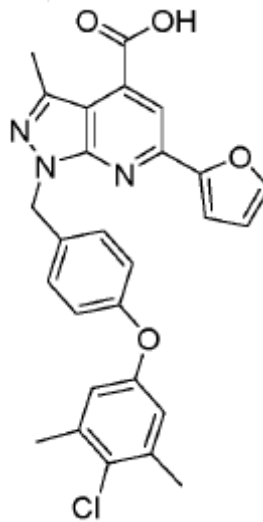
(compuesto 54),



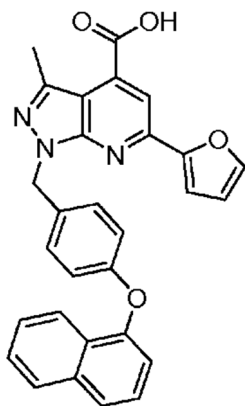
(compuesto 55),



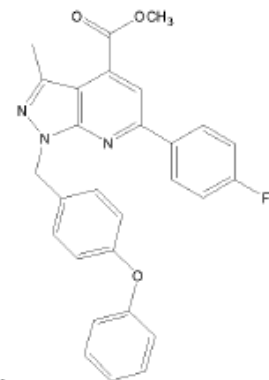
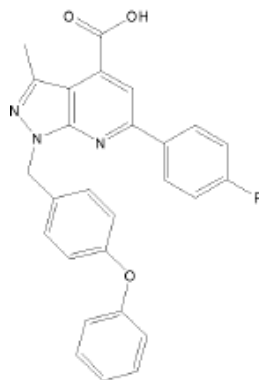
(compuesto 56),

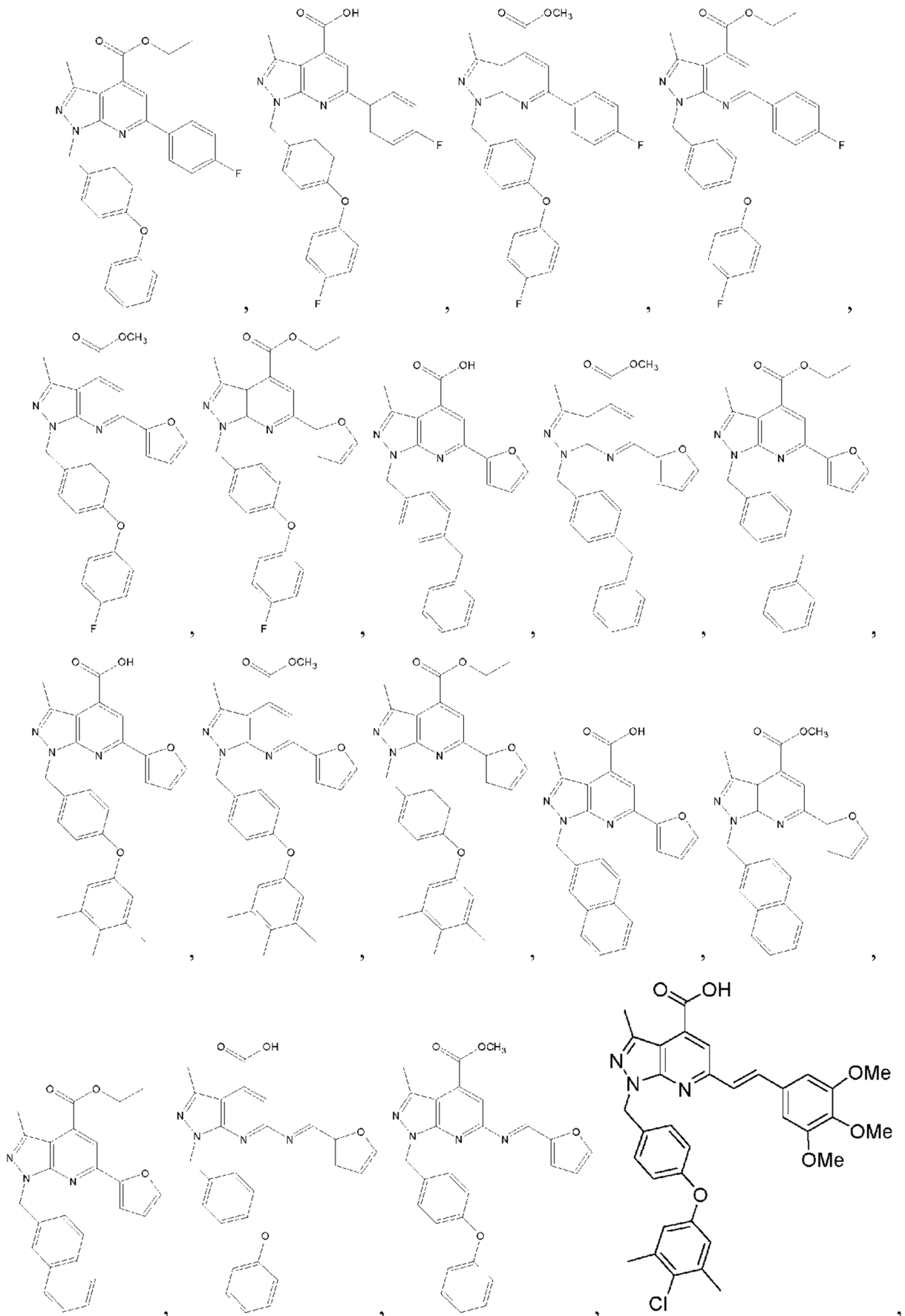


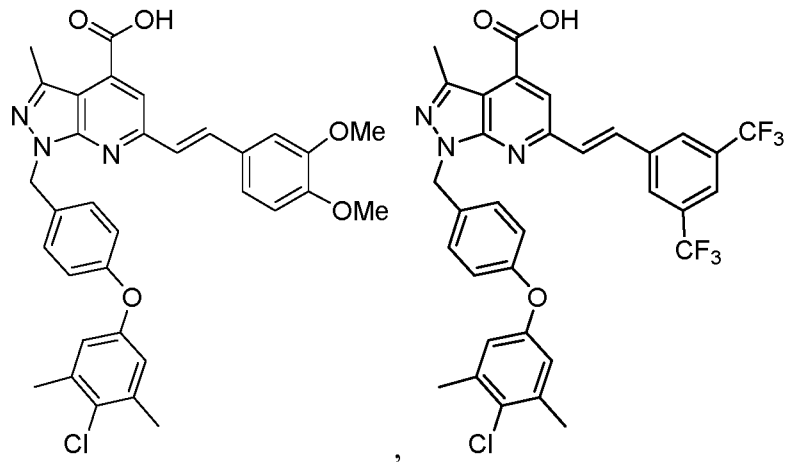
(compuesto 57),



(compuesto 58),

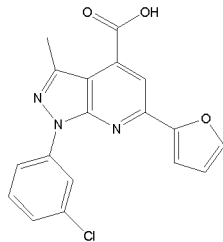




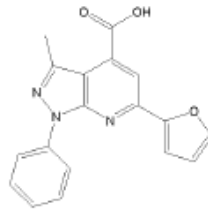


y un portador farmacéuticamente aceptable.

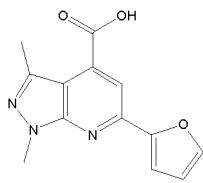
En algunos otros ejemplos desvelados, se contemplan los siguientes compuestos para las Fórmulas I, II, III y IV:



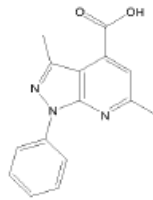
(compuesto 1),



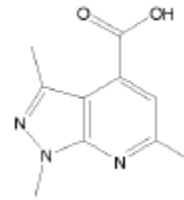
(compuesto 2),



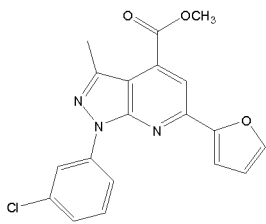
(compuesto 3),



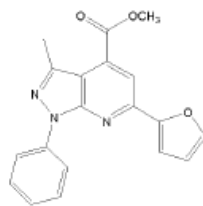
(compuesto 4),



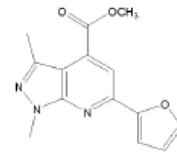
(compuesto 5),



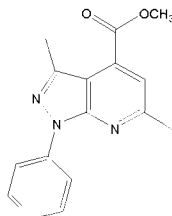
(compuesto 35),



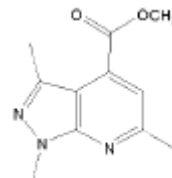
(compuesto 36),



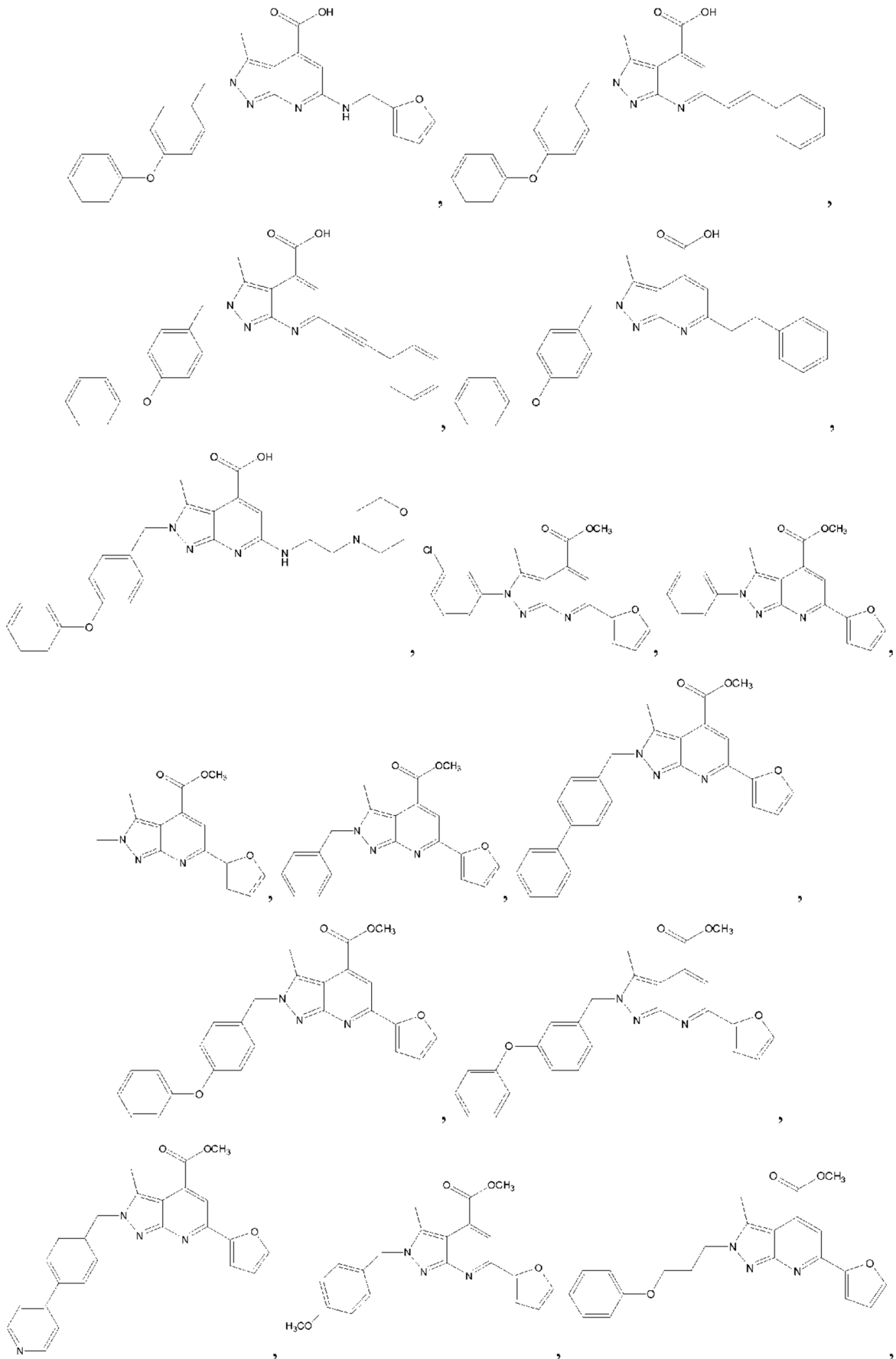
(compuesto 37),

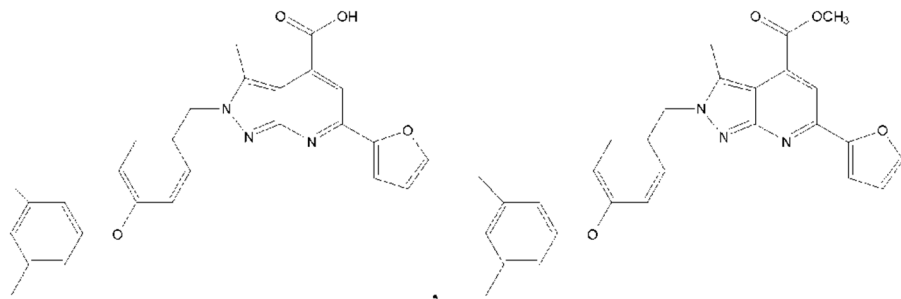
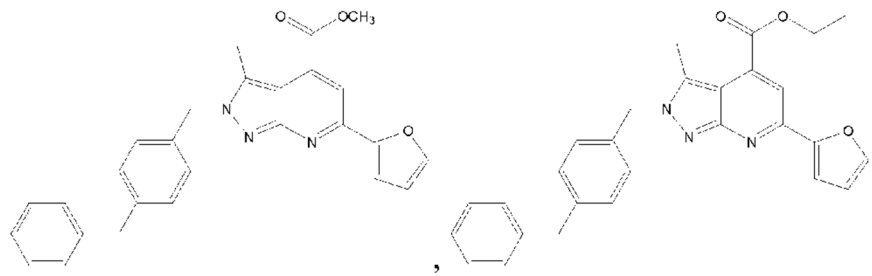
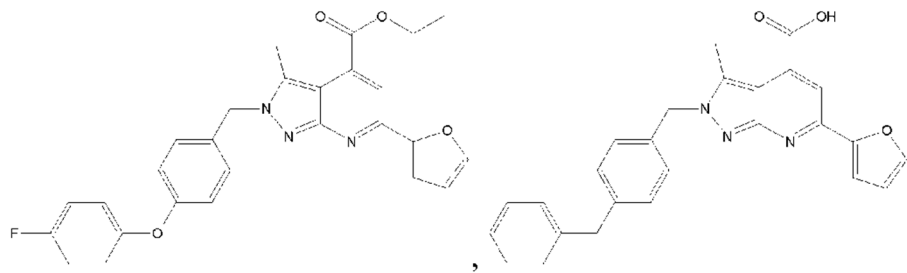
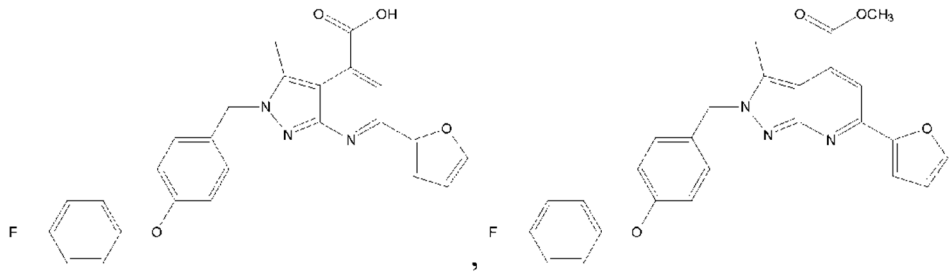
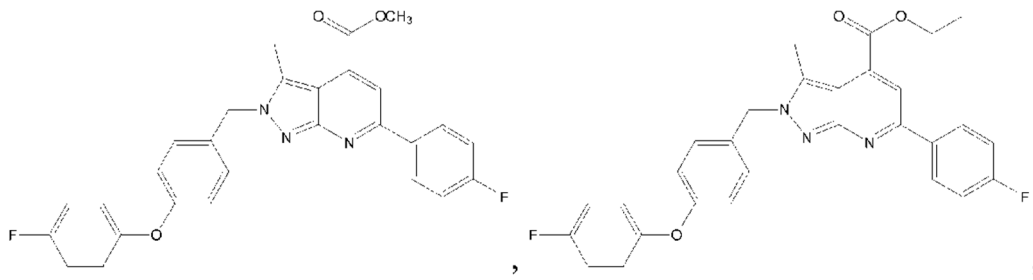


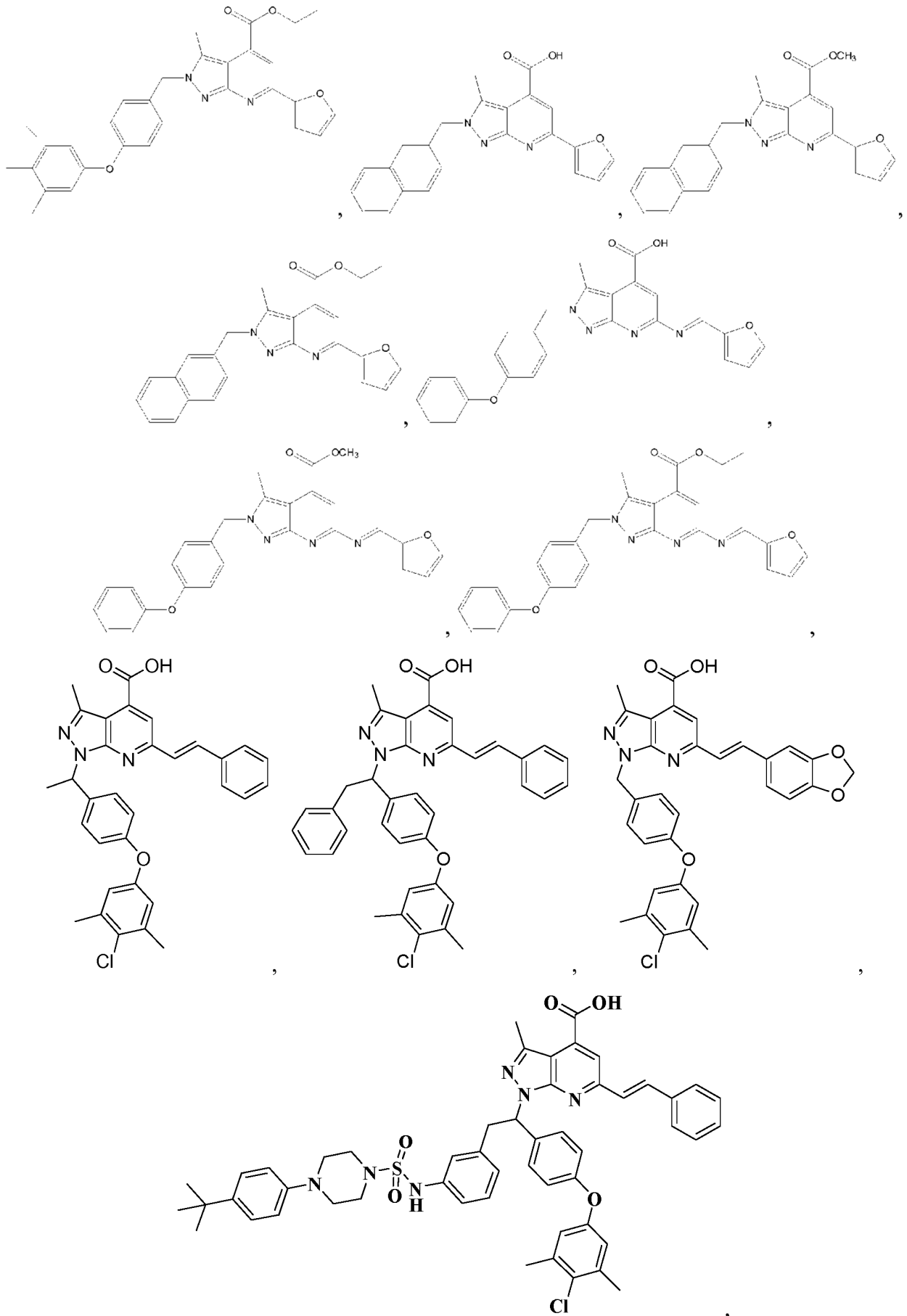
(compuesto 46),

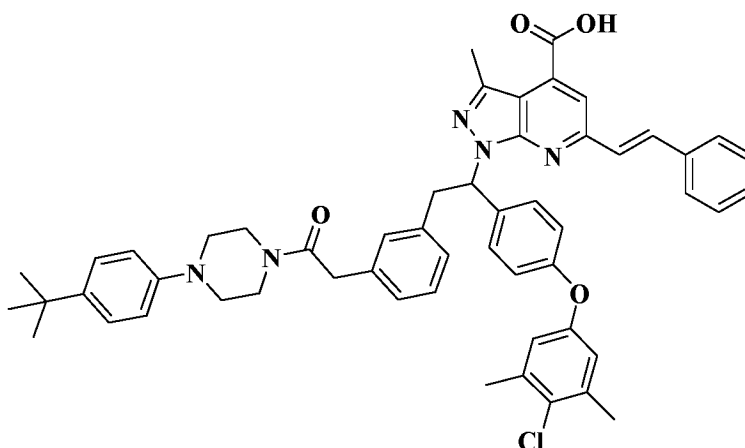


(compuesto 47),









o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o profármaco del mismo.

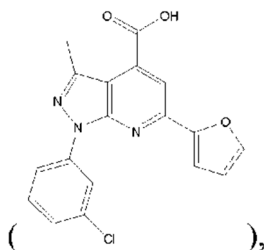
La divulgación proporciona además procedimientos para preparar cualquiera de los compuestos de la presente invención siguiendo al menos una parte de las técnicas mencionadas en el Ejemplo 5.

- 5 La divulgación también proporciona el uso de compuestos para inducir la detención del ciclo celular y / o la apoptosis en células que contienen proteínas Mcl-1 funcionales. La divulgación también se refiere al uso de compuestos para sensibilizar las células a uno o más agentes adicionales, tales como inductores de la apoptosis y / o detención del ciclo celular, y quimioprotección de células normales mediante la inducción de detención del ciclo celular antes del tratamiento con agentes quimioterapéuticos.
- 10 Los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento, mejora o prevención de trastornos, tales como los que responden a la inducción de muerte celular apoptótica, por ejemplo, trastornos caracterizados por alteración de la regulación de la apoptosis, incluyendo enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer. Los compuestos de ciertas realizaciones pueden usarse para tratar, mejorar o prevenir el cáncer que se caracteriza por resistencia a las terapias contra el cáncer (por ejemplo, las células cancerosas que son quimiorresistentes, resistentes a la radiación,
- 15 resistentes a hormonas y similares). El cáncer puede ser, por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, melanoma, cáncer de mama y / o cáncer pancreático. Los compuestos pueden usarse para tratar enfermedades hiperproliferativas caracterizadas por la expresión de proteínas Mcl-1 funcionales y/o relacionadas con Mcl-1.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20 La invención también proporciona kits que comprenden un compuesto de la invención e instrucciones para administrar el compuesto a un animal. Los kits pueden contener, opcionalmente, otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes anticancerosos o agentes moduladores de la apoptosis.

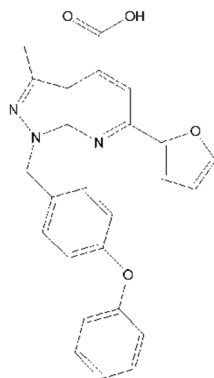
- 25 Aplicando un enfoque de cribado integrado mediante la combinación de cribados de alto rendimiento y virtuales, los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones para la presente invención identificaron varias clases químicas novedosas de moléculas pequeñas que tienen una estructura de pirazolopiridina como inhibidores de Mcl-1. El compuesto 1



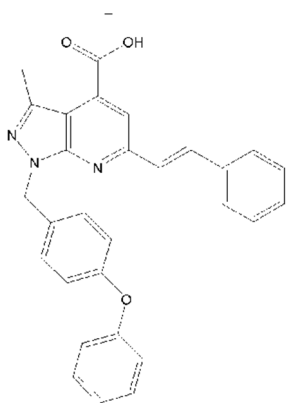
- 30 por ejemplo, con estructura de pirazolopiridina, se seleccionó como una prometedora guía de alto rendimiento para los esfuerzos de química médica. Se desarrolló una ruta sintética eficiente y se generó una biblioteca centrada. Usando el mapeo de desplazamiento químico, se caracterizó la unión del compuesto 1 guía y se confirmó que era el bolsillo de unión a BH3 de Mcl-1. Este mapeo de desplazamiento químico se aplicó aún más para el diseño racional de nuevos análogos y la optimización de la guía basada en la estructura se guió mediante modelos computacionales y estudios cristalográficos. La relación estructura-actividad se estableció utilizando dos plataformas competitivas diferentes de polarización fluorescente y resonancia de plasmón superficial, y se confirmó mediante espectroscopia de RMN de

coherencia cuántica heteronuclear única (espectroscopia de RMN HSQC). La unión de esta clase de compuestos se mejoró más de veinte veces en comparación con el compuesto 1 guía. Se realizaron ensayos funcionales y basados en células de unión *in vitro* para determinar los perfiles de selectividad respectivos contra cinco miembros de la familia de Bcl-2.

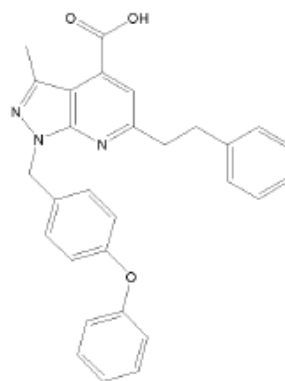
- 5 Otras modificaciones químicas al compuesto 1 condujeron al desarrollo de varios compuestos con afinidad de unión mejorada para Mcl-1 (véase la Tabla 1):



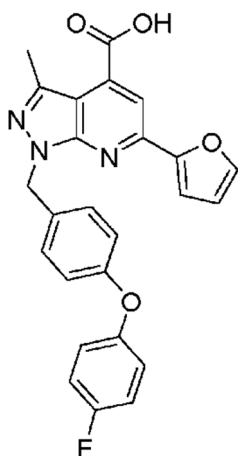
(compuesto 8),



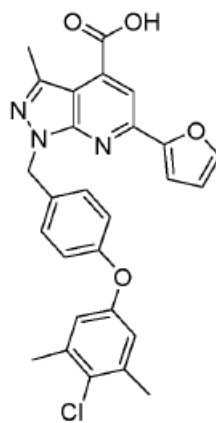
(compuesto 16),



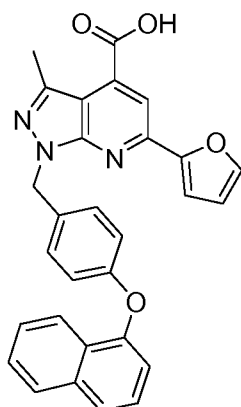
(compuesto 18),



(compuesto 56),



(compuesto 57),



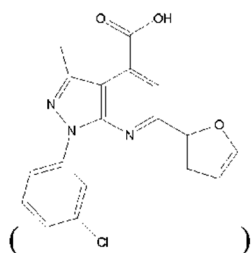
(compuesto 58).

En consecuencia, la presente divulgación proporciona además procedimientos para tratar el cáncer mediante la administración de cantidades terapéuticas de los compuestos 8, 16, 18, 56, 57 y/o 58 a un sujeto que padece cáncer. Los procedimientos no se limitan a un tipo particular de cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cualquier cáncer que tenga actividad de proteína Mcl-1. En algunos ejemplos de esto, la administración del compuesto 8, 16, 18, 56, 57 y/o 58 da como resultado la inhibición de la actividad de la proteína Mcl-1. En algunos ejemplos de esto, el compuesto administrado 8, 16, 18, 56, 57 y/o 58 se une a la proteína Mcl-1 dentro de su ranura BH3. En algunos ejemplos de esto, el compuesto 8, 16, 18, 56, 57 y/o 58 administrado inhibe el crecimiento celular y aumenta la apoptosis celular para las células que tienen actividad Mcl-1. En algunos ejemplos de esto, los compuestos 8, 16, 18, 56, 57 y/o 58 se administran conjuntamente con uno o más agentes anticancerosos.

Por otra parte, la presente divulgación proporciona procedimientos para inhibir la actividad de la proteína Mcl-1 en las células mediante la exposición de dichas células a uno o más de los compuestos de pirazolopiridina de la presente invención. En algunos ejemplos de esto, el compuesto de pirazolopiridina es el compuesto 8, 16, 18, 56, 57 y/o 58. En algunos ejemplos de esto, los compuestos de pirazolopiridina se unen a la proteína Mcl-1 inhibiendo así la actividad de la proteína Mcl-1. En algunos ejemplos de esto, los compuestos de pirazolopiridina se unen a la ranura de BH3 dentro de la proteína Mcl-1.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un modelo de farmacóforo "a escala de grises" basado en la interacción de mNoxa y Mcl-1. Se utilizó la estructura cristalina de mNoxa unida a Mcl-1 (PDB 2NLA). La Mcl-1 se muestra en representación de superficie, mientras que mNoxa se muestra como una cinta. Se muestran tres restos hidrofóbicos de mNoxa y se marcan en negro. El resto cargado Asp 83 se muestra y se marca en el punto medio de la cinta. La figura 2 muestra un acoplamiento y estudios de RMN del compuesto 1. (A) Estructura del compuesto 1 guía de HTS (obsérvese que mientras que la Figura 2 indica "38 o 1", el compuesto pretendido es el compuesto 1



(B) Modo de unión putativo "a escala de grises" del compuesto 1 a Mcl-1 (4HW2). La superficie de Mcl-1 está coloreada a "escala de grises" de acuerdo con la intensidad del desplazamiento químico. Se predice que los restos de Mcl-1 marcados en negro interactúan con 1.

(C) Gráfico de los cambios de desplazamiento químico de la amida Mcl-1 tras la adición del compuesto 1 (relación Mcl-1:1 de 1:2) en función de los números de restos de Mcl-1. Leyenda de color: El desplazamiento significativo (> 0,09 ppm) se representa con V216, V220, C221, M231, L235, N239, V243, V253, R263, I264, V265, L267, F270, G271, desplazamiento moderado ($\geq 0,03$ ppm y $\leq 0,09$ ppm) representado con F227, F228, K234, M250, N260.

La figura 3 muestra un mapeo del sitio de unión del sustituyente R'. (A) Los restos de Mcl-1 (PDB 4HW2) alterados significativamente en presencia de 6 (tono medio de gris en la "escala de grises") y 2 (tono más oscuro de gris en la "escala de grises") se muestran y marcan. (B) Gráfico de la diferencia de perturbación del desplazamiento químico (CSP) generado por sustracción de CSP de 2 de 6 (relación Mcl-1:cpd de 1:2). Se destaca una diferencia significativa de CSP de > -0,015 ppm (S247, V249, V253, L267) y se destaca > 0,015 ppm (H224, L232, K234, L235, K244, M250, 1268).

La figura 4 muestra estudios de acoplamiento y RMN de 7. (A) Modos de unión putativos de 7 a Mcl-1 (4HW2). La superficie de Mcl-1 está coloreada a "escala de grises" de acuerdo con la intensidad del desplazamiento químico.

Se predice que los restos de Mcl-1 marcados en negro interaccionan con 7. (C) Gráfico de los cambios de desplazamiento químico de la amida Mcl-1 tras la adición de 7 (relación Mcl-1:7 de 1:2) en función del número de restos de Mcl-1. Leyenda de color "escala de grises": El desplazamiento significativo ($> 0,09$ ppm) se representa con el púrpura en la "escala de grises" (V216, Q221, V220, L235, K238, N239, V243, V249, V253, I264, L267, F270, G271), desplazamiento moderado ($\geq 0,03$ ppm y $\leq 0,09$ ppm) representado con rosa en la "escala de grises" (A227, F228, M231, N260, R263).

La figura 5 muestra estudios de RMN de 8, 9, 10. (A) Gráficos de cambios de desplazamiento químico de la amida Mcl-1 tras la adición de 8 (relación Mcl-1:8 de 1:2) (B) 9 (relación Mcl-1:9 de 1:2) (C) 10 (relación Mcl-1:10 de 1:2) en función del número de restos Mcl-1. Leyenda: Desplazamiento significativo ($> 0,09$ ppm), desplazamiento moderado ($\geq 0,03$ ppm y $\leq 0,09$ ppm).

La figura 6 muestra un mapeo del sitio de unión del sustituyente R'. (A) Los restos en la "escala de grises" de Mcl-1 (PDB 4HW2) perturbados significativamente en presencia de 8 (verde en la "escala de grises") y 14 (rojo en la "escala de grises") se muestran y marcan. (B) Gráfico de las diferencias de perturbación del desplazamiento químico (CSP) generadas por sustracción de CSP de 14 de 8 (relación Mcl-1:cpd de 1:2). Una diferencia significativa de CSP de $> -0,03$ ppm se resalta en rojo en la "escala de grises" y $> 0,03$ ppm se resalta en verde en la "escala de grises".

La figura 7 muestra la estructura compleja mediante rayos X del compuesto 16 y la proteína Mcl-1 (resolución de 2,45 Å).

La figura 8 presenta un ensayo funcional recombinante que demuestra que el compuesto 57 antagoniza la función de la proteína Mcl-1.

La figura 9 muestra la destrucción selectiva de células de linfoma E μ -myc cuya supervivencia depende de Mcl-1, pero el crecimiento de las células que dependen de Bcl-2 y Bcl-xL no se ve afectado por el compuesto 57. Por el contrario, ABT-263, un inhibidor conocido de Bcl-2/Bcl-xL, mata solo las células de linfoma que dependen de estas dos proteínas, pero no las células que dependen de la proteína Mcl-1.

DEFINICIONES

La expresión "agente anticanceroso", como se usa en el presente documento, hace referencia a cualquier agente terapéutico (por ejemplo, compuestos quimioterapéuticos y/o compuestos terapéuticos moleculares), terapias antisentido, radioterapia o intervenciones quirúrgicas, utilizado en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer (por ejemplo, en mamíferos, por ejemplo, en seres humanos).

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado farmacológicamente inactivo de una molécula "fármaco" original que requiere biotransformación (por ejemplo, ya sea espontáneo o enzimática) dentro del sistema fisiológico objetivo para liberar o convertir (por ejemplo, enzimáticamente, fisiológicamente, mecánicamente, electromagnéticamente) el profármaco en el fármaco activo. Los profármacos están diseñados para superar los problemas asociados con la estabilidad, la solubilidad en agua, la toxicidad, la falta de especificidad o la biodisponibilidad limitada. Los profármacos de ejemplo comprenden una molécula de fármaco activa en sí misma y un grupo de enmascaramiento químico (por ejemplo, un grupo que suprime de forma reversible la actividad del fármaco). Algunos profármacos son variaciones o derivados de compuestos que tienen grupos escindibles en condiciones metabólicas. Los profármacos se pueden preparar fácilmente a partir de los compuestos originales utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard- Larsen y H. Bundgaard (eds.), Gordon y Breach, 1991, en particular, el Capítulo 5: "Design and Application of Prodrugs"; Design of Prodrugs, H. Bundgaard (ed.), Elsevier, 1985; Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, KB Sloan (ed.), Marcel Dekker, 1998; Methods in Enzymology, K. Widder y col. (eds.), Vol. 42, Academic Press, 1985, particularmente las págs. 309-396; Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5ª Ed., M. Wolff (ed.), John Wiley & Sons, 1995, particularmente vol. 1 y págs. 172-178 y págs. 949-982; Pro-Drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi y V. Stella (eds.), Am. Chem. Soc., 1975; and Bioreversible Carriers in Drug Design, EB Roche (ed.), Elsevier, 1987.

Los profármacos de ejemplo se vuelven farmacéuticamente activos *in vivo* o *in vitro* cuando sufren solvolisis en condiciones fisiológicas o sufren degradación enzimática u otra transformación bioquímica (por ejemplo, fosforilación, hidrogenación, deshidrogenación, glicosilación). Los profármacos a menudo ofrecen ventajas de solubilidad en agua, compatibilidad tisular o liberación retardada en el organismo mamífero. (Véase, por ejemplo, Bundgaard, Design of Prodrugs, págs. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam (1985); y Silverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, pág. 352-401, Academic Press, San Diego, CA (1992)). Los profármacos comunes incluyen derivados de ácido, tales como ésteres preparados por reacción de ácidos parentales con un alcohol adecuado (por ejemplo, un alcohol inferior) o ésteres preparados mediante la reacción del alcohol parental con un ácido carboxílico adecuado, (por ejemplo, un aminoácido), amidas preparadas mediante la reacción del compuesto ácido original con una amina, los grupos básicos reaccionaron para formar un derivado básico acilado (por ejemplo, una alquilamida inferior), o derivados que contienen fósforo, por ejemplo, fosfato, fosfonato y ésteres de fosforamidato, incluyendo fosfato cíclico, fosfonato y fosforamidato (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2007/0249564 A1).

A partir de la base de datos Pubmed (Resumen del Compuesto PubChem para CID 3316323; SMR000151730, 09 de julio de 2005, páginas 1-11, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3316323>, cargado el 15 de enero de 2016) se conoce un compuesto de pirazolopiridina.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sal (por ejemplo, obtenido por reacción con un ácido o una base) de un compuesto de la presente invención que se tolera fisiológicamente en el animal objetivo (por ejemplo, un mamífero). Las sales de los compuestos de la presente invención pueden obtenerse a partir de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas. Ejemplos de ácidos incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico y similares. Otros ácidos, tales como oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos de bases incluyen, pero sin limitación, hidróxidos de metal alcalino (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amoniaco y compuestos de fórmula NW_4^+ , en la que W es alquilo C_{1-4} y similares.

Ejemplos de sales incluyen, pero sin limitación: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mesilato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención, compuestos con un catión adecuado, tal como Na^+ , NH_4^+ y NW_4^+ (en la que W es un grupo alquilo C_{1-4}) y similares. Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de la presente invención se consideran farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

El término "solvato", como se usa en el presente documento, se refiere a la asociación física de un compuesto de la invención con una o más moléculas de disolvente, ya sea orgánico o inorgánico. Esta asociación física a menudo incluye enlaces de hidrógeno. En ciertos ejemplos, el solvato es capaz de aislarse, por ejemplo, cuando se incorporan una o más moléculas de solvato en la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" abarca solvatos tanto en fase de solución como aislables. Los solvatos ejemplares incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a esa cantidad del agente terapéutico suficiente para dar como resultado la mejora de uno o más síntomas de un trastorno, o prevenir el avance de un trastorno o causar la regresión del trastorno. Por ejemplo, con respecto al tratamiento de cáncer, en una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz se referirá a la cantidad de un agente terapéutico que disminuye la tasa de crecimiento tumoral, disminuye la masa tumoral, disminuye el número de metástasis, aumenta el tiempo de progresión del tumor o aumenta el tiempo de supervivencia en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 %.

Los términos "sensibiliza" y "sensibilizar", tal como se usan en el presente documento, se refieren a fabricar, a través de la administración de un primer agente (por ejemplo, un compuesto de pirazolopiridina de la invención), un animal o una célula dentro de un animal más susceptible, o más sensible, a los efectos biológicos (por ejemplo, promoción o retraso de un aspecto de la función celular, incluyendo, aunque no de forma limitativa, división celular, crecimiento celular, proliferación, invasión, angiogénesis, necrosis o apoptosis) de un segundo agente. El efecto sensibilizador de un primer agente en una célula objetivo puede medirse como la diferencia en el efecto biológico deseado (por ejemplo, promoción o retraso de un aspecto de la función celular, incluyendo, aunque no de forma limitativa, crecimiento celular, proliferación, invasión, angiogénesis o apoptosis) observado tras la administración de un segundo agente con y sin administración del primer agente. La respuesta de la célula sensibilizada puede incrementarse en al menos aproximadamente un 10 % o más, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 150 %, al menos aproximadamente un 200 %, al menos aproximadamente un 250 %, al menos un 300 %, al menos aproximadamente un 350 %, al menos aproximadamente un 400 %, al menos aproximadamente un 450 % o al menos aproximadamente un 500 % sobre la respuesta en ausencia del primer agente.

La expresión "regulación alterada de la apoptosis", tal como se usan en el presente documento, se refiere a cualquier aberración en la capacidad de (por ejemplo, predisposición) una célula sufrir muerte celular a través de apoptosis. La alteración de la regulación de la apoptosis se asocia con diversas afecciones o está inducida por las mismas, ejemplos no limitativos de las cuales incluyen, trastornos autoinmunes (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad del injerto contra el huésped, miastenia grave o síndrome de Sjögren), afecciones inflamatorias crónicas (por ejemplo, psoriasis, asma o enfermedad de Crohn), trastornos hiperproliferativos (por ejemplo, tumores, linfomas de linfocitos B o linfomas de linfocitos T), infecciones víricas (por ejemplo, herpes, papiloma o VIH) y otras afecciones, tales como artrosis y aterosclerosis.

La expresión "Mcl-1 funcional" tal como se usa en el presente documento, se refiere a Mcl-1 de tipo salvaje expresado a niveles normales, altos o bajos y Mcl-1 mutante que retiene al menos aproximadamente el 5 % de la actividad de la Mcl-1 de tipo salvaje, por ejemplo, al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 % o más de la actividad de tipo salvaje.

- 5 La expresión "proteína relacionada con Mcl-1" tal como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas que tienen homología de secuencia parcial (por ejemplo, al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 95 %, 99 %, 99,999 %) con Mcl-1, tienen actividad supresora de tumores y se inhiben por interacción con un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de pirazolopirina de la presente invención).

- 10 El término "bioisómero", tal como se usa en el presente documento significa un resto químico, grupo o molécula cuyas similitudes químicas y físicas con otro grupo o molécula producen propiedades biológicas similares. Generalmente se entiende que el término bioisómero hace referencia a una porción de una molécula, en lugar de a la molécula completa. Un bioisómero de un compuesto puede producir una similitud en un parámetro biológicamente importante. Un bioisómero de un compuesto puede ser útil para atenuar la toxicidad, modificar la actividad y/o alterar el metabolismo del compuesto. Los siguientes parámetros pueden considerarse en el desarrollo de un reemplazo bioisostérico: el tamaño, la forma, la distribución electrónica, la permeabilidad, la solubilidad en lípidos, la solubilidad en agua, la pK_a , la reactividad química y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno. En algunas realizaciones, el bioisómero es un bioisómero de ácido carboxílico.
- 15

- La expresión "enfermedad hiperproliferativa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier afección en la que una población localizada de células en proliferación en un animal no se rija por las limitaciones habituales del crecimiento normal. Los ejemplos de trastornos hiperproliferativos incluyen tumores, neoplasias, linfomas y similares. Se dice que una neoplasia es benigna si no sufre invasión o metástasis y es maligna si hace cualquiera de estas. Una célula "metastásica" significa que la célula puede invadir y destruir las estructuras adyacentes del cuerpo. La hiperplasia es una forma de proliferación celular que implica un incremento en el número de células en un tejido u órgano, sin una alteración significativa de la estructura o función. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en el que un tipo de células completamente diferenciadas se sustituye por otro tipo de células diferenciadas.
- 20
- 25

- El crecimiento patológico de las células linfoides activadas a menudo da lugar a un trastorno autoinmune o a una afección inflamatoria crónica. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno autoinmune" se refiere a cualquier afección en la que un organismo produce anticuerpos o células inmunitarias que reconocen a las propias moléculas, células o tejidos del organismo. Entre los ejemplos no limitantes de trastornos autoinmunes se incluyen anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Berger o nefropatía de IgA, celiaquía, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, fibromialgia, enfermedad del injerto contra el huésped, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, liquen plano, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo 1, colitis ulcerosa, vitíligo, y similares.
- 30

- 35 La expresión "enfermedad neoplásica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier crecimiento anormal de células, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

La expresión "célula normal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que no está experimentando un crecimiento o división anormal. Las células normales no son cancerosas y no forman parte de ninguna enfermedad o trastorno hiperproliferativo.

- 40 La expresión "agente antineoplásico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que retrase la proliferación, crecimiento o diseminación de una neoplasia dirigida (por ejemplo, maligna).

- Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" tal como se usa en el presente documento, hacen referencia a una disminución en la aparición de células patológicas (por ejemplo, células hiperproliferativas o neoplásicas) en un animal. La prevención puede ser completa, por ejemplo, ausencia total de células patológicas en un sujeto. La prevención también puede ser parcial, de tal forma que la aparición de células patológicas en un sujeto es menor que la que habría sucedido sin la presente invención.
- 45

- La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los excipientes farmacéuticos estándar, disolventes, tensioactivos o vehículos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen vehículos acuosos y vehículos no acuosos. Los excipientes farmacéuticos estándar y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª ed. 1995.
- 50

Descripción detallada de la invención

- La leucemia 1 de células mieloides (Mcl-1) es una potente proteína antiapoptótica, perteneciente a la subfamilia de Bcl-2 de supervivencia y su papel se está convirtiendo en un factor crucial de supervivencia en una amplia gama de cánceres humanos, incluyendo PC (véase, por ejemplo, Day CL, y col., J Biol Chem. 2005; 280: 4738-44; Day CL, y col., J Mol Biol. 2008;380:958-71). Los estudios funcionales han confirmado que Mcl-1 es capaz de bloquear la apoptosis inducida por diversos estímulos apoptóticos, incluyendo quimioterapia y radiación (véase, por ejemplo, Zhou
- 55

P, y col., Blood. 1997;89:630-43). Mcl-1 está altamente regulada por aumento en diversos cánceres humanos y está asociada con la resistencia a los agentes quimioterapéuticos (véase, por ejemplo, Miyamoto Y, y col., Oncology. 1999; 56: 73-82; Schniewind B, y col., Int J Cancer. 2004; 109: 182-8; Ren LN y col., Biochem Biophys Res Commun. 2009; 386: 35-9; Wei SH, y col., Cancer Chemother Pharmacol. 2008; 62: 1055-64; Guoan X, y col., Surgery. 2010; 147: 553-61; Huang S, y col., Cancer Res. 2008;68:2944-51). Mcl-1 es un importante factor de supervivencia y la regulación por disminución de Mcl-1 aumenta la inducción de apoptosis y la quimiosensibilidad a la gemcitabina, la radiación y ABT-737 (véase, por ejemplo, Wei SH, y col., Cancer Chemother Pharmacol. 2008; 62: 1055-64; Guoan X, y col., Surgery. 2010; 147: 553-61; Huang S, y col., Cancer Res. 2008;68:2944-51). Por tanto, Mcl-1 representa un objetivo molecular muy atractivo para desarrollar una nueva clase de terapia contra el cáncer para el tratamiento de cánceres humanos mediante la superación de la resistencia a los agentes quimioterapéuticos.

Los inhibidores potentes de molécula pequeña de la subfamilia Bcl-2 incluyen los miméticos de BH3 similares a Bad (véase, por ejemplo, Oltersdorf T, y col., Nature. 2005; 435: 677-81; Tse C, y col., Cancer Res. 2008;68:3421-8). ABT-737, uno de estos miméticos, se une con gran afinidad ($K_i \leq 1$ nM) a Bcl-2, Bcl-x_L y Bcl-w pero no se une a Mcl-1 (véase, por ejemplo, Oltersdorf T, y col., Nature. 2005;435:677-81). Varios estudios han demostrado que la resistencia a ABT-737 está relacionada con altos niveles de expresión de Mcl-1 y, en muchos casos, esta resistencia se puede superar mediante el tratamiento con agentes que regulan por disminución, desestabilizan o inactivan la Mcl-1 (véase, por ejemplo, van Delft MF y col., Cancer Cell. 2006; 10: 389-99; Chen S, y col., Cancer Res. 2007;67:782-91). Recientemente se ha demostrado que la inactivación de Mcl-1 sensibiliza las células cancerosas de PC humano a la apoptosis inducida por ABT-737, lo que indica que Mcl-1 es un objetivo terapéutico relevante en estas células cancerosas (véase, por ejemplo, Huang S, y col., Cancer Res. 2008;68:2944-51).

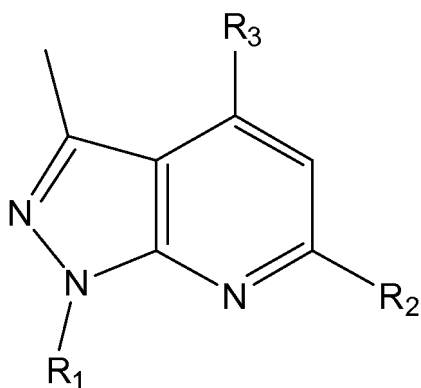
El enfoque de cribado de alto rendimiento (HTS) es una estrategia conocida para la identificación de compuestos guía potenciales para un mayor desarrollo (véase, por ejemplo, Macarron, R., y col., Nat Rev Drug Discov 2011, 10, 188-95). En experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones para la presente invención, para identificar inhibidores de molécula pequeña-pequeña de Mcl-1, se desarrolló un ensayo de HTS de doble lectura que combina dos tecnologías de ensayo, polarización de fluorescencia (FP) y transferencia de energía de resonancia Forster (FRET), se optimizó y se miniaturizó a un formato ultra-HTS de 1.536 pocillos (véase, por ejemplo, Du, Y., y col., Assay Drug Dev Technol 2011, 9, 382-93). El ensayo se usó para cribar una biblioteca de 102.255 compuestos en el Emory University Molecular Libraries Screening Center usando Mcl-1 recombinante y péptidos derivados de Noxa o Bid BH3 marcados. Los resultados identificados de ambos cribados primarios se sometieron a pruebas secundarias de dosis-respuesta y se identificaron un total de 1214 (875 de Mcl-1/Noxa y 509 de Mcl-1/Bid), incluidos 170 compuestos superpuestos. Todas las curvas de dosis-respuesta se depositaron adicionalmente en la base de datos BioAssay de PubChem como AID 1417 (véase, por ejemplo, [http://\(seguido de\) pubchem.ncbi.nlm.\(seguido de\) nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1417](http://(seguido de) pubchem.ncbi.nlm.(seguido de) nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1417)) y 1418 (véase, por ejemplo, [http://\(seguido de\) pubchem.ncbi.nlm.\(seguido de\) nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1418](http://(seguido de) pubchem.ncbi.nlm.(seguido de) nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1418)).

Una alta tasa de éxito en las campañas de HTS puede hacer que la identificación de los éxitos más prometedores sea un gran desafío y, por lo tanto, se desean estrategias novedosas para simplificar este procedimiento. Por tanto, se empleó un enfoque de cribado integrado mediante la combinación de cribado *in silico* basado en objetivos para la selección de los éxitos más prometedores. Para este fin, se usó acoplamiento molecular utilizando la estructura cristalina de Mcl-1 unida a mNoxa (PDB 2NLA) (véase, por ejemplo, Czabotar, P. E. y col., Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 6217-22) y todas las coincidencias identificadas se sometieron al protocolo de acoplamiento de ajuste inducido (IFD) de Schrödinger (véase, por ejemplo, Schrödinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol; Glide versión 5.7, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2009; Prime versión 3.0, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2011) en el sitio de unión a BH3 de Mcl-1. Se desarrolló un modelo de farmacóforo (Figura 1) basado en las interacciones de mNoxa y Mcl-1 que incluía 3 interacciones hidrofóbicas y una de enlace de hidrógeno/interacción electrostática. Se seleccionaron los compuestos capaces de imitar al menos dos de las 4 interacciones conservadas de mNoxa con Mcl-1. Esto totalizó 67 compuestos de los cuales 48 se adquirieron en vendedores comerciales. Los 48 compuestos se sometieron a rigurosos ensayos bioquímicos y biofísicos, que incluyeron ensayos de FP y SPR competitivos de respuesta a la dosis contra estudios de RMN Mcl-1 y HSQC. Los compuestos que dieron resultados consistentes en todos los ensayos de unión se consideraron como coincidencias validadas y aquellos con esqueletos químicos prometedores se seleccionaron para una mayor optimización.

En consecuencia, la presente invención se refiere a compuestos que funcionan como inhibidores de las proteínas Mcl-1. Al inhibir la actividad de Mcl-1, estos compuestos sensibilizan a las células a los inductores de apoptosis y/o detención del ciclo celular y, en algunos casos, ellos mismos inducen apoptosis y/o detención del ciclo celular. Por tanto, la divulgación se refiere a procedimientos para sensibilizar células a inductores de apoptosis y/o detención del ciclo celular y a procedimientos para inducir apoptosis y/o detención del ciclo celular en células, que comprenden poner en contacto las células con un compuesto de la invención solo o en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un inductor de la apoptosis o un agente de interrupción del ciclo celular.

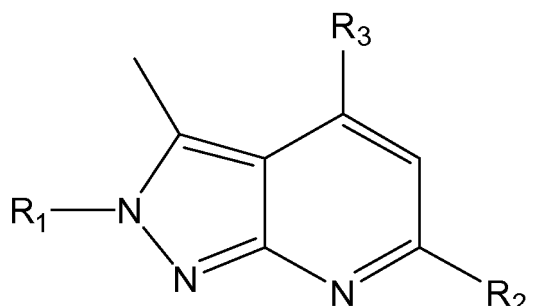
La divulgación se refiere además a procedimientos de tratamiento, mejora o prevención de trastornos en un paciente, tales como los que responden a la inducción de apoptosis, que comprenden administrar al paciente un compuesto de la invención y uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un inductor de la apoptosis. Tales trastornos incluyen los caracterizados por una alteración de la regulación de la apoptosis y los caracterizados por la proliferación de células que expresan proteínas Mcl-1 funcionales (por ejemplo, cáncer pancreático).

En un ejemplo desvelado en particular, se proporcionan compuestos de pirazolopiridina abarcados en cualquier Fórmula I, II, III o IV:

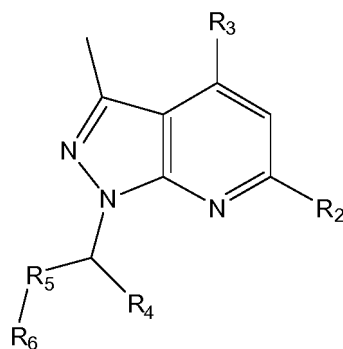


Fórmula I:

Fórmula II:

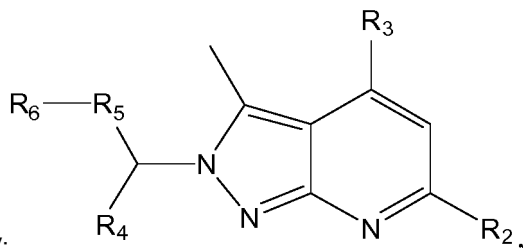


Fórmula III:



5

o



Fórmula IV:

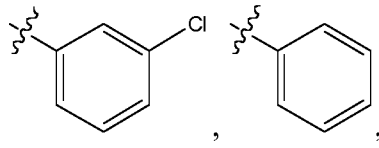
incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y/o profármacos de los mismos.

Las fórmulas I, II, III o IV no se limitan a un resto químico particular para R1, R2, R3, R4, R5 y R6. En algunos ejemplos de lo que se desvela, el resto químico particular para R1, R2, R3, R4, R5 y R6 incluye independientemente cualquier resto químico que permita que el compuesto resultante se una con una proteína Mcl-1. En algunos ejemplos de lo que se desvela, el resto químico particular para R1, R2, R3, R4, R5 y R6 incluye independientemente cualquier resto químico que permita que el compuesto resultante se una al bolsillo de unión a BH3 de Mcl-1.

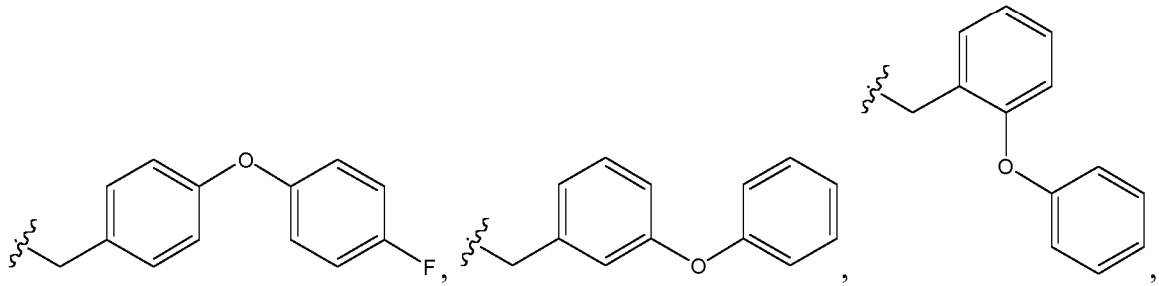
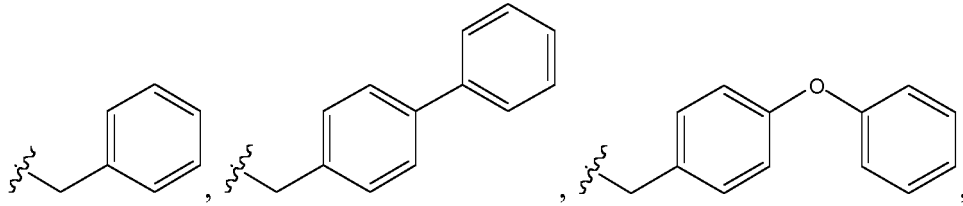
En algunos ejemplos de lo que se desvela, R1 es un resto arilo sustituido o no sustituido. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R1 es un resto alcarilo sustituido o no sustituido. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R1 se

15

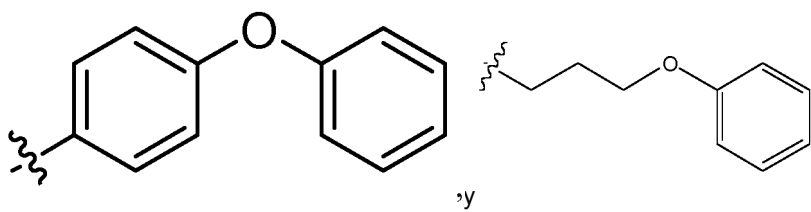
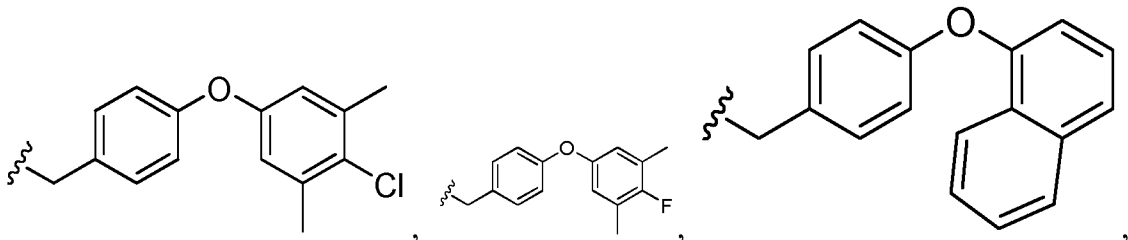
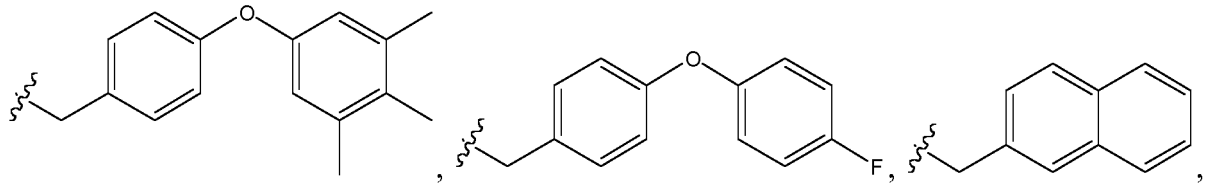
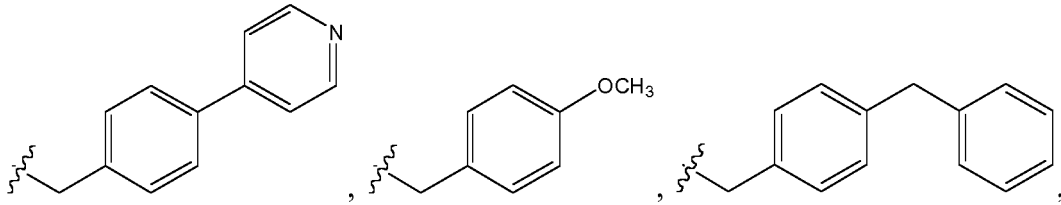
selecciona entre



CH₃,



5

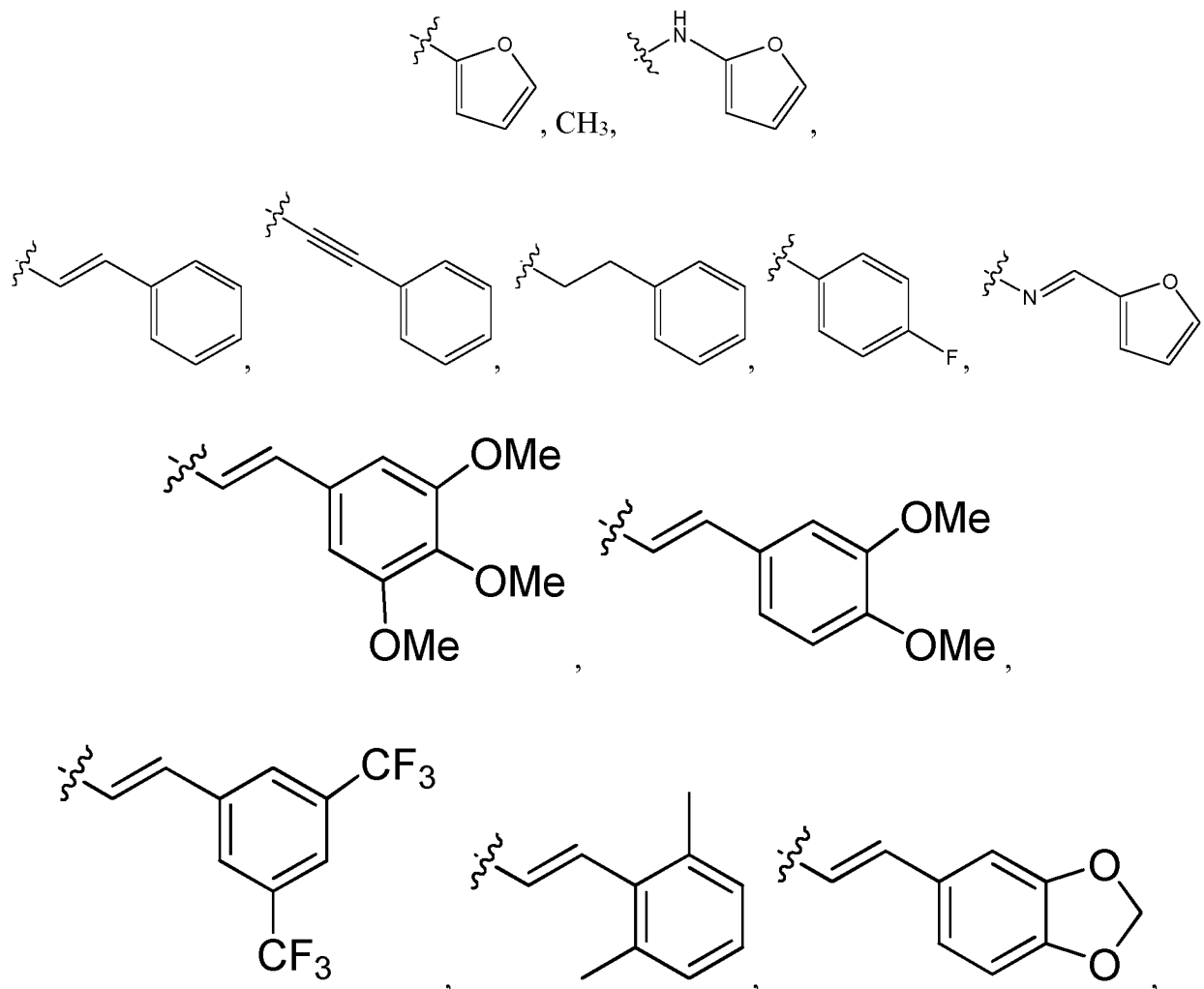


En algunos ejemplos de lo que se desvela, R1 es hidrógeno.

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R2 es un resto alquilo, un resto alquilenilo, un resto alquinilo, un resto aminoalquilo, un resto fenetilo, un resto estirilo, un resto feniletinilo, un resto halógeno o un resto (furan-2-ilmetil)amino.

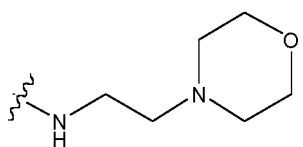
En algunos ejemplos de lo que se desvela, R2 se selecciona entre halógeno (por ejemplo, Cloro),

5



y

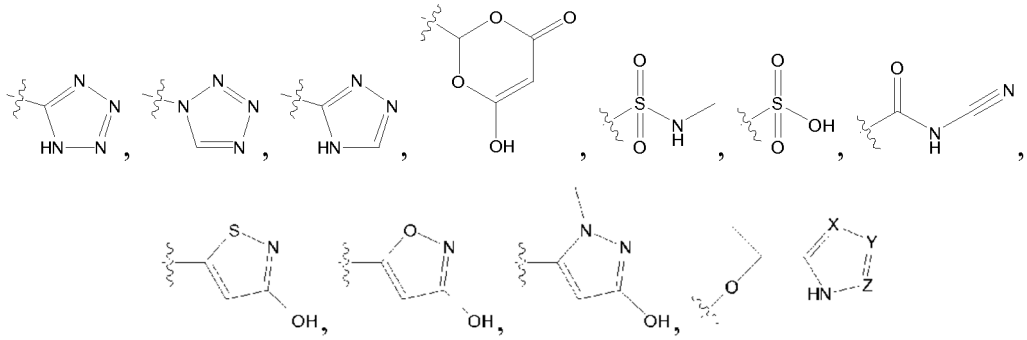
10



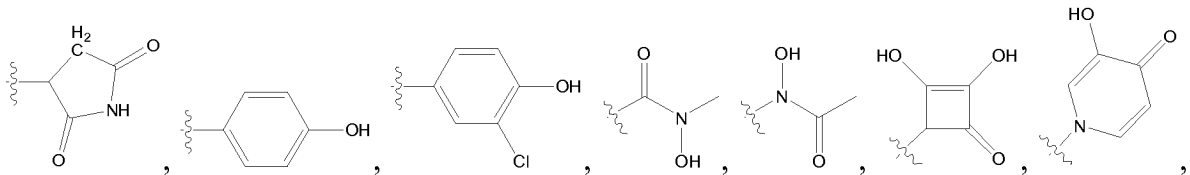
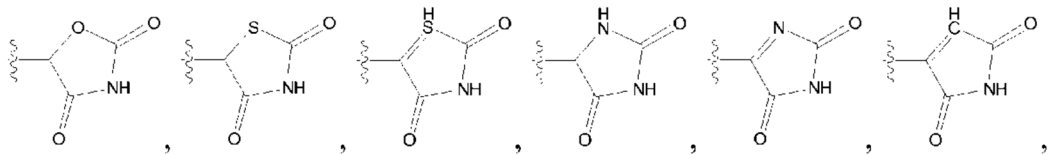
En algunos ejemplos de lo que se desvela, R2 es hidrógeno.

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es un resto ácido. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es un resto éster. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es hidrógeno. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es CH₃. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es OH. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 es un resto bioisómero de ácido carboxílico. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R3 se selecciona entre H, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, COOH, COOCH₃, COOCH₂CH₃,

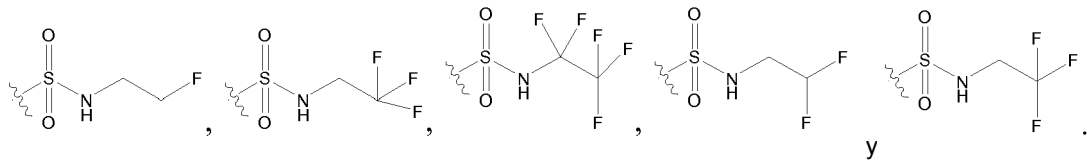
15



(en el que X, Y, Z son independientemente N, C o CO),

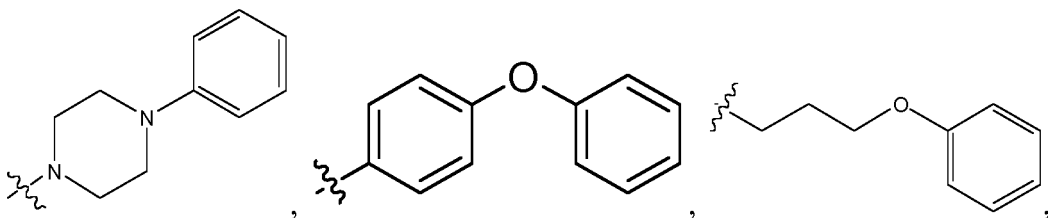
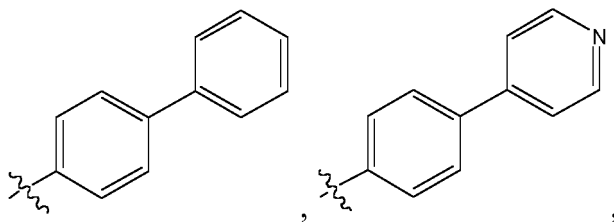


5

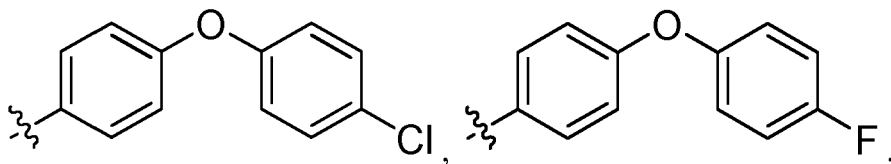


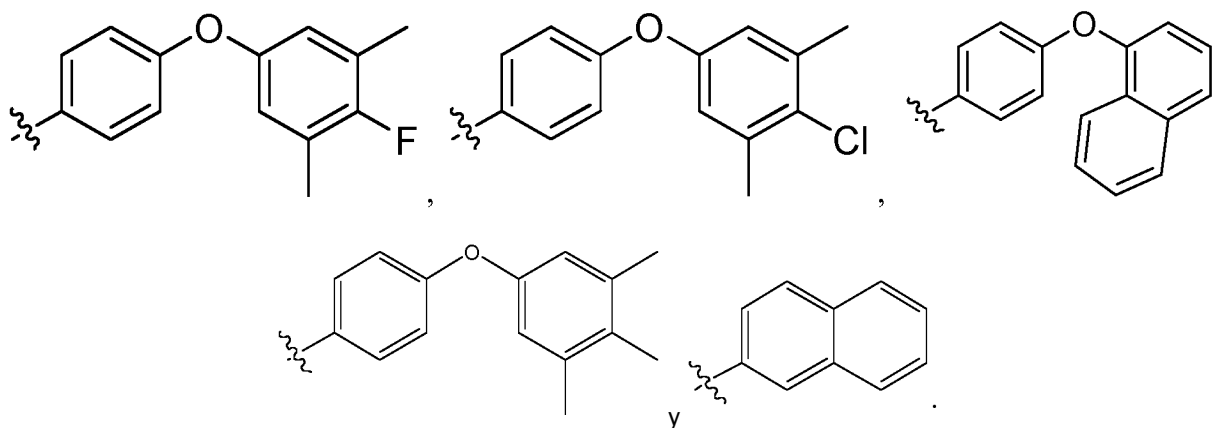
y

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R4 es un resto alquilo opcionalmente sustituido, un resto cicloalquilo, un resto arilo o un resto heterocíclico. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R4 se selecciona entre OH, hidrógeno,

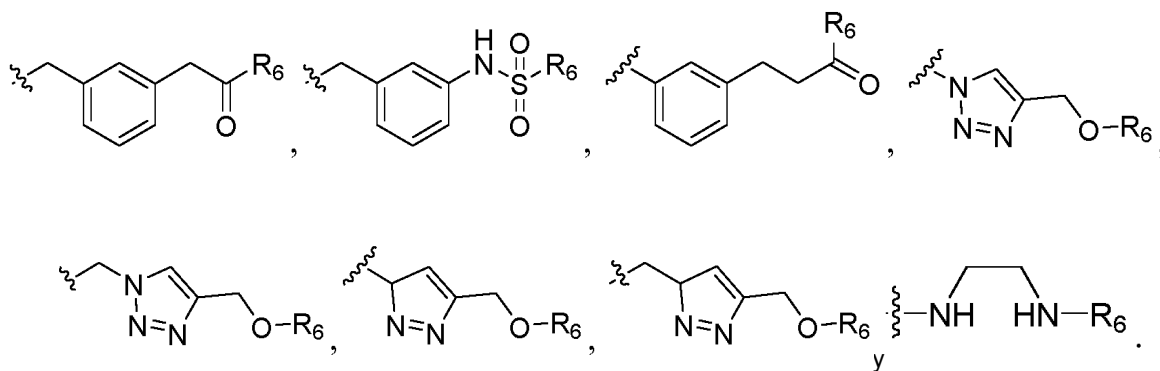


10



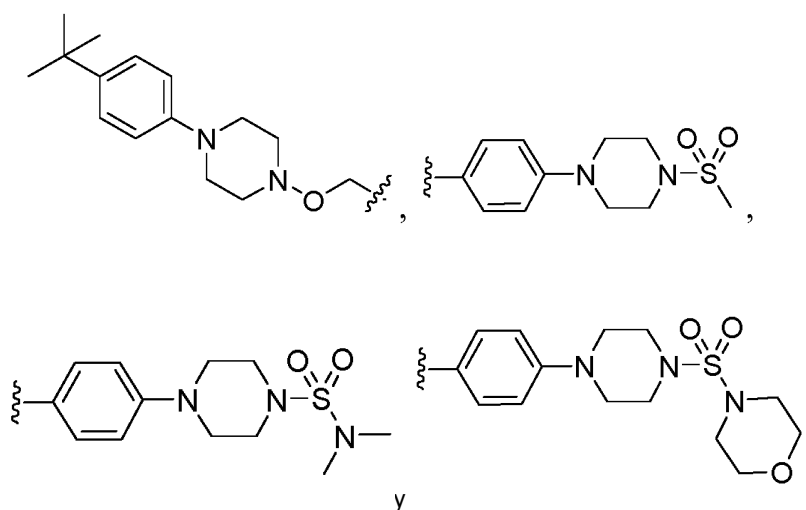


En algunos ejemplos de lo que se desvela, R5 se selecciona entre



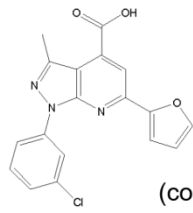
5

En algunos ejemplos de lo que se desvela, R6 está ausente. En algunos ejemplos de lo que se desvela, R6 se selecciona entre el grupo que consiste en

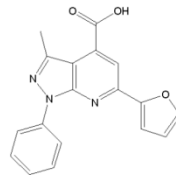


10 La Tabla 1 muestra las afinidades de unión (los valores de Cl_{50} se determinaron con un ensayo de unión de polarización de fluorescencia) para diversos compuestos abarcados e inhibición contra Mcl-1 dentro de las Fórmulas I, II, III o IV.

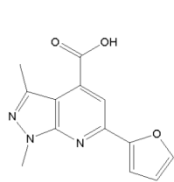
En algunos ejemplos de lo que se desvela, se contemplan los siguientes compuestos para las Fórmulas I, II, III o IV:



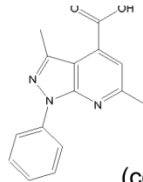
(compuesto 1),



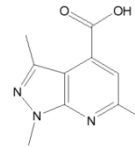
(compuesto 2),



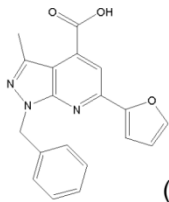
(compuesto 3),



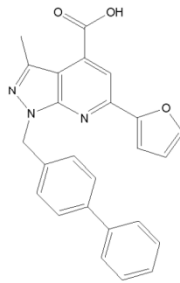
(compuesto 4),



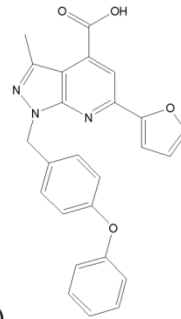
(compuesto 5),



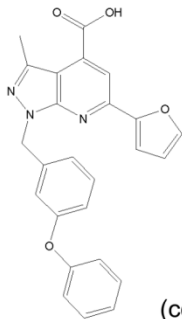
(compuesto 6),



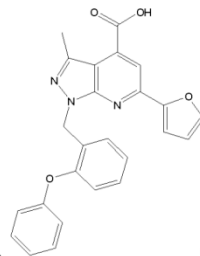
(compuesto 7),



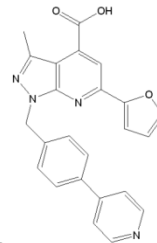
(compuesto 8),



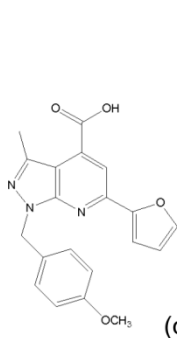
(compuesto 9),



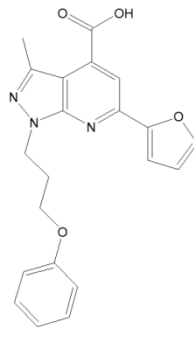
(compuesto 10),



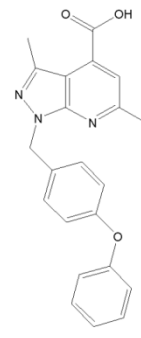
(compuesto 11),



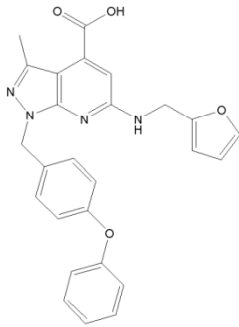
(compuesto 12),



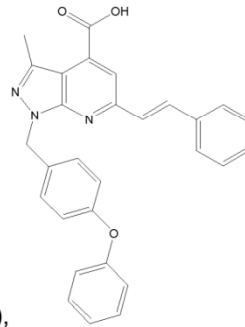
(compuesto 13),



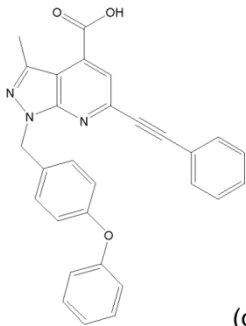
(compuesto 14)



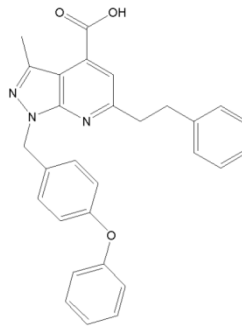
(compuesto 15),



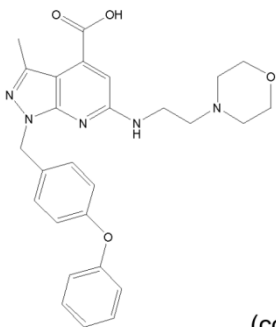
(compuesto 16),



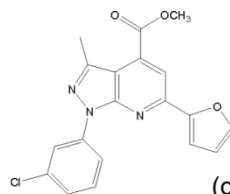
(compuesto 17),



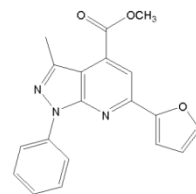
(compuesto 18),

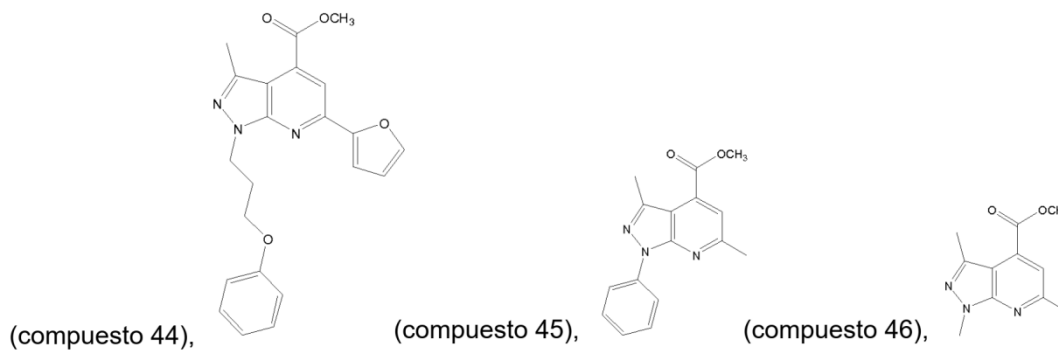
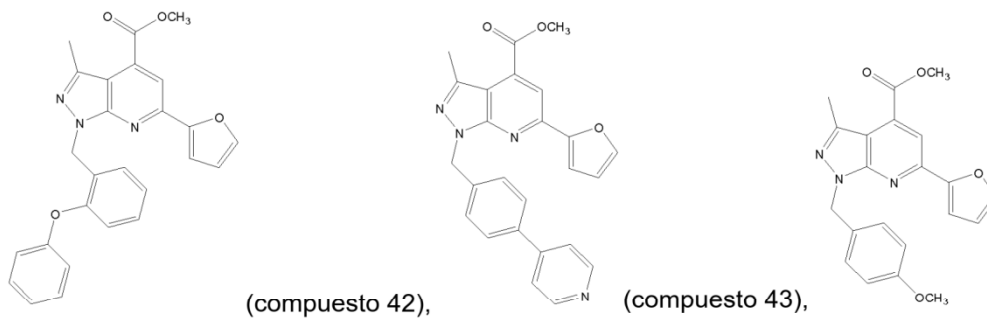
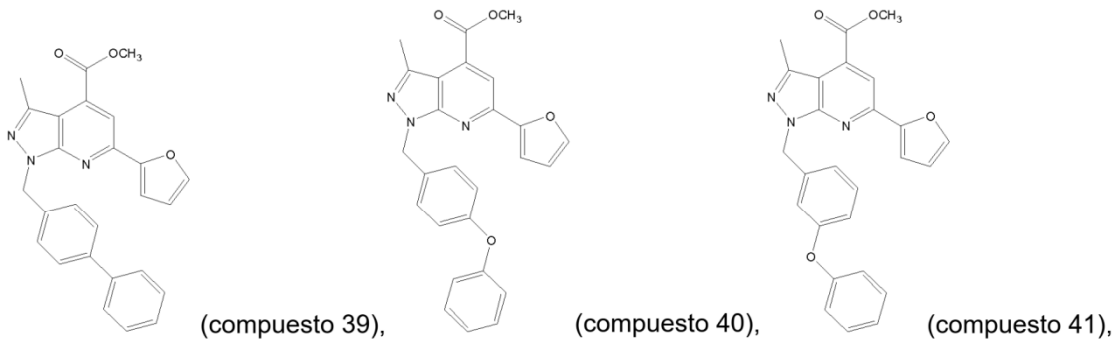
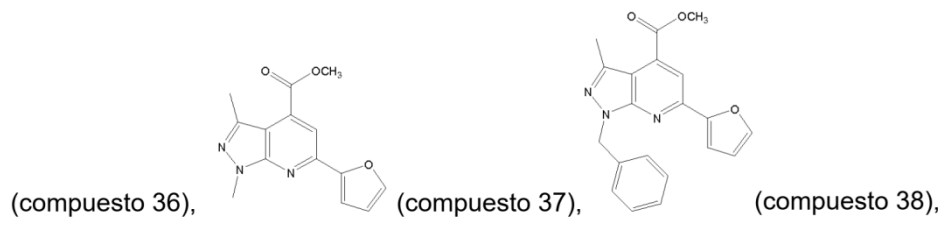


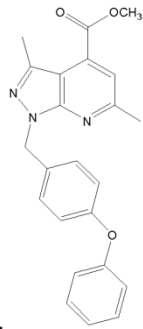
(compuesto 19),



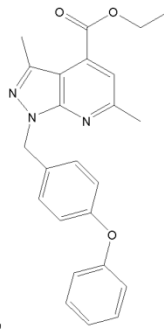
(compuesto 35),



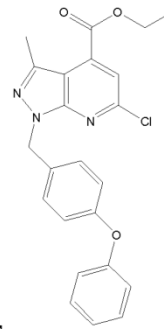




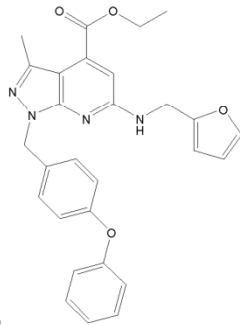
(compuesto 47),



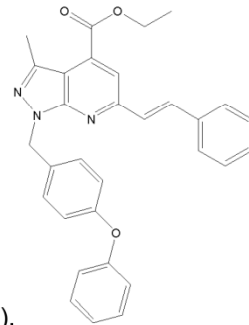
(compuesto 48),



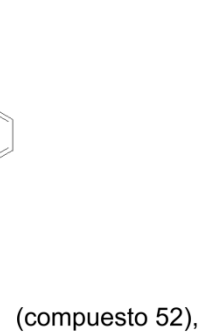
(compuesto 49),



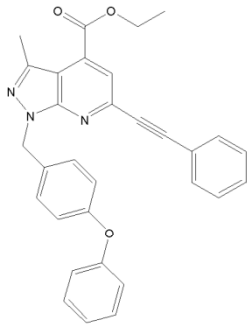
(compuesto 50),



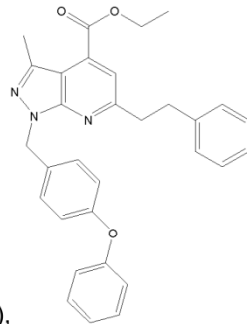
(compuesto 51),



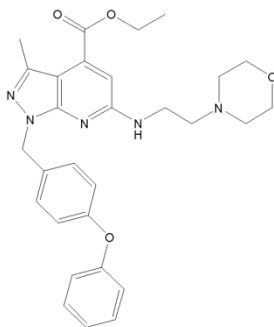
(compuesto 52),



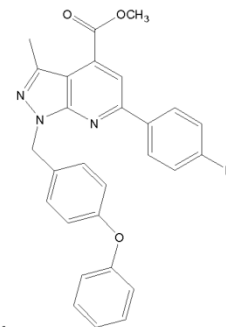
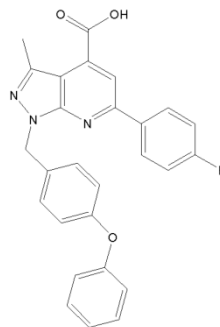
(compuesto 53),

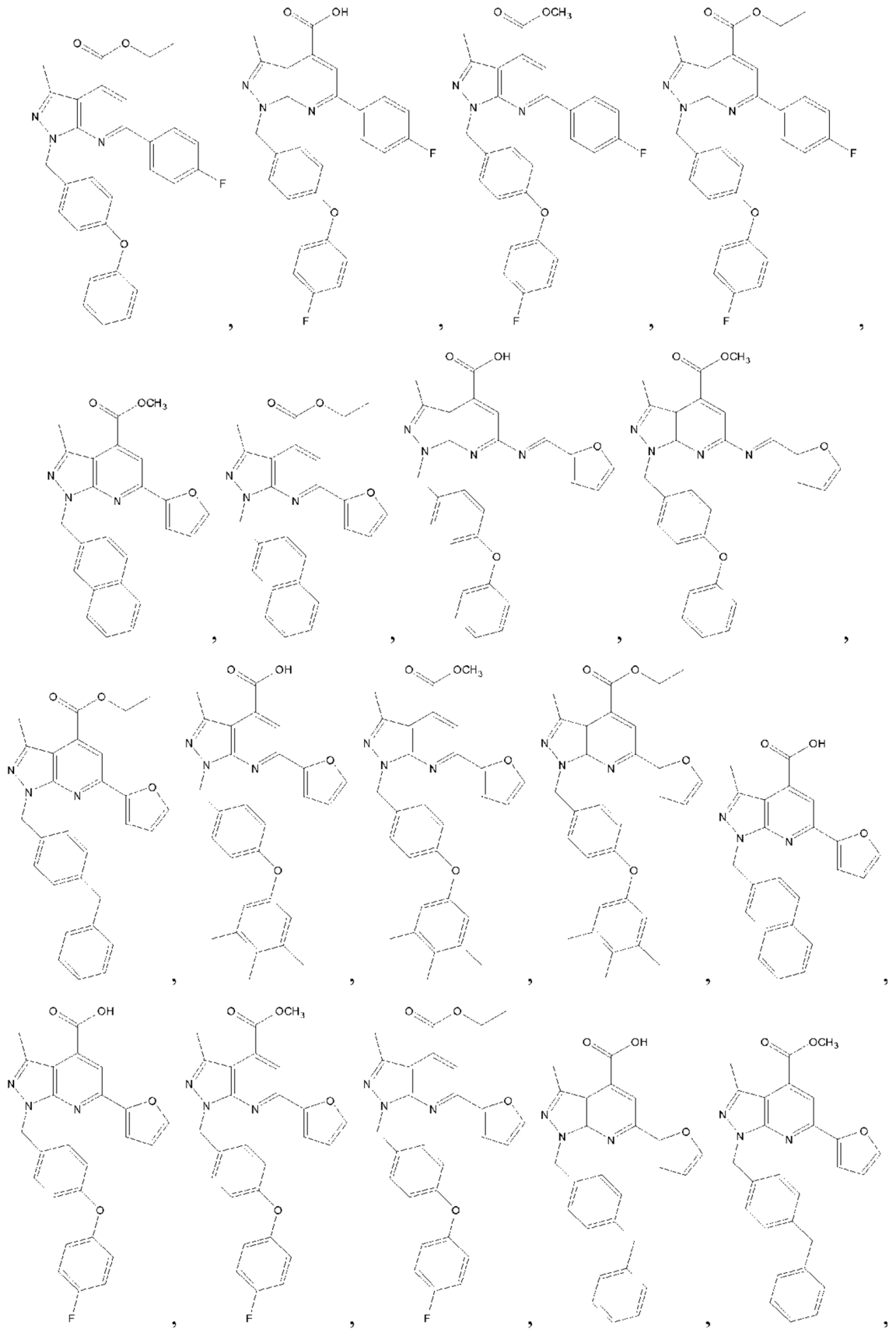


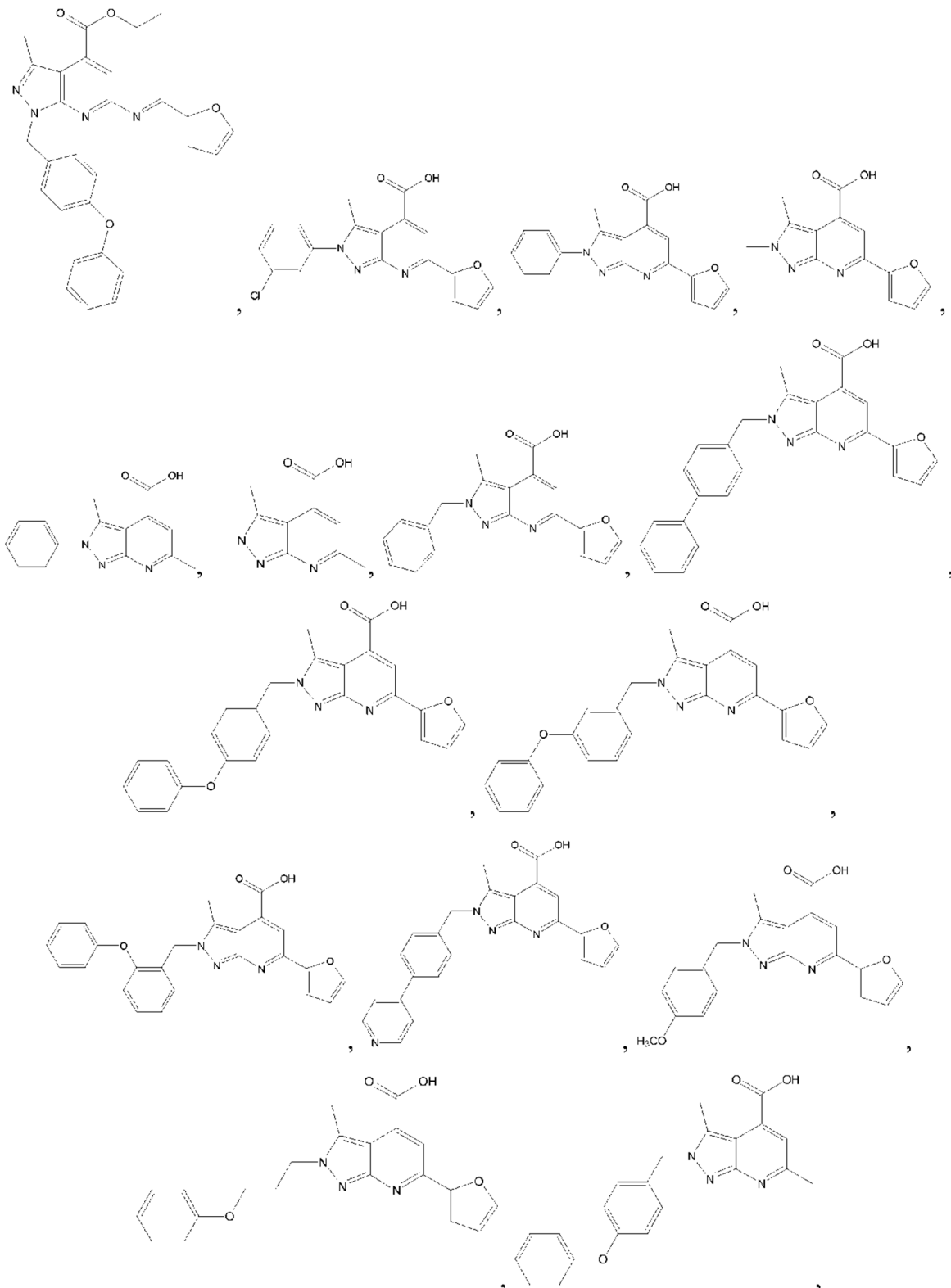
(compuesto 54),

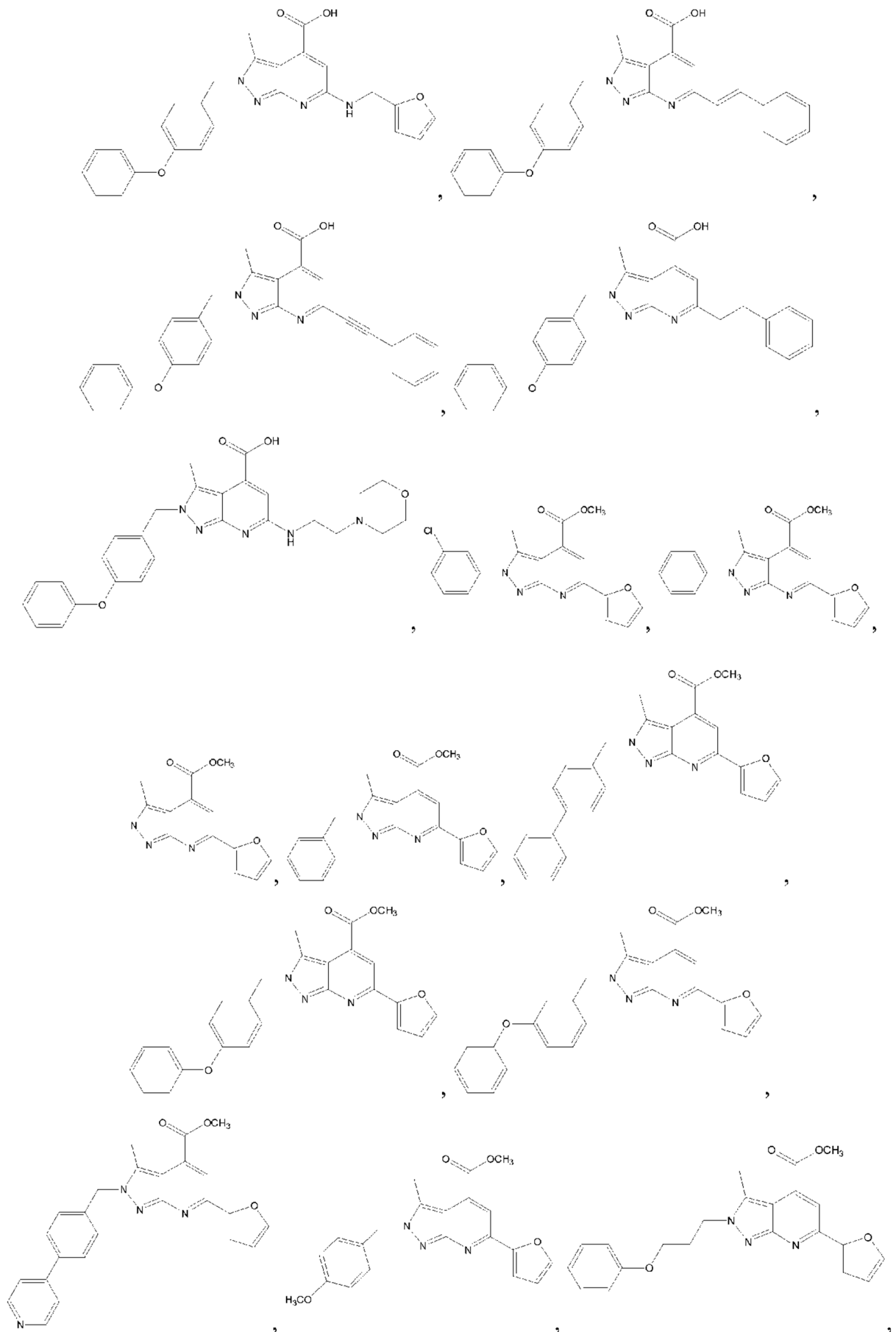


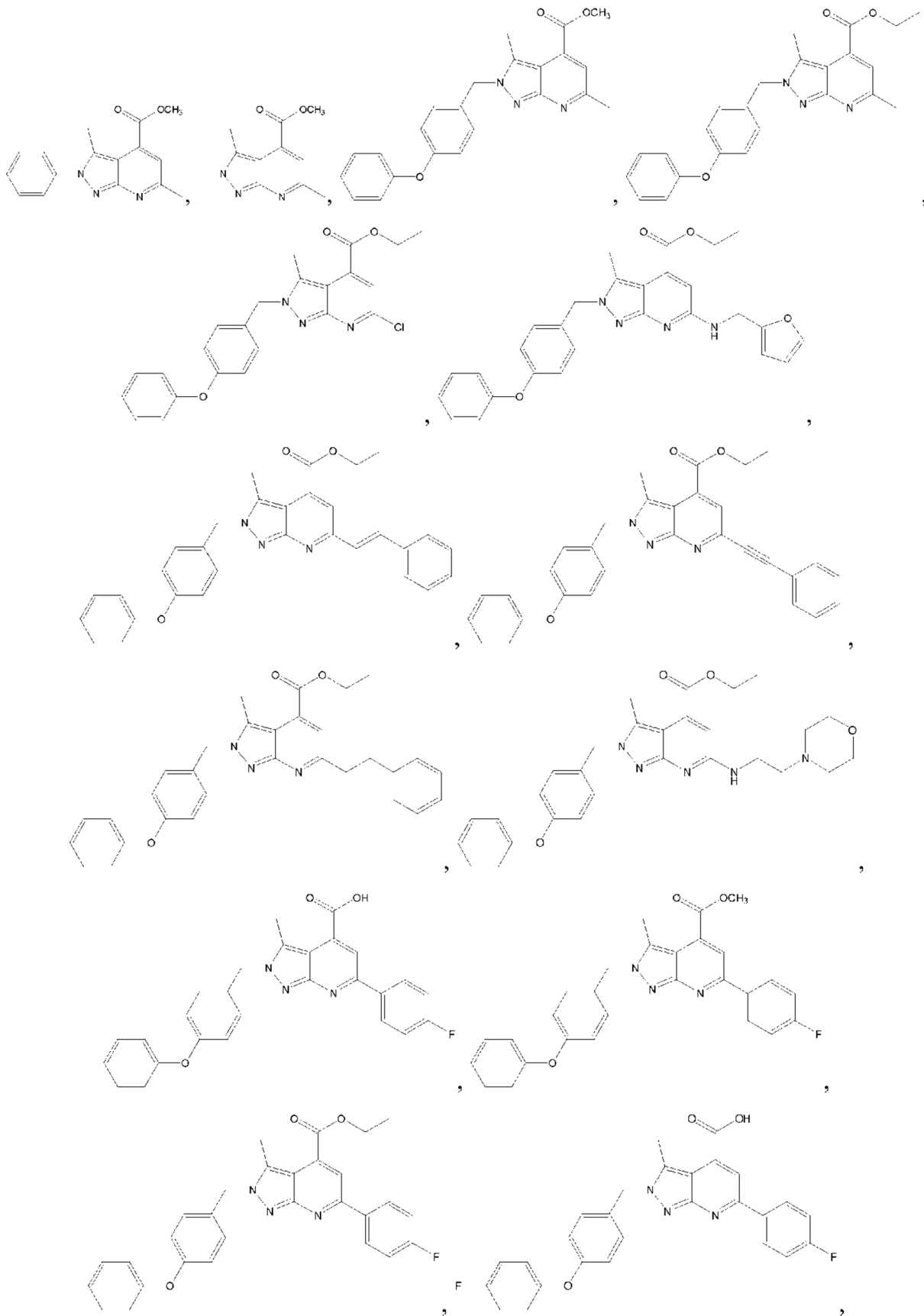
(compuesto 55),

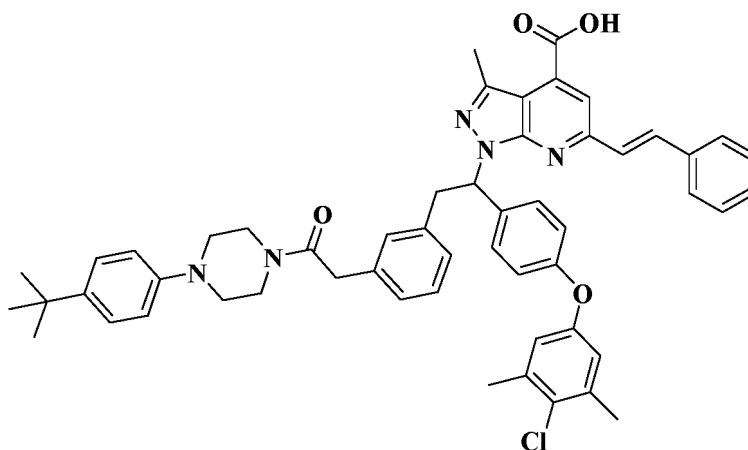
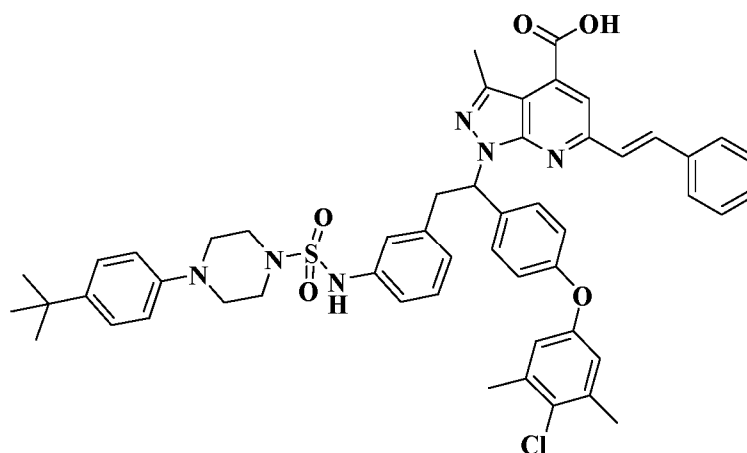












o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o profármaco del mismo.

5 Un aspecto importante de la presente invención es que los compuestos de la invención inducen la detención del ciclo celular y/o apoptosis, y también potencian la inducción de la detención del ciclo celular y/o apoptosis, ya sea solo o en respuesta a señales de inducción de apoptosis adicionales. Por tanto, se contempla que estos compuestos sensibilicen a las células a la inducción de la detención del ciclo celular y/o la apoptosis, incluyendo células que son resistentes a tales inductores. Los inhibidores de Mcl-1 de la presente invención (por ejemplo, compuestos de pirazolopiridina) pueden usarse para inducir apoptosis en cualquier trastorno que pueda tratarse, mejorarse o prevenirse mediante la inducción de apoptosis. En una realización, los inhibidores pueden usarse para inducir apoptosis en células que comprenden proteínas funcionales Mcl-1 y/o relacionadas con Mcl-1.

15 En algunos casos, las composiciones de la presente invención se usan para tratar células, tejidos, órganos enfermos o estados patológicos y/o estados de enfermedad en un animal (por ejemplo, un paciente mamífero, incluyendo, aunque no de forma limitativa, seres humanos y animales veterinarios). En este sentido, diversas enfermedades y patologías son susceptibles de tratamiento o profilaxis utilizando las presentes composiciones. Una lista de ejemplo no limitativa de estas enfermedades y afecciones incluye, aunque no de forma limitativa, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer de colon, melanoma, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, carcinoma primario de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, glioma, glioblastoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de cabeza o cuello, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma pulmonar, carcinoma de pulmón microcítico, tumor de Wilms, carcinoma del cuello uterino, carcinoma testicular, carcinoma de vejiga, carcinoma pancreático, carcinoma de estómago, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma genitourinario, carcinoma de tiroides, carcinoma esofágico, mieloma, mieloma múltiple, carcinoma suprarrenal, carcinoma de células renales, carcinoma endometrial, carcinoma de la corteza suprarrenal, insulinoma pancreático maligno, carcinoma carcinoide maligno, coriocarcinoma, micosis fungoide, hipercalcemia maligna, hiperplasia cervical, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia de células pilosas, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, policitemia vera, trombocitosis esencial, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma osteogénico, macroglobulinemia primaria y retinoblastoma, y similares, enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T y B; 25 enfermedades inflamatorias; infecciones; enfermedades hiperproliferativas; SIDA; afecciones degenerativas, 30

enfermedades vasculares, y similares. En algunas realizaciones, las células cancerosas que se tratan son metastásicas. En otros casos, las células cancerosas que se tratan son resistentes a los agentes anticancerosos. En otros casos, el trastorno es cualquier trastorno que tiene células que tienen proteína Mcl-1 y/o expresión de proteína relacionada con Mcl-1.

5 La presente divulgación proporciona procedimientos para administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y al menos un agente terapéutico adicional (que incluye, aunque no de forma limitativa, antineoplásicos quimioterapéuticos, agentes moduladores de la apoptosis, antimicrobianos, antivíricos, antifúngicos y agentes antiinflamatorios) y/o técnica terapéutica (por ejemplo, intervención quirúrgica y/o radioterapias). En un ejemplo particular, el agente o agentes terapéuticos adicionales es un agente anticanceroso.

10 Se contempla una serie de agentes anticancerosos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente divulgación. De hecho, la presente divulgación contempla, aunque no de forma limitativa, la administración de numerosos agentes anticancerosos, tales como: agentes que inducen apoptosis; polinucleótidos (por ejemplo, antisentido, ribozimas, ARNip); polipéptidos (por ejemplo, enzimas y anticuerpos); miméticos biológicos; alcaloides; agentes alquilantes; antibióticos antitumorales; antimetabolitos; hormonas; compuestos de platino; anticuerpos monoclonales o policlonales (por ejemplo, anticuerpos conjugados con fármacos contra el cáncer, toxinas, defensinas),
15 toxinas; radionúclidos; modificadores de respuesta biológica (por ejemplo, interferones (por ejemplo, IFN- α) e interleucinas (por ejemplo, IL-2)); agentes de inmunoterapia adoptiva; factores de crecimiento hematopoyéticos; agentes que inducen la diferenciación de células tumorales (por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico); reactivos de terapia génica (por ejemplo, reactivos de terapia antisentido y nucleótidos); vacunas tumorales; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores del proteosoma: moduladores de NF-KB; compuestos anti-CDK; inhibidores de HDAC; y
20 similares. Los expertos en la técnica conocen otros numerosos ejemplos de compuestos quimioterapéuticos y terapias anticancerosas adecuados para la administración conjunta con los compuestos desvelados.

En ciertas realizaciones, los agentes anticancerosos comprenden agentes que inducen o estimulan la apoptosis. Los agentes que inducen la apoptosis incluyen, aunque no de forma limitativa, radiación (por ejemplo, rayos X, rayos
25 gamma, UV); factores relacionados con el factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, proteínas receptoras de la familia del TNF, ligandos de la familia del TNF, TRAIL, anticuerpos contra TRAIL-R1 o TRAIL-R2); inhibidores de la quinasa (por ejemplo, inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento vascular (VGFR), inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) e inhibidores de la Bcr-Abl quinasa (tales como GLEEVEC)); moléculas antisentido; anticuerpos (por ejemplo, HERCEPTIN, RITUXAN, ZEVALIN y AVASTIN); antiestrógenos (por ejemplo, raloxifeno y tamoxifeno); antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, finasterida, aminoglutetamida, ketoconazol y corticosteroides);
30 inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (por ejemplo, celecoxib, meloxicam, NS-398 y antiinflamatorios no esteroideos (AINE)); fármacos antiinflamatorios (por ejemplo, butazolidina, DECADRON, DELTASONE, dexametasona, dexametasona intensol, DEXONE, HEXADROL, hidroxycloquinina, METICORTEN, ORADEXON, ORASONE, oxifenbutazona, PEDIAPRED, fenilbutazona, PLAQUENIL, prednisolona, prednisona, PRELONE y TANDEARIL); y fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer (por ejemplo, irinotecán (CAMPTOSAR), CPT-11, fludarabina (FLUDARA), dacarbazina (DTIC), dexametasona, mitoxantrona, MY- LOTARG, VP-16, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, 5-FU, doxorubicina, gemcitabina, bortezomib, gefitinib, bevacizumab, TAXOTERE o
40 TAXOL); moléculas de señalización celular; ceramidas y citocinas; estaurosporina y similares.

En otras realizaciones más, las composiciones de la presente invención proporcionan un compuesto de la invención y al menos un agente anti-hiperproliferativo o antineoplásico seleccionado de agentes alquilantes, antimetabolitos y productos naturales (por ejemplo, hierbas y otros compuestos derivados de plantas y/o animales).

Los agentes alquilantes adecuados para su uso en las presentes composiciones y procedimientos incluyen, pero sin limitación: 1) mostazas de nitrógeno (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina); y clorambucilo); 2) etileniminas y metilmelaminas (por ejemplo, hexametilmelamina y tiotepa); 3) sulfonatos de alquilo (por ejemplo, busulfán); 4) nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU); lomustina (CCNU); semustina (metil-CCNU); y estreptozocina (estreptozotocina)); y 5) triazenos (por ejemplo, dacarbazina (DTIC); dimetiltriazenoimidazolcarboxamida).

50 En algunas realizaciones, los antimetabolitos adecuados para su uso en las presentes composiciones incluyen, pero sin limitación: 1) análogos de ácido fólico (por ejemplo, metotrexato (ametopterina)); 2) análogos de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FudR) y citarabina (arabinósido de citosina)); y 3) análogos de purinas (por ejemplo, mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina)).

55 En otras realizaciones adicionales, los agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación: 1) alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina (VLB), vincristina); 2) epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido y tenipósido); 3) antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C)); 4) enzimas (por ejemplo, L-asparaginasa); 5) modificadores de respuesta biológica (por ejemplo, interferón alfa); 6) complejos de coordinación de platino (por ejemplo, cisplatino (cis-DDP) y carboplatino); 7)
60

antracénodionas (por ejemplo, mitoxantrona); 8) ureas sustituidas (por ejemplo, hidroxiaurea); 9) derivados de metilhidrazina (por ejemplo, procarbazona (N-metilhidrazina; MIH)); 10) supresores adrenocorticales (por ejemplo, mitotano (o, p'-DDD) y aminoglutetimida); 11) adrenocorticosteroides (por ejemplo, prednisona); 12) progestágenos (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol); 13) estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol y etinilestradiol); 14) antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno); 15) andrógenos (por ejemplo, propionato de testosterona y fluoximesterona); 16) antiandrógenos (por ejemplo, flutamida); y 17) análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (por ejemplo, leuprolida).

Cualquier agente oncolítico que se usa habitualmente en un contexto de terapia contra el cáncer encuentra uso en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, la U.S. Food and Drug Administration mantiene un formulario de agentes oncolíticos aprobados para su uso en Estados Unidos. Agencias internacionales homólogas a la U.S.F.D.A. mantienen formularios similares. La Tabla 2 proporciona una lista de agentes antineoplásicos de ejemplo aprobados para su uso en Estados Unidos. Los expertos en la técnica apreciarán que los "marcadores de producto" requeridas en todos los quimioterapéuticos aprobados en Estados Unidos describen indicaciones aprobadas, información de la dosificación, datos de toxicidad y similares, para los agentes de ejemplo.

Tabla 2

Aldesleukin (des-alanil-1, serina-125 interleucina-2 humana)	Proleukin	Chiron Corp., Emeryville, CA
Alemtuzumab (anticuerpo IgG1k anti CD52)	Campath	Millennium and ILEX Partners, LP, Cambridge, MA
Alitretinoína (ácido 9-cis-retinoico)	Panretin	Ligand Pharmaceuticals, Inc., San Diego CA
Alopurinol (sal monosódica de 1,5-dihidro-4H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-ona)	Zyloprim	GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC
Altretamina (N,N,N',N',N'',-hexametil-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)	Hexalen	US Bioscience, West Conshohocken, PA
Amifostina (etanotiol, 2-[(3-aminopropil)amino]-, dihidrógeno fosfato (éster))	Ethylol	US Bioscience
Anastrozol (1,3-Bencenodiacetonitrilo, a, a', a'-tetrametil-5-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil))	Arimidex	AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE
tríóxido de arsénico	Trisenox	Cell Therapeutic, Inc., Seattle, WA
Asparaginasa (L-asparagina amidohidrolasa, tipo EC-2)	Elspar	Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
BCG vivos (preparación liofilizada de una cepa atenuada de <i>Mycobacterium bovis</i> (Bacilo de Calmette-Gukin [BCG], subcepa Montreal)	TICE BCG	Organon Teknika, Corp., Durham, NC
cápsulas de bexaroteno (ácido 4-[1-(5,6,7,8-tetrahidro-3,5,5,8,8-pentametil-2-naftalenil)etenil]benzoico)	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
gel de bexaroteno	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
Bleomicina (antibióticos glucopéptidos citotóxicos producidos por <i>Streptomyces verticillus</i> ; bleomicina A ₂ y bleomicina B ₂)	Blenoxano	Bristol-Myers Squibb Co., NY, NY
Capecitabina (5'-desoxi-5-fluoro-N-[(pentiloxi)carbonil]-citidina)	Xeloda	Roche
Carboplatino (platino, diamina [1,1-ciclobutanodicarboxilato (2-)-0,0']-, (SP-4-2))	Paraplatino	Bristol-Myers Squibb
Carmustina (1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea)	BCNU, BiCNU	Bristol-Myers Squibb
Implante de carmustina con polifeprosan 20	Gliadel Wafer	Guilford Pharmaceuticals, Inc., Baltimore, MD
Celecoxib (como 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida)	Celebrex	Searle Pharmaceuticals, Inglaterra
Clorambucilo (ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]bencenobutanoico)	Leukeran	GlaxoSmithKline
Cisplatino (PtCl ₂ H ₆ N ₂)	Platinol	Bristol-Myers Squibb

(continuación)

Cladribina (2-cloro-2'-desoxi-b-D-adenosina)	Leustatina, 2-CdA	R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, Raritan, NJ
Ciclofosfamida (2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-13,2-oxazafosforina 2-óxido monohidrato)	Cytoxan, Neosar	Bristol-Myers Squibb
Citarabina(1-b-D-Arabinofuranosilcitosina, C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅)	Cytosar-U	Pharmacia & Upjohn Company
citarabina liposomal	DepoCyt	Skye Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA
Dacarbazina (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida (DTIC))	DTIC-Dome	Bayer AG, Leverkusen, Alemania
Dactinomicina, actinomicina D (actinomicina producida por <i>Streptomyces parvullus</i> , C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆)	Cosmegen	Merck
Darbeopetina alfa (péptido recombinante)	Aranesp	Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA
daunorubicina liposomal ((8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-à-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacendiona clorhidrato)	DanuoXome	Nexstar Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO
daunorubicina HCl, daunomicina (clorhidrato de (1S,3S)-3-acetil-1,2,3,4,6,11-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-10-metoxi-6,11-dioxo-1-naftaceniil 3-amino-2,3,6-tridesoxi-(alfa)-L-lixo-hexopiranosido)	Cerubidina	Wyeth Ayerst, Madison, NJ
Denileukina difitox (péptido recombinante)	Ontak	Seragen, Inc., Hopkinton, MA
Dexrazoxana ((S)-4,4'-(1-metil-1,2-etanodiol)bis-2,6-piperazindiona)	Zinecard	Pharmacia & Upjohn Company
Docetaxel ((2R,3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, Éster N-terc-butílico, 13-éster con 5b-20-epoxi-12a,4,7b,10b,13a-hexahidroxitax-11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, trihidrato)	Taxotere	Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
Doxorubicina HCl (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-a-L-lixohexopiranosil)oxi]-8-glicolil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacendiona clorhidrato)	adriamicina, Rubex	Pharmacia & Upjohn Company
doxorubicina	Adriamicina en inyección intravenosa PFS	Pharmacia & Upjohn Company
doxorubicina liposomal	Doxil	Sequus Pharmaceuticals, Inc., Menlo Park, CA
propionato de dromostanolona (17b-Hidroxi-2a-metil-5a-androstan-3-ona propionato)	Dromostanolona	Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN
propionato de dromostanolona	Inyección de Masterone	Syntex, Corp., Palo Alto, CA
Solución B de Elliott	Solución B de Elliott	Orphan Medical, Inc
Epirubicina ((8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-a-L-arabinohexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacendiona clorhidrato)	Ellence	Pharmacia & Upjohn Company
Epoetina alfa (péptido recombinante)	Epogen	Amgen, Inc
Estramustina (estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol(17(beta))-, 3-[bis(2-cloroetil)carbamato]17-(dihidrógeno fosfato), sal disódica, monohidrato o estradiol 3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(dihidrógeno fosfato), sal disódica, monohidrato)	Emcyt	Pharmacia & Upjohn Company
Etopósido fosfato (4'-Demetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-(beta)-D-glucopiranosido], 4'-(dihidrógeno fosfato))	Etopofos	Bristol-Myers Squibb
etopósido, VP-16 (4'-desmetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-(beta)-D-glucopiranosido])	Vepesid	Bristol-Myers Squibb
Exemestano (6-metilenandrosta-1,4-dieno-3,17-diona)	Aromasin	Pharmacia & Upjohn Company
Filgrastim (r-metHuG-CSF)	Neupogen	Amgen, Inc
floxuridina (intraarterial) (2'-desoxi-5-fluorouridina)	FUDR	Roche
Fludarabina (análogo nucleotídico fluorado del agente antiviral vidarabina, 9-b-D-arabinofuranosiladenina (ara-A))	Fludara	Berlex Laboratories, Inc., Cedar Knolls, NJ

(continuación)

Fluorouracilo, 5-FU (5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidindiona)	Adrucil	ISIS Pharmaceuticals, Inc., Humacao, Puerto Rico
Fulvestrant (7-alfa-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentilsulfinil)nonil]estra-1,3,5-(10)-trieno-3,17-beta-diol)	Faslodex	IPR Pharmaceuticals, Guayama, Puerto Rico
Gemcitabina (monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero b))	Gemzar	Eli Lilly
Gemtuzumab Ozogamicina (anti-CD33 hP67.6)	Mylotarg	Wyeth Ayerst
Acetato de goserelina	Implante de Zoladex	AstraZeneca Pharmaceuticals
Hidroxiurea	Hydrea	Bristol-Myers Squibb
Ibritumomab Tiuxetán (inmunoconjugado resultante de un enlace covalente de tiourea entre el anticuerpo monoclonal ibritumomab y el enlazador-quelante tiuxetán [N-[2-bis (carboximetil)amino]-3-(p-isotiocianatofenil)-propil]-N-[2-bis(carboximetil)amino]2-(metil)-etil]glicina)	Zevalin	Biogen IDEC, Inc., Cambridge MA
Idarubicina (5, 12-naftaceno-diona, 9-acetil-7-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-(alfa)-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,9,11-trihidroxiclorhidrato, (7S-cis))	Idamicina	Pharmacia & Upjohn Company
Ifosfamida (3-(2-cloroetil)-2-[(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H1-1,3,2-oxazafosforina 2-óxido)	IFEX	Bristol-Myers Squibb
Mesilato de imatinib (4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida metanosulfonato)	Gleevec	Novartis AG, Basilea, Suiza
Interferón alfa-2a (péptido recombinante)	Roferon-A	Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ
Interferón alfa-2b (péptido recombinante)	Intrón A (Betaserón liofilizado)	Schering AG, Berlín, Alemania
Irinotecán HCl ((4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidinopiperidino)carboniloxi]-1H-pirano[3',4': 6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H, 12H)diona clorhidrato, trihidrato)	Camptosar	Pharmacia & Upjohn Company
Letrozol (4,4'-(1H-1,2,4-Triazol-1-ilmetil)enedi)benzoniitrilo)	Femara	Novartis
Leucovorina (ácido L-Glutámico, N[4]([(2-amino-5-formil-1,4,5,6,7,8,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]amino)benzoil], sal de calcio (1:1))	Wellcovorina, Leucovorina	Immunex, Corp., Seattle, WA
Levamisol HCl((-)-(S)-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazo[2,1-b]tiazol monoclorhidrato C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S·HCl)	Ergamisol	Janssen Research Foundation, Titusville, NJ
Lomustina (1-(2-cloro-etil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea)	CeeNU	Bristol-Myers Squibb
Mecloretamina, mostaza de nitrógeno (2-cloro-N-(2-cloroetil)-N-metiletanamina clorhidrato)	Mustargen	Merck
Acetato de megestrol 17α (acetiloxi)-6-metilpregna-4,6-dieno-3,20-diona	Megace	Bristol-Myers Squibb
Melfalán, L-PAM (4-[bis(2-cloroetil)amino]-L-fenilalanina)	Alkeran	GlaxoSmithKline
Mercaptopurina, 6-MP (1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona monohidrato)	Purineto	GlaxoSmithKline
Mesna (2-mercaptoetano sulfonato de sodio)	Mesnex	Asta Medica
Metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico)	Metotrexato	Lederle Laboratories
Metoxsalen (9-metoxi-7H-furo[3,2-g][1]-benzopirano-7-ona)	Uvadex	Therakos, Inc., Way Exton, Pa
Mitomicina C	Mutamicina	Bristol-Myers Squibb
mitomicina C	Mitozytrex	SuperGen, Inc., Dublín, CA
Mitotano (1,1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano)	Lysodren	Bristol-Myers Squibb
Mitoxantrona (1,4-dihidroxi-5,8-bis[[2-[(2-hidroxietil)amino]etil]amino]-9,10-antraceno-diona diclorhidrato)	Novantrona	Immunex Corporation
Fenpropionato de nandrolona	Durabolin-50	Organon, Inc., West Orange, NJ
Nofetumomab	Verluma	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Alemania
Oprelvekina (IL-11)	Neumega	Genetics Institute, Inc., Alexandria, VA
Oxaliplatino (cis-[(1R,2R)-1,2-ciclohexanodiamina-N,N'][(oxalato(2-)-O,O')]platino)	Eloxatina	Sanofi Synthelabo, Inc., NY, NY

(continuación)

Paclitaxel (5 β , 20-Epoxi-1,2a, 4,7 β , 10 β , 13a-hexahidroxitax-11-es-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R, 3 S)-N-benzoil-3-fenilisoserina)	TAXOL	Bristol-Myers Squibb
Pamidronato (ácido fosfórico (3-amino-1-hidroxiopropiliden) bis-, sal disódica, pentahidrato, (APD))	Aredia	Novartis
Pegademasa ((monometoxipolietilenglicol succinimidil) 11-17-adenosina desaminasa)	Adagen (Pegademasa bovina)	Enzon Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
Pegaspargasa (monometoxipolietilenglicol succinimidil L-asparaginasa)	Oncaspar	Enzon
Pegfilgrastim (conjugado covalente de G-CSF humano metionil recombinante (Filgrastim) y monometoxipolietilenglicol)	Neulasta	Amgen, Inc
Pentostatina	Nipent	Parke-Davis Pharmaceutical Co., Rockville, MD
Pipo broman	Vercyte	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL
Plicamicina, Mitramicina (antibiótico producido por <i>Streptomyces plicatus</i>)	Mitracina	Pfizer, Inc., NY, NY
Porfimer de sodio	Fotofrina	QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, Canadá
Procarbazina (N-isopropil- μ -(2-metilhidrazino)-p-toluamida monoclóhidrato)	Matulano	Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc., Gaithersburg, MD
Quinacrina (6-cloro-9-(1-metil-4-dietilamina)butilamino-2-metoxiacridina)	Atabrina	Abbott Labs
Rasburicasa (péptido recombinante)	Elitek	Sanofi Synthelabo, Inc.,
Rituximab (anticuerpo anti-CD20 recombinante)	Rituxan	Genentech, Inc., South San Francisco, CA
Sargramostim (péptido recombinante)	Prokina	Immunex Corp
Estreptozocina (estreptozocin-2-desoxi-2-[[[metilnitrosoamino]carbonil]amino]-a (y b)-D-glucopiranososa y 220 mg de ácido cítrico anhidro)	Zanosar	Pharmacia & Upjohn Company
Talco (Mg ₃ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂)	Esclerosol	Bryan, Corp., Woburn, MA
Tamoxifeno ((Z) 2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxilato (1:1))	Nolvadex	AstraZeneca Pharmaceuticals
Temozolomida (3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d]-as-tetrazina-8-carboxamida)	Temodar	Schering
tenipósido, VM-26 4'-desmetilepipodofilotoxina 9-[4,6-0-(R)-2-etiliden-(beta)-D-glucopiranósido]	Vumon	Bristol-Myers Squibb
Testolactona (ácido 13-hidroxi-3-oxo-13,17-secoandrosta-1,4-dien-17-oico [dgr]-lactona)	Teslac	Bristol-Myers Squibb
Tioguanina, 6-TG (2-amino-1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona)	Tioguanina	GlaxoSmithKline
Tiotepa (aziridina, 1,1',1"-fosfinotioidinetris- o sulfuro de Tris(1-aziridinil) fosfina)	Thioplex	Immunex Corporation
Topotecán HCl ((S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3', 4': 6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14-(4H, 12H)-diona monoclóhidrato)	Hycamtin	GlaxoSmithKline
Toremifeno (2-(p-[(Z)-4-cloro-1,2-difenil-1-butenil]-fenoxi)-N,N-dimetiletanamina citrato (1:1))	Fareston	Roberts Pharmaceutical Corp., Eatontown, NJ
Tositumomab, I 131 Tositumomab (IgG _{2a} monoclonal inmunoterapéutico murino recombinante lambda anticuerpo anti-CD20 (I 131 es un anticuerpo radioinmunoterapéutico))	Bexxar	Corixa Corp., Seattle, WA
Trastuzumab (anticuerpo anti-HER2 IgG ₁ kappa monoclonal recombinante)	Herceptin	Genentech, Inc
Tretinoína, ATRA (ácido todo-trans retinoico)	Vesanoid	Roche

(continuación)

Mostaza de uracilo	Cápsulas de mostaza de uracilo	Roberts Labs
Valrubicina, N-trifluoroacetiladriamicin-14-valerato ((2S-cis)-2-[1,2,3,4,6,11-hexahidro-2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-6,11-dioxo-[[4,2,3,6-tridesoxi-3-[(trifluoroacetil)-amino-a-L-lixohexopiranosil]oxil]-2-naftaceniil]-2-oxoetil)pentanoato)	Valstar	Anthra --> Medeva
Vinblastina, Leurocristina (C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀ •H ₂ SO ₄)	Velban	Eli Lilly
Vincristina (C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀ •H ₂ SO ₄)	Oncovin	Eli Lilly
Vinorelbina (3',4'-dihidro-4'-desoxi-C'-norvincalucoblastina [(R*, R*)- 2,3-dihidroxi-butanodioato (1:2)(sal)])	Navelbina	GlaxoSmithKline
Zoledronato, Ácido zoledrónico (ácido (1-hidroxi-2-imidazol-1-il-fosfonoetil)fosfónico monohidrato)	Zometa	Novartis

Los agentes anticancerosos incluyen además compuestos que se ha identificado que tienen actividad anticancerosa. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, 3-AP, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, 17AAG, 852A, ABI-007, ABR-217620, ABT- 751, ADI-PEG 20, AE-941, AG-013736, AGRO100, alanosina, AMG 706, anticuerpo G250, antineoplastones, AP23573, apaziquona, APC8015, atiprimod, ATN-161, atrasenten, azacitidina, BB-10901, BCX-1777, bevacizumab, BG00001, bicalutamida, BMS 247550, bortezomib, briostatina-1, buserelina, calcitriol, CCI-779, CDB-2914, cefixima, cetuximab, CG0070, cilengtida, clofarabina, combretastatina A4 fosfato, CP-675.206, CP-724.714, CpG 7909, curcumina, decitabina, DENSPM, doxercalciferol, E7070, E7389, ecteinascidina 743, efaproxiral, eflomitina, EKB-569, enzastaurina, erlotinib, exisulind, fenretinida, flavopiridol, fludarabina, flutamida, fotemustina, FR901228, G17DT, galiximab, gefitinib, genisteína, glufosfamida, GTI-2040, histrelina, HKI-272, homoharringtonina, HSPPC-96, proteína de fusión hu14.18-interleucina-2, HuMax-CD4, iloprost, imiquimod, infliximab, interleucina-12, IPI-504, irofulven, ixabepilona, lapatinib, lenalidomida, lestaurtinib, leuprolida, inmunotoxina LMB-9, lonafarnib, luniliximab, mafosfamida, MB07133, MDX-010, MLN2704, anticuerpo monoclonal 3F8, anticuerpo monoclonal J591, motexafino, MS-275, MVA-MUC1-IL2, nilutamida, nitrocamptotecina, nolatrexed diclorhidato, nolvadex, NS-9, O6-bencilguanina, oblimersen sodio, ONYX-015, oregovomab, OSI-774, panitumumab, paraplato, PD-0325901, pemetrexed, PHY906, pioglitazona, pirfenidona, pixantrona, PS-341, PSC 833, PXD101, pirazoloacridina, R115777, RAD001, ranpirnasa, análogo de rebeccamicina, proteína rhuAngiostatina, rhuMab 2C4, rosiglitazona, rubitecán, S-1, S-8184, satraplatino, SB-, 15992, SGN-0010, SGN-40, sorafenib, SR31747A, ST1571, SU011248, ácido hidroxámico suberoilánilida, suramina, talabostat, talampanel, tariquidar, temsirolimus, inmunotoxina TGFa-PE38, talidomida, timalfasina, tipifarnib, tirapazamina, TLK286, trabectedina, glucuronato de trimetrexato, TroVax, UCN-1, ácido valproico, vinflunina, VNP40101M, volociximab, vorinostat, VX-680, ZD1839, ZD6474, zileutón y triclorhidrato de zosuquidar.

Para una descripción más detallada de agentes anticancerosos y otros agentes terapéuticos, se remite a los expertos en la materia a diversos manuales de instrucciones, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el Physician's Desk Reference y "Pharmaceutical Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, novena edición, Eds. Hardman y col., 2002.

La presente divulgación proporciona procedimientos para administrar un compuesto de la invención con radioterapia. La divulgación no está limitada por los tipos, cantidades o sistemas de liberación y administración utilizados para administrar la dosis terapéutica de radiación a un animal. Por ejemplo, el animal puede recibir radioterapia fotónica, radioterapia de haz de partículas, otros tipos de radioterapia, y combinaciones de las mismas. En algunos casos, la radiación se administra al animal usando un acelerador lineal. En otros casos, la radiación se administra usando un bisturí gamma.

La fuente de radiación puede ser externa o interna para el animal. La radioterapia externa es la más habitual e implica dirigir un haz de radiación de alta energía a un sitio del tumor a través de la piel usando, por ejemplo, un acelerador lineal. Mientras el haz de radiación se localiza en el sitio del tumor, es casi imposible evitar la exposición de tejido sano normal. Sin embargo, la radiación externa generalmente es bien tolerada por los animales. La radioterapia interna implica implantar una fuente de emisión de radiación, tales como perlas, cables, microgránulos, cápsulas, partículas y similares, dentro del cuerpo en o cerca del sitio del tumor, incluido el uso de sistemas de administración que se dirigen específicamente a las células cancerosas (por ejemplo, usando partículas unidas a ligandos de unión a células cancerosas). Tales implantes se pueden eliminar tras el tratamiento o dejar en el cuerpo inactivos. Los tipos de radioterapia interna incluyen, aunque no de forma limitativa, braquiterapia, irradiación intersticial, irradiación intracavitaria, radioinmunoterapia, y similares.

El animal puede recibir, opcionalmente, radiosensibilizadores (por ejemplo, metronidazol, misonidazol, Budr intraarterial, yododesoxiuridina intravenosa (IudR), nitroimidazol, 5-sustituido-4-nitroimidazoles, 2H-isoindoleonas, [[(2-bromoetil)-amino]metil]-nitro-1H-imidazol-1-etanol, derivados de nitroanilina, citotoxinas selectivas en hipoxia de ADN-afínico, ligando de ADN halogenado, óxidos de 1,2,4 benzotriazina, derivados de 2-nitroimidazol, derivados de nitroazol que contienen flúor, benzamida, nicotinamida, intercalador de acridina, derivado de 5-tiotretazol, 3-nitro-1,2,4-triazol, derivado de 4,5-dinitroimidazol, texafrinas hidroxiladas, cisplatino, mitomicina, tiripazamina, nitrosourea, mercaptopurina, metotrexato, fluorouracilo, bleomicina, vincristina, carboplatino, epirubicina, doxorubicina,

ciclofosfamida, Vindesina, etopósido, paclitaxel, calor (hipertermia) y similares), radioprotectores (por ejemplo, cisteamina, aminoalquil dihidrógeno fosforotioatos, amifostina (WR 2721), IL-1, IL-6, y similares). Los radiosensibilizadores mejoran la muerte de las células tumorales. Los radioprotectores protegen el tejido sano de los efectos dañinos de la radiación.

- 5 Cualquier tipo de radiación se puede administrar a animal, siempre que la dosis de radiación sea tolerada por el animal sin efectos secundarios negativos inaceptables. Los tipos adecuados de radioterapia incluyen, por ejemplo, radioterapia ionizante (electromagnética) (por ejemplo, Rayos X o rayos gamma) o radioterapia con haz de partículas (por ejemplo, radiación de alta energía lineal). La radiación ionizante se define como la radiación que comprende partículas o fotones que tienen la energía suficiente para producir la ionización, es decir, la ganancia o pérdida de electrones (como se describe en, por ejemplo, documento US 5.770.581). El médico puede controlar, al menos parcialmente, los efectos de la radiación. En un ejemplo, la dosis de radiación se fracciona para la máxima exposición de la célula objetivo y una toxicidad reducida.

10 En un ejemplo, la dosis total de radiación administrada a un animal es de aproximadamente 0,01 Gray (Gy) a aproximadamente 100 Gy. En otra realización, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 65 Gy (por ejemplo, aproximadamente 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy, 45 Gy, 50 Gy, 55 Gy, o 60 Gy) se administran durante el transcurso del tratamiento. Aunque en algunas realizaciones se puede administrar una dosis completa de radiación durante el transcurso de un día, la dosis total se fracciona idealmente y se administra durante varios días. De forma deseable, la radioterapia se administra en el transcurso de al menos aproximadamente 3 días, por ejemplo, al menos 5, 7, 10, 14, 17, 21, 25, 28, 32, 35, 38, 42, 46, 52, o 56 días (aproximadamente 1-8 semanas). En consecuencia, una dosis diaria de radiación comprenderá aproximadamente 1-5 Gy (por ejemplo, aproximadamente 1 Gy, 1,5 Gy, 1,8 Gy, 2 Gy, 2,5 Gy, 2,8 Gy, 3 Gy, 3,2 Gy, 3,5 Gy, 3,8 Gy, 4 Gy, 4,2 Gy o 4,5 Gy), o 1-2 Gy (por ejemplo, 1,5-2 Gy). La dosis diaria de radiación debe ser suficiente para inducir la destrucción de las células objetivo. Si se extiende durante un período, en un ejemplo, la radiación no se administra todos los días, permitiendo de ese modo que el animal descanse y que actúen los efectos de la terapia. Por ejemplo, la radiación se administra deseablemente en 5 días consecutivos y no se administra en 2 días, por cada semana de tratamiento, dejando de este modo 2 días de descanso por semana. Sin embargo, la radiación puede administrarse 1 día/semana, 2 días/semana, 3 días/semana, 4 días/semana, 5 días/semana, 6 días/semana o los 7 días/semana, dependiendo de la respuesta del animal y de cualquier efecto secundario potencial. La radioterapia puede iniciarse en cualquier momento del periodo terapéutico. En un ejemplo, la radiación se inicia en la semana 1 o semana 2 y se administra durante el tiempo restante del periodo terapéutico. Por ejemplo, la radiación se administra las semanas 1-6 o las semanas 2-6 de un periodo terapéutico que comprende 6 semanas de tratamiento de, por ejemplo, un tumor sólido. Como alternativa, la radiación se administra las semanas 1-5 o las semanas 2-5 de un periodo terapéutico que comprende 5 semanas. Estos ejemplos de esquemas de administración de radioterapia no pretenden, sin embargo, limitar la presente invención.

15 Los agentes terapéuticos antimicrobianos también pueden usarse como agentes terapéuticos en la presente invención. Se puede usar cualquier agente que pueda matar, inhibir o de otro modo atenuar la función de los organismos microbianos, así como cualquier agente contemplado que tenga tales actividades. Los agentes antimicrobianos incluyen, aunque no de forma limitativa, antibióticos naturales y sintéticos, anticuerpos, proteínas inhibidoras (por ejemplo, defensinas), ácidos nucleicos antisentido, agentes disruptores de membrana y similares, usados solos o en combinación. De hecho, se puede usar cualquier tipo de antibiótico, incluyendo, aunque no de forma limitativa, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y similares.

20 En algunos ejemplos, un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos o agentes anticancerosos se administran a un animal en una o más de las siguientes condiciones: a diferentes periodicidades, a diferentes duraciones, a diferentes concentraciones, por diferentes vías de administración, etc. En algunos ejemplos, el compuesto se administra antes del agente terapéutico o anticanceroso, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas antes de la administración del agente terapéutico o anticanceroso. En algunos ejemplos, el compuesto se administra después del agente terapéutico o anticanceroso, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas después de la administración del agente anticanceroso. En algunos ejemplos, el compuesto y el agente terapéutico o anticanceroso se administran simultáneamente pero en diferentes horarios, por ejemplo, el compuesto se administra diariamente mientras que el agente terapéutico o anticanceroso se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas. En otros ejemplos, el compuesto se administra una vez a la semana mientras que el agente terapéutico o anticanceroso se administra a diario, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

25 Las composiciones dentro del ámbito de la presente invención incluyen todas las composiciones en las que los compuestos de la presente invención están contenidos en una cantidad que es efectiva para lograr su fin pretendido. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades efectivas de cada componente está dentro de la habilidad de la técnica. Por lo general, los compuestos pueden administrarse a mamíferos, por ejemplo, seres humanos, por vía oral a una dosis de 0,0025 a 50 mg/kg, o una cantidad equivalente de la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, al día del peso corporal del mamífero que está siendo tratado por trastornos que responden a la inducción de apoptosis. En un ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg se administran por vía oral para tratar, mejorar o prevenir tales trastornos. Para inyección intramuscular, la dosis generalmente es de aproximadamente la mitad de la dosis oral. Por ejemplo, una dosis intramuscular adecuada

sería de aproximadamente 0,0025 a aproximadamente 25 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg.

5 La dosis oral unitaria puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1000 mg, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg del compuesto. La dosis unitaria puede administrarse una o más veces al día como uno o más comprimidos o cápsulas que contienen cada una de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg, convenientemente de aproximadamente 0,25 a 50 mg del compuesto o sus solvatos.

10 En una formulación tópica, el compuesto puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,01 a 100 mg por gramo de vehículo. En un ejemplo, el compuesto está presente a una concentración de aproximadamente 0,07-1,0 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,1-0,5 mg/ml y, en una realización, de aproximadamente 0,4 mg/ml.

15 Además de administrar el compuesto como una sustancia química en bruto, los compuestos de la invención pueden administrarse como parte de una preparación farmacéutica que contiene vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las preparaciones, particularmente las preparaciones que pueden administrarse por vía oral o tópica y que pueden usarse para un tipo de administración, tales como comprimidos, grageas, pastillas para chupar de liberación lenta y cápsulas, enjuagues bucales y colutorios, geles, suspensiones líquidas, enjuagues para el cabello, geles para el cabello, champús y también preparaciones que pueden administrarse por vía rectal, tales como supositorios, así como soluciones adecuadas para la administración por infusión intravenosa, inyección, tópica u oralmente, contienen de aproximadamente 0,01 a 99 por ciento, en una realización de aproximadamente 0,25 a 75 por ciento de compuesto o compuestos activos, junto con el excipiente.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a cualquier paciente que pueda experimentar los efectos beneficiosos de los compuestos de la invención. El principal de estos pacientes son mamíferos, por ejemplo, seres humanos, aunque la invención no pretende estar limitada a estos. Otros pacientes incluyen animales veterinarios (vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros, gatos y similares).

25 Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse por cualquier medio que logre su fin pretendido. Por ejemplo, la administración puede ser por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal, intratecal, intracraneal, intranasal o tópica. Como alternativa o de forma concurrente, la administración puede ser por vía oral. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, en caso de haberla, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

30 Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican de una manera que se conoce a sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de convencional, granulación, fabricación de grageas, disolución o liofilización. Por tanto, las preparaciones farmacéuticas para su uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea o es necesario, para obtener comprimidos o núcleos de grageas.

35 Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos, tales como sacáridos, por ejemplo lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo fosfato tricálcico o hidrógenofosfato de calcio, así como aglutinantes, tales como pasta de almidón, usando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como los almidones mencionados anteriormente y también el carboximetil-almidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, tales como alginato de sodio. Los auxiliares son, sobre todo, agentes de regulación de flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico y sales de los mismos, tales como estearato de magnesio o estearato de calcio, y/o polietilenglicol. Se proporcionan núcleos de grageas con revestimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Para este fin se pueden utilizar soluciones de sacáridos concentradas, que pueden contener, opcionalmente, goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Para producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, se usan soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. A los recubrimientos de grageas o comprimidos se pueden añadir colorantes o pigmentos, por ejemplo, para identificación o para caracterizar combinaciones de dosis de compuestos activos.

40 Otras preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que se pueden mezclar con rellenos, tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden en una realización en líquidos adecuados, tales como aceites grasos o parafina líquida. Además, pueden añadirse estabilizantes.

Las posibles preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en una combinación de uno o más de los compuestos activos con una base de supositorio. Las bases de supositorios adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación de los compuestos activos con una base. Los posibles materiales base incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o hidrocarburos de parafina.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, por ejemplo, sales solubles en agua y soluciones alcalinas. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos o polietilenglicol 400. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes.

Las composiciones tópicas de la presente invención se formulan en una realización como aceites, cremas, lociones, ungüentos y similares por elección de los vehículos apropiados. Los vehículos adecuados incluyen aceites vegetales o minerales, vaselina blanca (parafina blanda blanca), grasas o aceites de cadena ramificada, grasas animales y alcohol de alto peso molecular (superior a C₁₂). Los vehículos pueden ser aquellos en los que el principio activo es soluble. También se pueden incluir emulsionantes, estabilizantes, humectantes y antioxidantes, así como agentes que imparten color o fragancia, si se desea. De manera adicional, los potenciadores de penetración transdérmica se pueden emplear en estas formulaciones tópicas. Se pueden encontrar ejemplos de tales potenciadores en la patente de Estados Unidos n.º 3.989.816 y 4.444.762.

Los ungüentos se pueden formular mezclando una solución del principio activo en un aceite vegetal, tal como aceite de almendras con parafina blanda caliente y permitiendo que la mezcla se enfríe. Un ejemplo típico de tal ungüento es uno que incluye aproximadamente el 30 % de aceite de almendras y aproximadamente el 70 % de parafina blanda blanca en peso. Las lociones se pueden preparar convenientemente disolviendo el principio activo, en un alcohol adecuado de alto peso molecular, tal como propilenglicol o polietilenglicol.

Un experto en la materia reconocerá fácilmente que lo anterior representa simplemente una descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas de la presente invención. Varias modificaciones y alteraciones de las composiciones y procedimientos descritos anteriormente se pueden lograr fácilmente utilizando la experiencia disponible en la técnica y están dentro del ámbito de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero sin limitaciones, de los compuestos y composiciones de la presente invención.

Ejemplo 1.

Los experimentos preliminares con respecto a los compuestos de pirazolopiridina se proporcionan en la patente provisional de Estados Unidos N.º 61/975,297, presentada el 4 de abril de 2014.

Ejemplo 2.

Este ejemplo describe el desarrollo de análogos de 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina como una clase de inhibidores de Mcl-1.

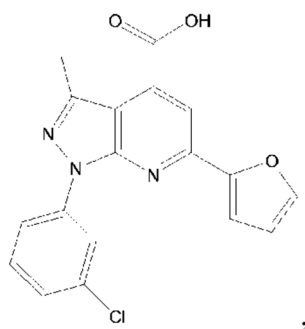
El enfoque de cribado de alto rendimiento (HTS) es una estrategia conocida para la identificación de compuestos guía potenciales para un mayor desarrollo (véase, por ejemplo, Macarron, R., y col., Nat Rev Drug Discov 2011, 10, 188-95). Para identificar inhibidores de molécula pequeña-pequeña de Mcl-1, se desarrolló un ensayo de HTS de doble lectura que combina dos tecnologías de ensayo, polarización de fluorescencia (FP) y transferencia de energía de resonancia Forster (FRET), se optimizó y se miniaturizó a un formato ultra-HTS de 1.536 pocillos (véase, por ejemplo, Du, Y., y col., Assay Drug Dev Technol 2011, 9, 382-93). El ensayo se usó para cribar una biblioteca de 102.255 compuestos en el Emory University Molecular Libraries Screening Center usando Mcl-1 recombinante y péptidos derivados de Noxa o Bid BH3 marcados. Los resultados identificados de ambos cribados primarios se sometieron a pruebas secundarias de dosis-respuesta y se identificaron un total de 1214 (875 de Mcl-1/Noxa y 509 de Mcl-1/Bid), incluidos 170 compuestos superpuestos. Todas las curvas de dosis-respuesta se depositaron adicionalmente en la base de datos BioAssay de PubChem como AID 1417 (véase, por ejemplo, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1417>) y 1418 (véase, por ejemplo, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1418>).

Una alta tasa de éxito en las campañas de HTS puede hacer que la identificación de los éxitos más prometedores sea un gran desafío y, por lo tanto, se desean estrategias novedosas para simplificar este procedimiento. Por tanto, se empleó un enfoque de cribado integrado mediante la combinación de cribado *in silico* basado en objetivos para la

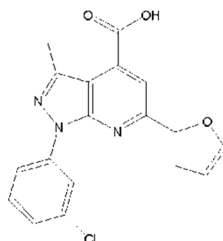
selección de los éxitos más prometedores. Para este fin, se usó acoplamiento molecular utilizando la estructura cristalina de Mcl-1 unida a mNoxa (PDB 2NLA) (véase, por ejemplo, Czabotar, P. E. y col., Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 6217-22) y todas las coincidencias identificadas se sometieron al protocolo de acoplamiento de ajuste inducido (IFD) de Schrödinger (véase, por ejemplo, Schrodinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol; Glide versión 5.7, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2009; Prime versión 3.0, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2011) en el sitio de unión a BH3 de Mcl-1. Se desarrolló un modelo de farmacóforo (Figura 1) basado en las interacciones de mNoxa y Mcl-1 que incluía 3 interacciones hidrofóbicas y una de enlace de hidrógeno/interacción electrostática. Se seleccionaron los compuestos capaces de imitar al menos dos de las 4 interacciones conservadas de mNoxa con Mcl-1. Esto totalizó 67 compuestos de los cuales 48 se adquirieron en vendedores comerciales. Los 48 compuestos se sometieron a rigurosos ensayos bioquímicos y biofísicos, que incluyeron ensayos de FP y SPR competitivos de respuesta a la dosis contra estudios de RMN Mcl-1 y HSQC. Los compuestos que dieron resultados consistentes en todos los ensayos de unión se consideraron como coincidencias validadas y aquellos con esqueletos químicos prometedores se seleccionaron para una mayor optimización.

Ejemplo 3.

Este ejemplo describe la identificación de la guía HTS **1** como inhibidor de Mcl-1. El compuesto **1** (véase, también, Figura 2A (obsérvese que mientras que la Figura 2 indica "38 o 1", el compuesto pretendido es el compuesto 1 ()) fue uno de las coincidencias validadas que mostraron cambios en el desplazamiento químico dependiente de la dosis de los restos de Mcl-1 en los experimentos de RMN HSQC.



20



El compuesto **1** se resintetizó (análogo **1**) y se confirmó su potencia ($K_i = 2,64 \mu\text{M}$). La simplicidad de la modificación sintética para su generación analógica, así como sus características similares a los fármacos según lo definido por la Regla de Cinco de Lipinski (véase, por ejemplo, Lipinski, C. A. y col., Adv Drug Deliv Rev 2001, 46, 3-26) lo convirtió en una buena opción para una mayor optimización. **1** tiene una eficiencia de ligando favorable de 12,9 que se calcula con base en la siguiente ecuación: $LE = \frac{pK_i}{PM \text{ (kDa)}}$ La eficiencia del ligando (LE) calculada también se conoce como índice de eficiencia de unión (BEI) (véase, por ejemplo, Abad-Zapatero, C., y col., Drug Discov Today 2005, 10, 464-9, Hajduk, P. J., J. Med Chem 2006, 49, 6972-6).

Para estudios de acoplamiento de **1**, se utilizó una estructura cristalina Mcl-1 informada en complejo con un ligando sintético (PDB 4HW2) (véase, por ejemplo, Friberg, A., y col., J Med Chem 2013, 56, 15-30). La pose de acoplamiento generada por Gold (Figura 2B) de **1** se validó y confirmó además mediante estudios de RMN HSQC de Mcl-1 en presencia de exceso por 2 de **1**. El gráfico de perturbación por desplazamiento químico (CSP) del compuesto **1** (Figura 2C) mostró perturbaciones de moderadas a significativas de V249, M250 y M231, que forman parte del bolsillo p2 de Mcl-1, consistente con el modelo de unión predicho donde 3-clorofenilo de **1** se une al bolsillo hidrofóbico p2. También se observan perturbaciones significativas de L267 y R263, así como residuos en sus proximidades (I264, V265). Se predice que L267 interacciona con el 3-metilo mientras que R263 forma una interacción electrostática con ácido 4-carboxílico de **1**. Finalmente, se predice que el 6-furilo interacciona con los residuos en los bolsillos p2/p3, principalmente A227, F228, F270, G271 y M231, que están perturbados de moderada a significativamente. Además de los restos mencionados anteriormente que se ha predicho que interaccionarán con **1** mediante estudios de acoplamiento, se observan perturbaciones significativas por desplazamiento químico de V216, V220, Q221 (en el extremo C de la α -hélice 2), K234, L235 (en el extremo C de la α -hélice 3), N239 (en el bucle desordenado que conecta

40

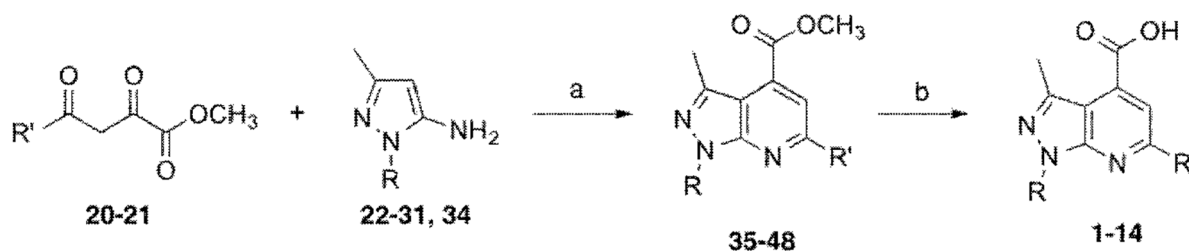
la α -hélice 3 y 4) y V243 y V253 (en la α -hélice 4). Análisis general de los cambios de cambio químico de **1** en complejo con Mcl-1 muestra que **1** afecta los residuos en la ranura de unión a BH3 de Mcl-1 y proporciona un fuerte soporte para la unión de este compuesto a Mcl-1.

- 5 La fuerte evidencia de la unión de **1** a Mcl-1 basada en estudios computacionales respaldados por RMN dio confianza para emprender la optimización de esta clase de compuestos utilizando una estrategia de diseño basada en la estructura. Por lo tanto, se diseñó un plan SAR para realizar cambios en las posiciones de arilo N-1 y C-6 indicadas como R y R', respectivamente (Esquema 1).

Ejemplo 4.

Este ejemplo describe la síntesis de análogos de ácido 1,6-disustituido-3-metil-pirazolopiridina-4-carboxílico.

- 10 Una síntesis eficiente, convergente y corta de análogos de clase de **1** se estableció según la metodología de la literatura con la mayoría de los compuestos elaborados utilizando el Esquema 1.

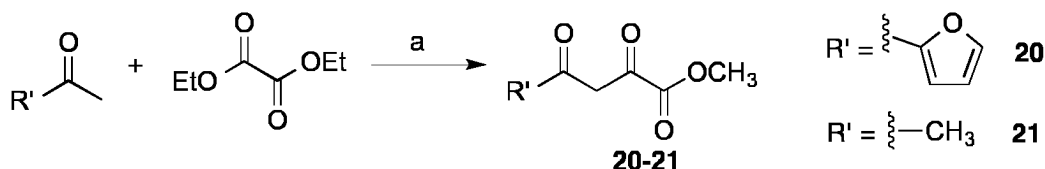


Esquema 1. Generación de análogos de ácido 1,6-disustituido-3-metil-pirazolopiridina-4-carboxílico^a.

^aReactivos y condiciones: (a) AcOH, reflujo, 2 h, 7 %-97 %; (b) KOH, iPrOH, reflujo, 1 h, 20 %-100 %.

- 15 Los piruvatos de acilo **20** y **21** se obtuvieron por condensación de Claisen de 2-acetilfurano o acetona y oxalato de dietilo (véase, por ejemplo, Ghosh, A. K., y col., J Med Chem 2005, 48, 6767-71) (Esquema 2). Esto introdujo el primer punto de diversidad de la biblioteca que se denomina R'.

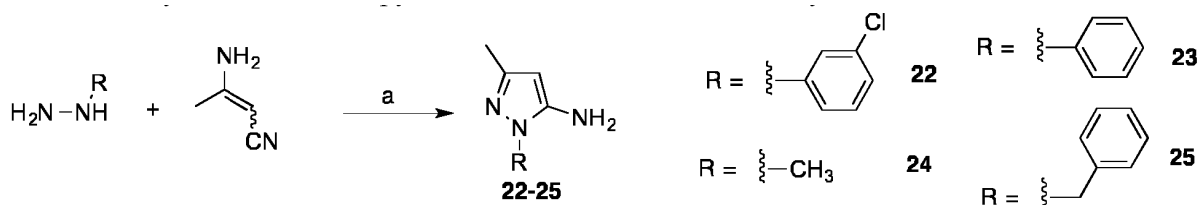
Esquema 2. Síntesis de piruvatos de acilo **20** y **21**^a.



- 20 ^aReactivos y condiciones: (a) Na, MeOH, t.a., 1 h, 26 %-35 %.

El segundo punto de diversidad (R) se introdujo con sustituciones variables en la posición pirazol N-1. Se prepararon dos conjuntos de aminopirazoles mediante dos enfoques distintos. La primera serie de aminopirazoles (**22-25**) se obtuvo a partir de una adición de Michael de hidrazinas sustituidas a 3-aminocrotononitrilo (véase, por ejemplo, Ganesan, A., y col., Journal of Organic Chemistry 1993, 58, 6155-6157) (Esquema 3.3).

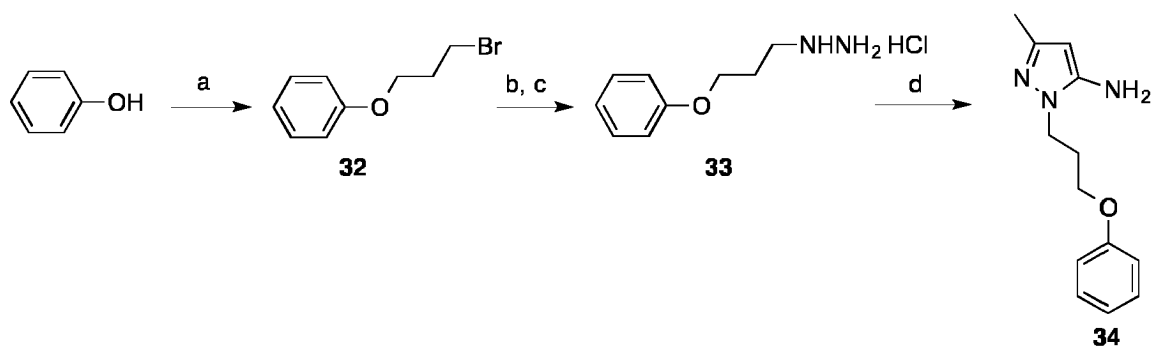
- 25 **Esquema 3.** Síntesis de aminopirazoles. **22-25** de hidrazinas sustituidas^a.



^aReactivos y condiciones: (a) HCl 1N, reflujo, 3 h, 20 %-98 %.

- 30 Para el análogo **11** (**311**) la hidrazina sustituida (**33**) no estaba disponible pero se preparó fácilmente (Esquema 4) mediante alquilación de 1-fenol por 1,3-dibromopropano (véase, por ejemplo, Martins, A., y col., J Org Chem 2006, 71, 4937-42) seguido del desplazamiento de bromuro con hidrazina (véase, por ejemplo, documento WO2003027074A1).

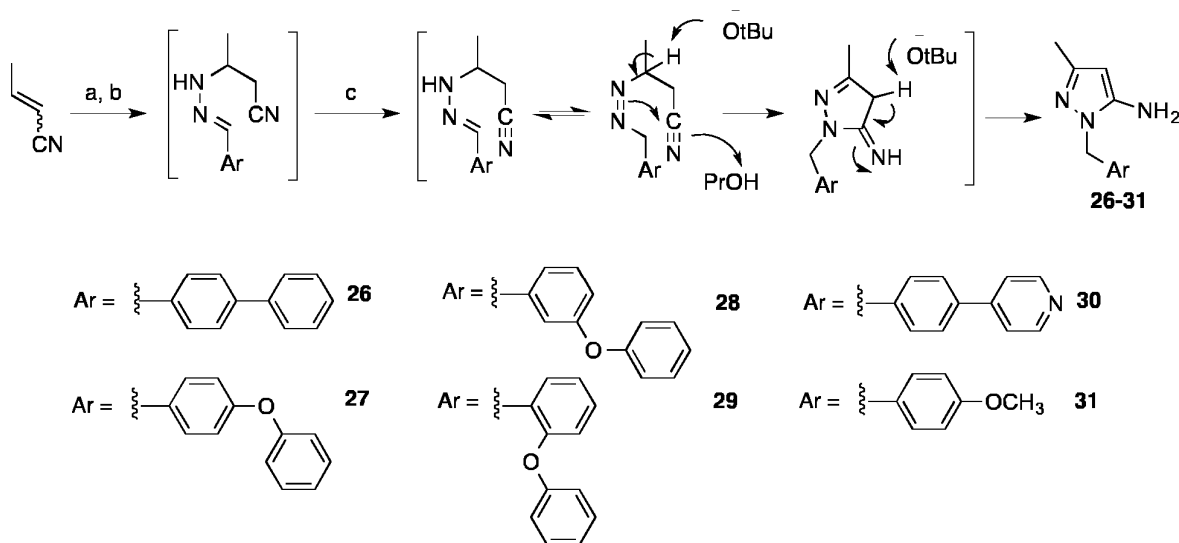
Esquema 4. Síntesis de aminopirazol **34**^a.



^aReactivos y condiciones: (a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{Br}$, K_2CO_3 , acetona, reflujo, 19 h, 77 %; (b) H_2NNH_2 , H_2O , EtOH, 80 °C 3 h 30 min; (c) HCl 2N, CH_2Cl_2 , t.a., durante la noche; (d) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_3)=\text{CHCN}$, HCl 1 N, reflujo, 3 h, 48 % en tres etapas.

5 Cuando las hidrazinas sustituidas no estaban disponibles comercialmente o no eran fácilmente accesibles, la condensación multicomponente de hidrazina, crotononitrilo y arilaldehído proporcionaron los aminopirazoles deseados (**26-31**) (Esquema 5) como se ha indicado anteriormente (véase, por ejemplo, Misra, R. N., y col., *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13, 1133-6; véase, también, el documento WO2009150614A1). El mecanismo propuesto por el cual
 10 funciona esta reacción es el siguiente: en primer lugar, el aducto de Michael se forma entre la reacción del crotononitrilo y la hidrazina. El tratamiento de este aducto con un arilaldehído deseado proporciona la imina intermedia (se muestra la estructura) que no está aislada, pero se convierte directamente en el pirazol correspondiente mediante la ciclación y la isomerización estimuladas por bases (Esquema 5). Con los piruvatos de acilo y aminopirazoles deseados a mano, los penúltimos intermedios (**35-48**) se obtuvieron de la reacción entre estos dos bloques componentes en ácido acético (véase, por ejemplo, Volochnyuk, D. M., y col., *J Comb Chem* 2010, 12, 510-7) (Esquema 1). La hidrólisis del éster usando hidróxido de potasio en 2-propanol proporcionó los análogos finales **1-14** (véase, por ejemplo, Volochnyuk, D. M., y col., *J Comb Chem* 2010, 12, 510-7) (Esquema 1).
 15

Esquema 5. Síntesis de aminopirazoles. **26-31** de arilaldehídos^a.

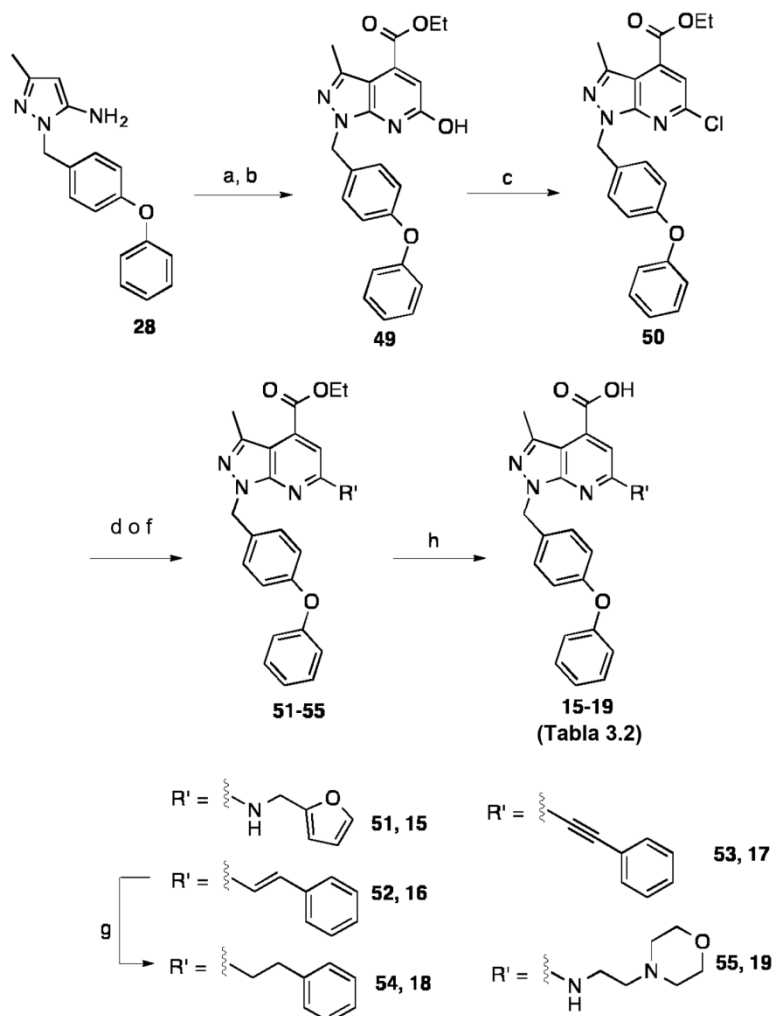


^aReactivos y condiciones: (a) H_2NNH_2 , H_2O , THF, 40 °C 2 h; (b) ArCHO, 40 °C 2 h (c) *t*-BuONa, *i*PrOH, 100 °C, 2 h 30 min o *n*-BuONa, *n*-PrOH, 110 °C, 2 h 30 min, 20 %-42 % en tres etapas.

20 Para los análogos **15-19**, se utilizó el esquema 6. La 3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazol-5-amina (**28**) se condensó con oxalacetato de dietilo para proporcionar un intermedio de anillo abierto (estructura no mostrada) que se cicló a piridinol **49** por reflujo en ácido acético glacial (véase, por ejemplo, Neres, J., y col., *J Med Chem* 2013, 56, 2385-405). La cloración de piridinol **49** con POCl_3 no tuvo éxito como se ha indicado anteriormente (véase, por ejemplo, Neres, J., y col., *J Med Chem* 2013, 56, 2385-405). Tampoco el uso de una cantidad estequiométrica de reactivo de Vilsmeier en condiciones suaves produjo el producto deseado. Sin embargo, el uso de un gran exceso de reactivo de Vilsmeier en condiciones de reflujo (véase, por ejemplo, Sercel, A. D., y col., *Synthetic Communications* 2007, 37, 4199-4208) durante la noche proporcionó limpiamente **50** con alto rendimiento. El intermedio **50** se sometió después a reacciones de acoplamiento carbono-carbono catalizadas por Pd (véase, por ejemplo, Greig, I. R., y col., *J Med Chem* 2006, 49, 7487-92; Li, X., y col., *J Med Chem* 2003, 46, 5663-73; Dai, W., y col., *Org Lett* 2006, 8, 4665-7) con ácido
 25 fenilvinilborónico o fenilacetileno para proporcionar **52** y **53** respectivamente. El intermedio **54** se obtuvo por hidrogenación (véase, por ejemplo, el documento WO2013039988A1) de **52**. La aminación directa (véase, por ejemplo,
 30

el documento WO2013039988A1) de **50** con 2-aminometilfurano o 4- (2-aminoetil)morfolina a alta temperatura y con un tiempo de reacción prolongado proporcionó **51** y **55**, respectivamente. Los intermedios de éster se hidrolizaron como se ha descrito previamente en el Esquema 1 para proporcionar análogos ácidos **15-19**.

Esquema 6. Generación de análogos **15-19**^a.



5

10

^aReactivos y condiciones: (a) EtO₂CC(ONa)=CHCO₂Et, tolueno/AcOH glacial/H₂O, 80 °C, durante la noche; (b) AcOH glacial, reflujo, 2 h, 67 % en dos etapas; (c) (COCl)₂, DMF, 1,2 DCE, 0 °C a t.a. a reflujo, durante la noche, cuantitativo; (d) para **52**: ácido fenilvinilborónico, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4 dioxano/H₂O, 90 °C, durante la noche, 90 % o para **53**: fenilacetileno, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, Et₃N/THF, 60 °C, durante la noche, 31 %; (f) para **51**: 2-aminometilfurano, iPrOH, de 100 °C a 150 °C, 2 días, 30 % o para **55**: 4- (2-aminoetil)morfolina, iPrOH/NMP, 150 °C, durante la noche, 26 %; (g) Pd/C, H₂ (1 atm), EtOH/THF, t.a., durante la noche, 84 %; (h) KOH, iPrOH/THF, reflujo, 2 h, 39 %-94 % o para **15**: NaOH 1N, THF, reflujo, 3 h, 61 %.

Ejemplo 5.

Este ejemplo describe las relaciones estructura-actividad de los compuestos.



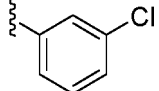

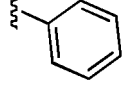



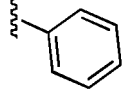



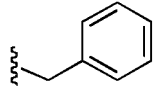

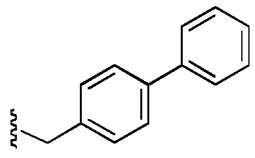

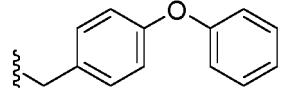

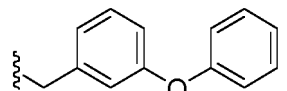
15

20


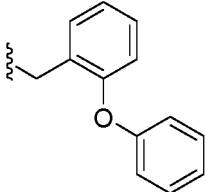

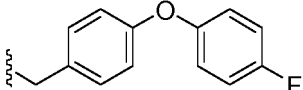

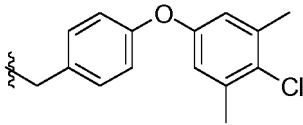

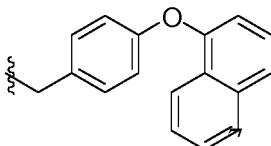

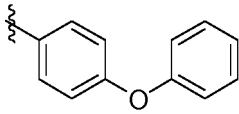

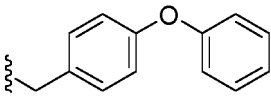
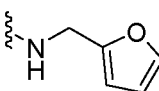
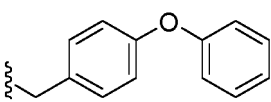
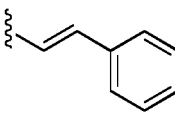
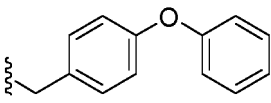
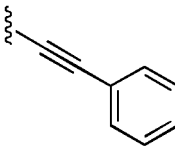
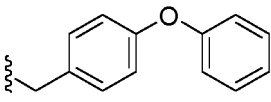
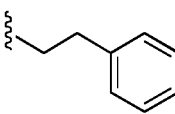
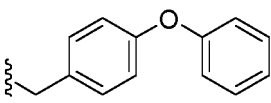
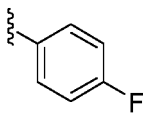
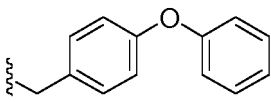
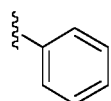
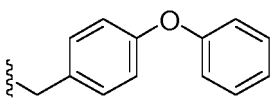
En ausencia de una estructura cristalina de **1** con Mcl-1, las contribuciones de R y R' de **1** se estudiaron para obtener una mejor comprensión de sus sitios de unión mediante la eliminación sistemática de cada grupo y estudiar los fragmentos obtenidos (Tabla 1) en la RMN HSQC. Primero, se sintetizó el análogo **2** en el que se sustituyó un fenilo por el 3-clorofenilo que condujo a una disminución por 2 de la potencia en comparación con **1**. Posteriormente, se estudió la eliminación del fenilo en R o el furilo en R' o ambos, y sus reemplazos con un metilo para dar los fragmentos **3-5**, respectivamente. Los análogos **3** y **5** no se unieron hasta 200 μM y mostraron poca o ninguna perturbación en los estudios de RMN HSQC con un exceso de 2 veces (concentración final del fragmento de 150 μM). El análogo **4** mostró una disminución de siete veces en comparación con el compuesto **1**, que junto con los resultados para los análogos **3** y **5** confirma la importancia de ambos anillos aromáticos en R y R' y sus contribuciones a la potencia general. A

5 continuación, el fenilo en **2** fue reemplazado con un grupo bencilo en **6**, lo que condujo a un ligero aumento en la potencia. Más importante aún, los estudios de RMN (Figura 2) de estos dos análogos condujeron a un hallazgo importante. Cuando se restaron los cambios de desplazamiento químico de **2** de los causados por **6** y los residuos se mapearon en la estructura de Mcl-1 (Figura 3A y 3B), quedó claro que los residuos más afectados por los cambios entre las dos estructuras, principalmente agrupados en el extremo C de la α -hélice 3 y la α -hélice 4, que son los residuos que recubren el bolsillo p2 de Mcl-1. Este hallazgo indica que el grupo bencilo de **6** se inserta en el bolsillo h2 y forma interacciones hidrofóbicas adicionales con el bolsillo p2, validando aún más el modelo de acoplamiento molecular en el que se predice que R se inserta en el bolsillo p2 de Mcl-1.


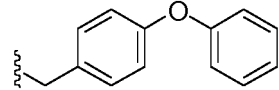
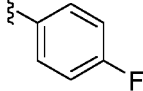
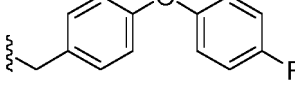
Tabla 1: Afinidades vinculantes de **1** y sus análogos contra la proteína Mcl-1

					
Cpt	R'	R	CI ₅₀ ± SD [μM]	K _i ± SD [μM]	LE
1			13,7 ± 2,4	2,64 ± 0,46	15,8
2			22,1 ± 4,5	4,25 ± 0,86	16,8
3			> 200	> 40	
4			75,7 ± 12,6	14,58 ± 2,42	18,1
5			> 200	> 40	
6			18,4 ± 9,9	3,54 ± 1,90	16,4
7			7,3 ± 0,8	1,40 ± 0,15	14,3
8			1,52 ± 0,5	0,29 ± 0,09	15,4
9			7,3 ± 0,2	1,40 ± 0,04	13,8

(continuación)

Cpt	R'	R	CI ₅₀ ± SD [μM]	K _i ± SD [μM]	LE
10			10,7 ± 2,4	2,06 ± 0,46	13,4
56			4,68 ± 2,7	0,90 ± 0,46	13,6
57			0,67 ± 0,08	0,13 ± 0,01	14,1
58			1,28 ± 0,48	0,25 ± 0,09	13,9
59			4,27 ± 1,21	0,82 ± 0,23	14,8
14			17,26 ± 1,29	3,32 ± 0,25	14,7
15			12,4 ± 3,04	2,39 ± 0,58	12,4
16			1,11 ± 0,22	0,21 ± 0,04	14,5
17			6,3 ± 0,69	1,21 ± 0,13	12,9
18			2,54 ± 0,78	0,49 ± 0,15	13,6
55			10,85 ± 1,57	2,09 ± 0,30	12,5
60			7,97 ± 2,80	1,53 ± 0,54	13,4

(continuación)

Cpt	R'	R	CI ₅₀ ± SD [μM]	K _i ± SD [μM]	LE
61			6,76 ± 0,80	1,30 ± 0,15	13,3
62			4,51 ± 1,20	0,88 ± 0,24	12,8

Para optimizar aún más las interacciones hidrofóbicas en el bolsillo p2, se introdujeron para-bifenilmetilo y para-fenoxibencilo en R en **7** y **8**, que exhibió K_i de 1,4 μM y 0,29 μM, respectivamente, y una mejora general de 10 veces sobre **1**. El acoplamiento molecular de **7** coloca el para-bifenilmetilo más profundo en el bolsillo de p2 (Figura 4A) que está soportado por los estudios de RMN que muestran perturbaciones de moderadas a significativas de F228, M250 y F270 del bolsillo p2, demostrando claramente la importancia de las interacciones hidrofóbicas en este sub-bolsillo (Figura 4B).

El gráfico de CSP de **8** (Figura 5A) confirmó además su unión a Mcl-1. Para examinar cómo la posición del anillo de fenilo distal en el sustituyente R afectará a la unión, se sintetizaron compuestos con *sustituyentes meta*-(**9**) y *orto*-fenoxibencilo (**10**). El análogo **9** mostró una disminución de 5 veces en la unión en comparación con **8**, mientras que **10** disminuyó la unión por 10 veces, lo que indica que existe una clara preferencia por el para-fenoxibencilo en el bolsillo. Las gráficas de CSP derivadas de RMN HSQC (Figura 5A-C) de estos tres isómeros apoyaron los datos de afinidad de unión con **8** y **9** mostrando la mayor magnitud de perturbaciones de los restos. Además, CSP demostró que el sustituyente fenoxibencilo se colocó en el bolsillo de p2 a través de las perturbaciones de desplazamiento químico de V249, M250 y M231. Además, los restos A227, F228, F270, R263 y L267 están perturbados, lo que sugiere que el ácido carboxílico forma una interacción de enlace de hidrógeno y el 6-furilo se coloca en el bolsillo p3. Las modificaciones adicionales en el anillo de fenilo distal en el compuesto **8** condujeron al compuesto **57** más potente con un valor de K_i de 130 nM y una mejora de la afinidad de unión global de 20 veces en comparación con el compuesto guía **1**. Los compuestos presentados en la Tabla 1 exhiben un índice de eficiencia de unión promedio de $14,31 \pm 1,4$ mostrando que el aumento del peso molecular de los compuestos a través del procedimiento de optimización mantenía los cambios de BEI en un intervalo del 10 %, lo que demuestra que las modificaciones químicas contribuyen a la afinidad de unión.

Aunque los estudios con análogos **2** y **4** demostraron que la eliminación de furilo dio como resultado una caída en la afinidad de unión, para determinar aún más la contribución del sustituyente R', se sintetizaron varios análogos adicionales cambiando el sustituyente R' en el potente análogo **8**. El compuesto **14**, donde el furilo fue reemplazado por un metilo, disminuyó la unión en unas significativas 11 veces en comparación con **8**, lo que destaca aún más la importancia del furilo para la unión general. La gráfica de diferencia de CSP de **14** y **8** (Figura 6) mostró que los restos afectados por el furilo se extienden a lo largo de las α-hélices 2 a 5. La razón de que esta amplia área se vea afectada puede explicarse por, por ejemplo, la naturaleza del sustituyente R'. Un furilo en R' de **8** es mucho más grande que un metilo en **14** y su acomodación en el bolsillo requiere un cambio conformacional por parte de la proteína que da como resultado más perturbaciones.

Basado en las poses de acoplamiento de los análogos anteriores, mientras que se predijo que el furano interacciona con restos en el bolsillo p3, su unión directa al núcleo bicíclico hizo que su colocación en el bolsillo p3 dependiera del sustituyente R. Por tanto, se evaluó la incorporación de enlazadores para proporcionar más grados de libertad y una mejor colocación en el bolsillo p3. Los intentos de homologación del grupo furilo no tuvieron éxito utilizando nuestro Esquema sintético 3.1; sin embargo, utilizando una química diferente (Esquema 6), se obtuvo el análogo **15** con un aminometilfurano en R'. Este análogo exhibió un valor de $K_i = 2,39 \mu\text{M}$ y una disminución de 8 veces la unión en comparación con **8**. La disminución en la afinidad de unión puede atribuirse a la introducción de un enlazador de amina polar o una dirección desfavorable del anillo de furano en el bolsillo p3. A continuación, se sintetizaron los análogos **16-18** con un fenilo en lugar de furilo y enlazadores alifáticos con diferentes geometrías direccionales. Los tres análogos **16-18** han mejorado las potencias en comparación con **15**, lo que confirma que se prefieren los enlazadores alifáticos y el compuesto **16** mostró una ligera mejora en la afinidad de unión en comparación con **8**. Se obtuvo la estructura de co-cristal de **16** unida a Mcl-1 a una resolución de 2,45 Å (Figura 7). El compuesto **16** inserta su grupo fenoxi profundamente en el bolsillo hidrofóbico formado por L246, S247, M250 S293 y I294, mientras que el anillo de fenilo adyacente se intercala entre las cadenas laterales de M250 y F270 con F270 interaccionando a través del borde en el apilamiento π-π. El puente de metilo con el grupo pirazol establece contactos adicionales de van der Waals con F270. El grupo guanidinio en R263 forma enlaces de hidrógeno bidentados con los oxígenos carboxílicos presentes en el anillo de piridina. El grupo fenilo del feniletanilo no interacciona con el sitio de unión de BH3, mientras que el enlazador transetanilo interacciona con las cadenas laterales de M250 y M231.

Ejemplo 6.

Este ejemplo describe estudios de selectividad de los compuestos.

El perfil de selectividad de los análogos más potentes **8**, **16**, **57** y **58** se determinó contra otras dos proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-X_L) utilizando ensayos competitivos basados en FP, y los valores de K_i se calcularon usando ecuaciones desarrolladas previamente (véase, por ejemplo, Nikolovska-Coleska, Z. y col., Anal Biochem 2004, 332, 261-73) (Tabla 2).

Tabla 2. Selectividad de análogos seleccionados contra las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2.

Cpt	K_i de Mcl-1 \pm SD (μ M)	K_i de Bcl-2* \pm SD (μ M)	K_i de Bcl-X _L * \pm SD (μ M)
8	0,29 \pm 0,09	> 4	>5
16	0,21 \pm 0,04	3,16 \pm 1,03	3,55 \pm 0,30
57	0,13 \pm 0,01	1,95 \pm 0,20	> 5
58	0,25 \pm 0,09	> 4	>5

* Los compuestos se probaron hasta 20 μ M.

Los análogos **8**, **16**, **57** y **58** inhibieron Mcl-1 de forma más potente con valores de K_i de 0,13 μ M a 0,29 μ M. Todos los compuestos se unen a la proteína Mcl-1 con una selectividad de más de 15 veces y 20 veces sobre Bcl-2 y Bcl-xL, respectivamente. El compuesto más potente, **57**, se une selectivamente a Mcl-1, seguido de una disminución de 15 veces en la afinidad de unión a Bcl-2 y no muestra una unión a Bcl-xL hasta 20 μ M.

Ejemplo 7.

Este ejemplo demuestra ese compuesto **57** se une y funciona como un antagonista de la proteína Mcl-1 y mata selectivamente las líneas celulares dependientes de Mcl-1, consistente con su perfil de afinidad de unión.

Para proporcionar evidencia directa de que estos inhibidores de Mcl-1 también antagonizan selectivamente la función de Mcl-1, se estableció un ensayo funcional libre de células utilizando mitocondrias purificadas, Mcl-1 recombinante y el péptido BIM BH3 que se une a la proteína Mcl-1 con altas afinidades. A 10 nM, el péptido BIM BH3 induce una liberación sustancial de la proteína Smac de las mitocondrias y 30 nM de Mcl-1 inhibe completamente esta liberación (Figura 8). Se demostró que **57** antagonizaba con Mcl-1 y restauraba la liberación inducida por BIM de la proteína Smac de las mitocondrias a 100 μ M. Estos datos demuestran que **57**, se une y funciona como antagonista de la proteína Mcl-1.

La especificidad y selectividad de los inhibidores de Mcl-1 de esta clase se confirmó aún más mediante el uso de líneas celulares desarrolladas por transducción retroviral de células de linfoma aisladas de ratones transgénicos E μ -myc cuya supervivencia depende de la expresión de la proteína prosupervivencia individual (véase, por ejemplo, Whitecross KF, Alsop AE, Cluse LA, Wiegman A, Banks KM, y col. 2009. Blood 113: 1982-91). **57** condujo a la sensibilización de los linfomas E μ -myc que sobreexpresan Mcl-1 pero no mostraron efecto sobre las células que sobreexpresan las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, en oposición a ABT-263 (Figura 9). Estos datos demuestran que **57** mata selectivamente las líneas celulares dependientes de Mcl-1, consistente con su perfil de afinidad de unión.

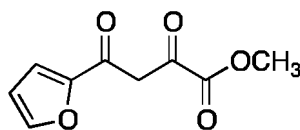
Ejemplo 8.

Este ejemplo presenta los materiales y procedimientos experimentales utilizados dentro de los Ejemplos 1-4 y los procedimientos de síntesis representativos.

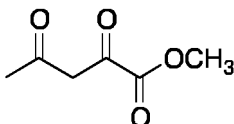
Química

Todas las reacciones anhidras se llevaron a cabo en una atmósfera de nitrógeno seco. Los reactivos se usaron como se suministraron sin purificación adicional. Las reacciones se monitorizaron por TLC usando placas de gel de sílice 60 F254 precubiertas. La cromatografía en gel de sílice se realizó con gel de sílice (malla 220-240) obtenida de Silicycle. La pureza de los compuestos finales se evaluó mediante HPLC analítica realizada en un sistema Shimadzu con una columna Restek Ultra C18 (4,6 x 150 mm, tamaño de partícula de 5 μ m) o una serie Agilent 1100 con una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus-C18 y un gradiente de acetonitrilo con TFA al 0,1 % en vol. (10-90 %) en agua con TFA al 0,1 % en vol. Todos los espectros de RMN se obtuvieron en DMSO-d₆ o CDCl₃ y los resultados se registraron a 400 MHz en un instrumento Varian 400 o a 500 MHz en un instrumento Varian 500. El análisis de espectrometría de masas se realizó utilizando un instrumento de espectrometría de masas de tiempo de vuelo Waters LCT que utiliza ionización por electronebulización que funciona en modos de iones positivos (IEN+) o iones negativos (IEN-) en el cual se indica.

Un procedimiento representativo para la síntesis de acil piruvatos.

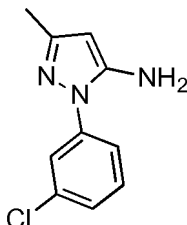


5 **4-(Furan-2-yl)-2,4-dioxobutanoato de metilo (20)** (véase, por ejemplo, Ghosh, A. K., y col., J Med Chem 2005, 48, 6767-71). A una solución en agitación de MeOH (150 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno, se le añadió Na recién cortado (1,81 g, 78,7 mmol) en trozos con cuidado. Después de disolverse todo el sodio, se añadieron gota a gota una mezcla de 2-acetilfurano (6 ml, 59,8 mmol) y oxalato de dietilo (8,14 ml, 59,9 mmol) durante un periodo de 3 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se continuó agitando. Se formaron precipitados de color pardo después de agitar 20 min. La mezcla se agitó durante un total de 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió una mezcla de H₂SO₄ concentrado y hielo. En este momento precipitó algún sólido el cual se retiró por filtración pero no era el producto deseado por RMN ¹H. El filtrado se extrajo con CH₂Cl₂ (50 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se recrystalizó en iPrOH caliente para dar el compuesto del título (4,15 g, 35 %) en forma de un sólido de color pardo oscuro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67-7,65 (m, 1H), 7,33 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 6,60 (dd, J = 3,5, 1,5 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 181,01, 165,39, 162,43, 150,82, 147,73, 118,58, 113,14, 99,17, 53,18.

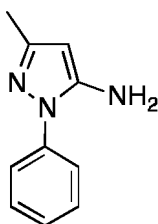


15 **2,4-Dioxopentanoato de metilo (21)**. Sintetizado usando el procedimiento para **20** excepto que se usó acetona como uno de los materiales de partida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (1,36 g, 26 %) en forma de un gel de color blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 6,38 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,26 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 199,96, 166,58, 162,48, 102,20, 53,10, 27,61.

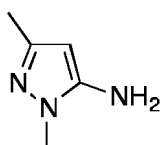
20 Un procedimiento representativo para la síntesis de aminopirazoles a partir de hidrazinas sustituidas.



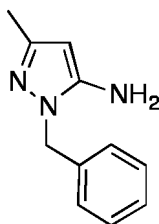
25 **1-(3-Chlorofenil)-3-metil-1H-pirazol-5-amina (22)** (véase, por ejemplo, Ganesan, A., y col., Journal of Organic Chemistry 1993, 58, 6155-6157). Una solución de 3-aminocrotonitrilo (mezcla de cis y trans) (1,50 g, 17,5 mmol) y clorhidrato de 3-clorofenilhidrazina (3,0 g, 16,2 mmol) en 25 ml de HCl 1 N se calentó a reflujo durante 3 h en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se recrystalizó en iPrOH caliente para dar el compuesto del título (677 mg, 20 %) en forma de un sólido esponjoso de color beis. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,62 (s, 1H), 7,48 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,37 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 5,46 (s, 1H), 2,22 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 149,95, 145,30, 139,87, 135,05, 130,32, 126,86, 123,67, 121,28, 91,41, 13,89.



35 **3-Metil-1-fenil-1H-pirazol-5-amina (23)**. Sintetizado usando el procedimiento para **22** excepto que se usó fenilhidrazina como la hidrazina. La recrystalización del producto en bruto a partir de EtOH caliente proporcionó el compuesto del título (1,28 g, 37 %) en forma de cristales de color rosa. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,54 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,44 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,30 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 3,77 (s, 2H), 2,22 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 149,37, 145,21, 138,65, 129,38, 126,99, 123,77, 90,68, 13,93.

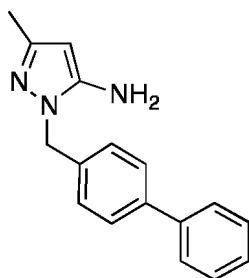


5 **1,3-Dimetil-1H-pirazol-5-amina (24).** Sintetizado usando el procedimiento para 22 excepto que se usó metilhidrazina como la hidrazina. la recristalización del producto en bruto a partir de CH₂Cl₂ caliente proporcionó el compuesto del título (908 mg, 45 %) en forma de cristales transparentes. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,30 (s, 1H), 3,55 (s, 3H), 2,11 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 147,16, 144,96, 90,79, 33,83, 13,78.

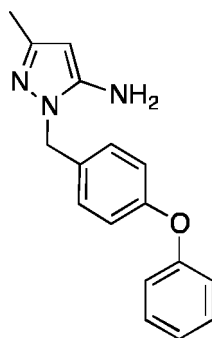


10 **1-Bencil-3-metil-1H-pirazol-5-amina (25).** Sintetizado usando el procedimiento para 22 excepto que se usó diclorhidrato de bencilhidrazina como la hidrazina. Después de que la mezcla de reacción se detuviera y se enfriara a temperatura ambiente, el sólido precipitó, el cual se retiró por filtración y se secó en horno de vacío para proporcionar el compuesto del título (3,6 g, 98 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,40-7,34 (m, 2H), 7,34-7,27 (m, 3H), 5,57 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 2,18 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 151,48, 146,65, 135,16, 129,19, 128,61, 128,00, 91,19, 49,13, 11,44.

Un procedimiento representativo para la síntesis de aminopirazoles a partir de arilaldehídos.

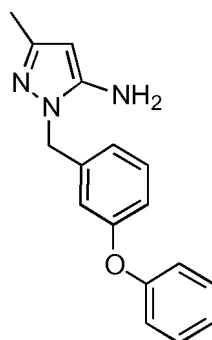


15 **1-([1,1'-Bifenil]-4-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-amina (26)** (véase, por ejemplo, el documento WO2009150614A1). A una solución de monohidrato de hidrazina (hidrazina al 78-82 %) (0,51 ml, 10,5 mmol) en THF (2 ml), se le añadió gota a gota crotononitrilo (mezcla de cis y trans) (0,82 ml, 10,1 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 2 h. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió bifenil-4-carboxaldehído (1,82 g, 10,0 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida. Al sólido resultante de color amarillo se le añadió iPrOH
20 (15 ml) y la suspensión se transfirió a un recipiente de presión. Se añadió t-BuONa (993 mg, 10,3 mmol) y la mezcla se agitó a 100 °C durante 2 h 30 min. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua (50 ml). La mezcla se extrajo con Et₂O (50 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se extrajeron con HCl ac. 1 N (2 x 30 ml). Las fases acuosas combinadas se basificaron a pH 14 con NaOH ac. al 50 % ac. y se extrajeron con Et₂O (50 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a
25 presión reducida para proporcionar el compuesto del título (885 mg, 34 % durante tres etapas) en forma de un sólido de color amarillo. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,68-7,61 (m, 4H), 7,45 (t, J= 7,5 Hz, 2H), 7,39 (d, J= 7,9 Hz, 2H), 7,37-7,33 (m, 1H), 5,59 (s, 1H), 5,38 (s, 2H), 2,20 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 151,46, 146,77, 140,52, 139,98, 134,32, 129,40, 128,62, 128,09, 127,51, 127,14, 91,23, 48,92, 11,54.

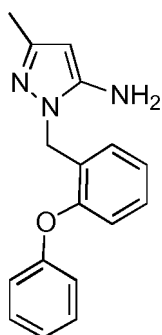


5 **3-Metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazol-5-amina (27)**. Sintetizado usando el procedimiento para **26** excepto que se usó 4-fenoxi-benzaldehído como el aldehído. Se obtuvo el compuesto del título (994 mg, 35 % durante tres etapas) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,38 (dd, *J* = 17,2, 8,5 Hz, 4H), 7,17-7,13 (m, 1H), 7,03-6,98 (m, 4H), 5,58 (s, 1H), 5,32 (s, 2H), 2,19 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 157,12, 156,73, 151,33, 146,70, 130,56, 130,06, 130,04, 124,17, 119,24, 119,12, 91,24, 48,61, 11,51.

Un procedimiento modificado para la síntesis de aminopirazoles a partir de arilaldehídos.

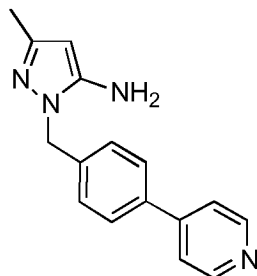


10 **3-Metil-1-(3-fenoxibencil)-1H-pirazol-5-amina (28)** (véase, por ejemplo, Misra, R. N., y col., *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13, 1133-6). A una solución de monohidrato de hidrazina (hidrazina al 78-82 %) (0,80 ml, 16,5 mmol) en THF (3 ml), se le añadió gota a gota crotononitrilo (mezcla de *cis* y *trans*) (1,1 ml, 13,5 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 2 h. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió gota a gota 3-fenoxibenzaldehído (2,14 ml, 12 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida. Al intermedio resultante se le añadió *n*PrOH (10 ml) y la suspensión se transfirió a un recipiente de presión. Se añadió *t*-BuONa (1,41 g, 14,7 mmol) y la mezcla se agitó a 110 °C durante 2 h 30 min. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua (50 ml). La mezcla se extrajo con Et₂O (50 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se extrajeron con HCl ac. 1 N (2 x 30 ml). Las fases acuosas combinadas se basificaron a pH 14 con NaOH ac. al 50 % ac. y se extrajeron con Et₂O (50 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (670 mg, 20 % durante tres etapas) en forma de un aceite de color naranja. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,32 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 7,25 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,10 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 6,98 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 6,85 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 6,80 (s, 1H), 5,37 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 5,10 (s, 2H), 2,17 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 157,81, 156,75, 147,74, 145,05, 139,08, 130,19, 129,75, 123,46, 121,22, 119,04, 117,63, 116,99, 91,65, 50,86, 13,92.

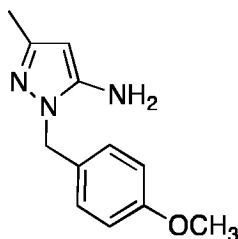


25 **3-Metil-1-(2-fenoxibencil)-1H-pirazol-5-amina (29)**. Sintetizado usando el procedimiento para **28** excepto que se usó 2-fenoxi-benzaldehído como el aldehído. Se obtuvo el compuesto del título (485 mg, 34 % durante tres etapas) en forma de un sólido de color blanquecino. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

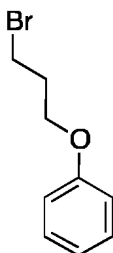
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,34 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7,24-7,17 (m, 2H), 7,12 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,08 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,84 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,32 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 3,63 (s, 2H), 2,17 (s, 3H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 156,75, 153,93, 147,82, 145,11, 129,94, 129,69, 129,09, 127,98, 124,16, 123,61, 118,48, 118,38, 90,68, 45,69, 14,00.



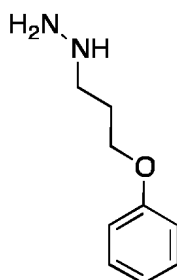
5 **3-Metil-1-(4-(piridm-4-il)benzil)-1H-pirazol-5-amina (30)**. Sintetizado usando el procedimiento para **28** excepto que se usó 4-piridin-4-benzaldehído como el aldehído. Se obtuvo el compuesto del título (274 mg, 20 % durante tres etapas) en forma de un sólido de color blanco. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,63 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H), 7,58 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,45 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H), 7,26 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 5,42 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 3,38 (s, 2H), 2,20 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 150,26, 147,88, 147,72, 144,98, 138,06, 137,49, 127,48, 121,48, 91,83, 50,82, 13,97.



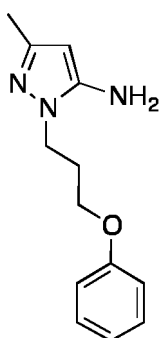
15 **1-(4-Metoxibencil)-3-metil-1H-pirazol-5-amina (31)**. Sintetizado usando el procedimiento para **26** excepto que se usó p-anisalaldehído como el aldehído. Se obtuvo el compuesto del título (910 mg, 42 % durante tres etapas) en forma de un aceite de color amarillo el cual solidificó después de un periodo de reposo. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,09 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,84 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 5,10 (s, 2H), 5,07 (s, 1H), 4,90 (s, 2H), 3,70 (s, 3H), 1,94 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) δ 158,73, 147,58, 146,13, 130,82, 129,05, 114,05, 88,29, 55,49, 49,31, 14,30.



20 **(3-Bromopropoxi)benzeno (32)** (véase, por ejemplo, Martins, A., y col., J Org Chem 2006, 71, 4937-42). Se combinaron 1-fenol (1,03 g, 10,9 mmol), 1,3-dibromopropano (16 ml, 158 mmol) y K_2CO_3 (7,43 g, 53,8 mmol) y se suspendieron en acetona (100 ml). La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 19 h, después, se filtró para retirar la base y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se puso en alto vacío y proporcionó el compuesto del título (1,81 g, 77 %) en forma de un aceite transparente. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,29 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,96 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 4,10 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,61 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 2,37-2,28 (m, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 158,62, 129,48, 120,89, 114,47, 65,12, 32,39, 30,12.

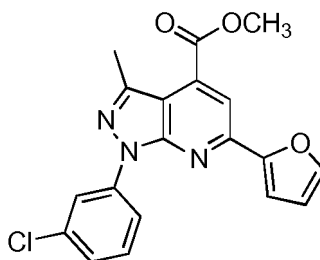


5 **Clorhidrato de (3-fenoxipropil)hidrazina (33)** (véase, por ejemplo, el documento WO2003027074A1). Se disolvió 32 (1,80 g, 8,4 mmol) en EtOH (9 ml) seguido de la adición de monohidrato de hidrazina (hidrazina al 78-82 %) (4,5 ml, 93 mmol). La solución se calentó a 80 °C durante 3 h 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto en bruto se trató con HCl 2 N (7 ml) y diclorometano (4 ml) mientras que se agitaba a temperatura ambiente durante una noche. El producto en bruto se puso a alto vacío para retirar el disolvente y después se usó sin purificación adicional en la siguiente reacción.

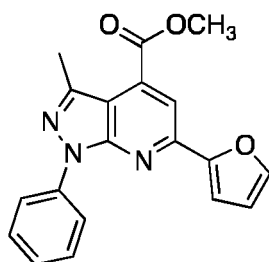


10 **3-Metil-1-(3-fenoxipropil)-1H-pirazol-5-amina (34)**. Sintetizado usando el procedimiento para **22** excepto que se usó **33** como el producto en bruto y como la hidrazina. Después de que la mezcla de reacción se detuviese y se enfriase a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con H₂O y se extrajo con EtOAc (2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (663 mg, 48 % en dos etapas) en forma de un aceite de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,23 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 6,92 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 5,21 (s, 1H), 4,03 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 3,84 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,65 (s, 2H), 2,22-2,14 (m, 2H), 2,11 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 158,19, 147,73, 145,69, 129,59, 121,12, 114,43, 90,07, 63,94, 42,66, 29,16, 13,92.

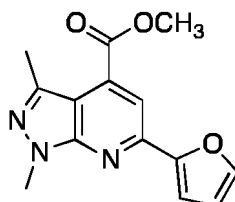
Un procedimiento representativo para la síntesis de ésteres.



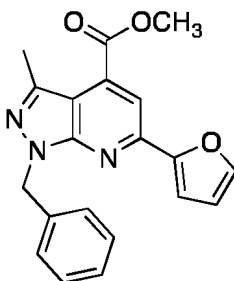
20 **1-(3-Clorofenil)-6-(furan-2-il)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-6]piridin-4-carboxilato de metilo (35)** (véase, por ejemplo, Volochnyuk, D. M., y col., J Comb Chem 2010, 12, 510-7). Una solución de **22** (306 mg, 1,47 mmol) y **20** (295 mg, 1,50 mmol) en AcOH glacial (10 ml) se calentó a reflujo durante 3 h. Cuando la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se formaron precipitados de color amarillo los cuales se filtraron y se lavaron con H₂O. Se colocó la torta de filtro en un horno de vacío para dar el compuesto del título (470 mg, 87 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,48 (s, 1H), 8,29 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,43 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,28-7,23 (m, 2H), 6,63-6,59 (m, 1H), 4,06 (s, 3H), 2,75 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,53, 152,95, 151,82, 148,42, 144,43, 143,32, 140,31, 134,59, 133,91, 129,93, 125,41, 120,77, 118,52, 113,87, 112,57, 112,24, 110,94, 52,73, 16,21.



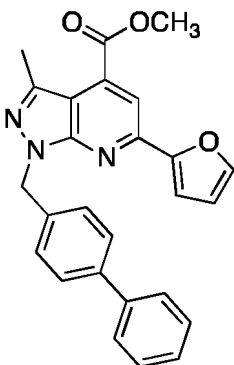
- 5 **6-(Furan-2-yl)-3-metil-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-6]piridin-4-carboxilato de metilo (36).** Sintetizado usando el procedimiento para 35 excepto que se usó 23 como la amina. Después de que la mezcla de reacción se detuviese y se enfriase a temperatura ambiente, se formaron precipitados de color amarillo los cuales se filtraron, se lavaron con H₂O y se secaron en horno de vacío para dar el compuesto del título (971 mg, 97 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 8,05 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,52 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,29 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,23 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 4,04 (s, 3H), 2,76 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 165,73, 153,12, 151,69, 148,28, 144,27, 142,68, 139,24, 133,75, 128,94, 125,73, 121,17, 113,67, 112,45, 111,91, 110,70, 52,68, 16,19.



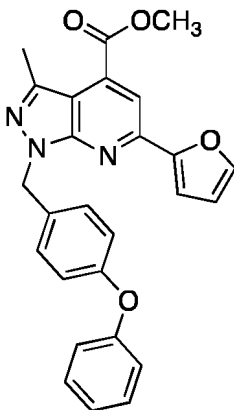
- 10 **6-(Furan-2-yl)-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-6]piridin-4-carboxilato de metilo (37).** Sintetizado usando el procedimiento para 35 excepto que se usó 24 como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (616 mg, 76 %) en forma de un sólido de color rosa claro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,93 (s, 1H), 7,59-7,56 (m, 1H), 7,17 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,55 (dd, *J* = 3,4, 1,7 Hz, 1H), 4,07 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 2,65 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 165,82, 153,11, 152,14, 147,83, 144,15, 140,61, 133,27, 113,10, 112,33, 110,30, 109,86, 52,52, 33,62, 16,00.



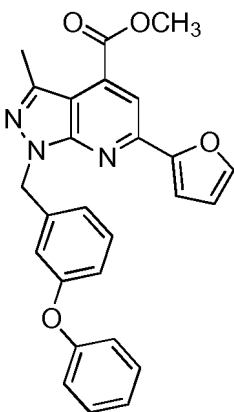
- 20 **1-Bencil-6-(furan-2-yl)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (38).** Sintetizado usando el procedimiento para 35 excepto que se usó 25 como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (97 mg, 9 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,06 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,33 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,28 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,26-7,21 (m, 1H), 7,08-7,04 (m, 1H), 6,61 (dd, *J* = 3,5, 1,8 Hz, 1H), 5,73 (s, 2H), 4,04 (s, 3H), 2,72 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 165,99, 152,08, 150,69, 146,13, 144,45, 141,45, 137,02, 133,86, 128,53, 127,97, 127,62, 114,14, 112,40, 112,23, 111,85, 53,00, 50,45, 16,69.



5 **1-([1,1'-Bifenil]-4-ilmetil)-6-(furan-2-il)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (39)**. Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usó **26** como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (87 mg, 7 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,54 (t, J= 7,5 Hz, 4H), 7,42 (dd, J= 14,2, 7,9 Hz, 4H), 7,32 (t, J= 7,4 Hz, 1H), 7,08 (d, J= 3,4 Hz, 1H), 6,64 (dd, J = 3,4, 1,7 Hz, 1H), 5,79 (s, 2H), 4,07 (s, 3H), 2,76 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 166,00, 152,12, 150,72, 146,21, 144,47, 141,55, 140,79, 140,60, 136,05, 133,93, 128,71, 128,46, 127,33, 127,24, 127,06, 114,20, 112,42, 112,26, 111,92, 53,01, 50,20, 16,71.

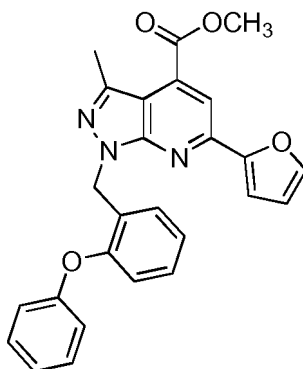


10 **6-(Furan-2-il)-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (40)**. Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usó **27** como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (478 mg, 43 %) en forma de un aceite de color amarillo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,03 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,37 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,30 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 7,08 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,61-6,58 (m, 1H), 5,66 (s, 2H), 4,04 (s, 3H), 2,70 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,91, 157,01, 156,82, 153,27, 152,10, 148,09, 144,18, 141,35, 133,53, 132,00, 129,70, 129,59, 123,29, 118,95, 118,79, 113,33, 112,41, 110,37, 110,19, 52,59, 49,88, 16,12.

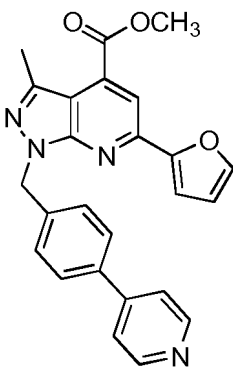


20 **6-(Furan-2-il)-3-metil-1-(3-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (41)**. Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usó **28** como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (563 mg, 82 %) en forma de un aceite de color amarillo viscoso. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,30-7,20 (m, 3H), 7,18-7,14 (m, 1H), 7,09-7,02 (m, 2H), 7,00 (s, 1H), 6,97-6,92 (m, 2H), 6,89-6,83 (m, 1H), 6,57 (s, 1H), 5,65 (s, 2H), 4,03 (s, 3H), 2,69 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 165,89, 157,48, 156,78, 153,17, 152,21, 148,11, 147,73, 144,13, 141,47, 139,13, 133,52, 129,84, 129,66, 123,32, 122,47, 119,03, 118,18, 117,69, 113,36, 112,40, 110,42, 52,59, 50,11, 16,11. IEN EM: m/z 440,1 (M+H)+.

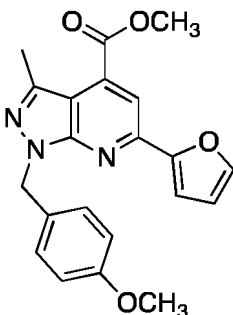
25



5 **6-(Furan-2-yl)-3-metil-1-(2-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (42).** Sintetizado usando el procedimiento para 35 excepto que se usó 29 como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (551 mg, 81 %) en forma de un aceite de color amarillo el cual formó una espuma después de un periodo de reposo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,27-7,18 (m, 3H), 7,13-7,10 (m, 1H), 7,09-7,05 (m, 1H), 7,05-6,99 (m, 2H), 6,90 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 6,56-6,53 (m, 1H), 5,80 (s, 2H), 4,03 (s, 3H), 2,66 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,95, 157,40, 154,05, 153,25, 152,40, 147,97, 144,01, 141,35, 133,34, 129,48, 129,39, 128,98, 128,84, 123,88, 122,70, 119,32, 117,90, 113,19, 112,32, 110,35, 109,99, 52,53, 45,19, 16,09.

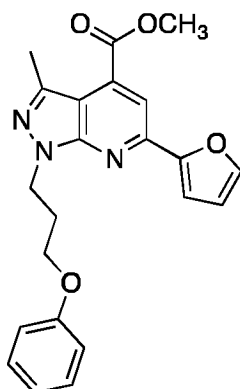


10 **6-(Furan-2-yl)-3-metil-1-(4-(piridin-4-il)bencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (43).** Sintetizado usando el procedimiento para 35 excepto que se usó 30 como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (261 mg, 62 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,64-8,58 (m, 2H), 8,03 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,46 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,45-7,40 (m, 2H), 7,27-7,22 (m, 1H), 6,58 (s, 1H), 5,73 (s, 2H), 4,03 (s, 3H), 2,69 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,84, 153,21, 152,25, 150,19, 148,18, 147,87, 144,21, 141,62, 138,19, 137,46, 133,62, 128,70, 127,21, 121,49, 113,42, 112,40, 110,42, 110,21, 52,59, 50,00, 16,10.

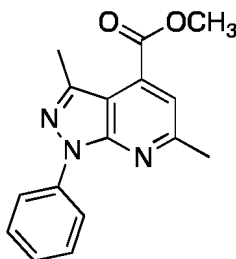


20 **6-(Furan-2-yl)-1-(4-metoxibencil)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (44).** Sintetizado usando el procedimiento para 35 excepto que se usó 31 como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (458 mg, 40 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,00 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,33 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,27- 7,20 (m, 1H), 6,81 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 6,62-6,55 (m, 1H), 5,61 (s, 2H), 4,01 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 2,67 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 165,94, 159,07, 153,31, 152,01, 147,98, 144,10, 141,16, 133,43, 129,45, 129,37, 113,89, 113,22, 112,38, 110,26, 110,17, 55,21, 52,56, 49,93, 16,11.

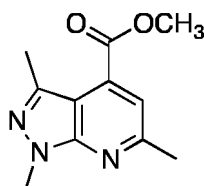
25



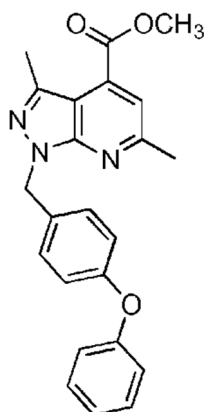
5 **6-(Furan-2-yl)-3-metil-1-(3-fenoxipropil)-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-carboxilato de metilo (45).** Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usó **32** como el pirazol amina. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (388 mg, 35 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,99 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,27-7,21 (m, 2H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 6,55 (dd, $J = 3,3, 1,7$ Hz, 1H), 4,72 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 4,03-4,01 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 2,45 (p, $J = 6,4$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 165,96, 158,82, 153,18, 152,21, 147,93, 144,06, 140,90, 133,39, 129,34, 120,62, 114,52, 113,21, 112,36, 110,29, 110,02, 65,08, 52,57, 43,83, 29,58, 16,06.



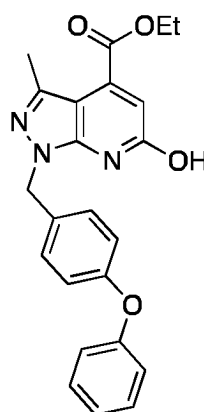
10 **3,6-Dimetil-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-carboxilato de metilo (46).** Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usaron **21** y **23** como los materiales de partida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (309 mg, 36 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,23 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,53-7,46 (m, 3H), 7,31-7,24 (m, 1H), 4,01 (s, 3H), 2,74 (s, 3H), 2,72 (s, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 166,04, 158,80, 151,85, 142,31, 139,23, 132,97, 128,94, 125,77, 121,38, 118,13, 111,10, 52,56, 24,91, 16,15.



20 **1,3,6-Trimetil-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-carboxilato de metilo (47).** Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usaron **21** y **24** como los materiales de partida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (266 mg, 40 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (s, 1H), 4,06 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 2,68 (s, 3H), 2,65 (s, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 166,20, 158,21, 152,29, 140,27, 132,69, 117,38, 109,19, 52,44, 33,61, 24,70, 15,96.

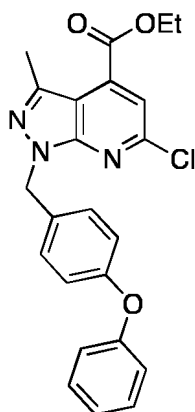


5 **3,6-Dimetil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de metilo (48)**. Sintetizado usando el procedimiento para **35** excepto que se usaron **20** y **27** como materiales de partida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (67 mg, 12 %) en forma de un aceite de color amarillo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,45 (s, 1H), 7,33-7,28 (m, 4H), 7,08 (t, J= 7,4 Hz, 1H), 6,98 (d, J= 7,7 Hz, 2H), 6,92 (d, J= 7,3 Hz, 2H), 5,63 (s, 2H), 4,01 (s, 3H), 2,71 (s, 3H), 2,68 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 166,21, 158,43, 157,06, 156,71, 152,26, 140,98, 132,78, 132,14, 129,68, 129,35, 123,25, 118,91, 118,79, 117,65, 109,33, 52,45, 49,62, 24,77, 16,08.

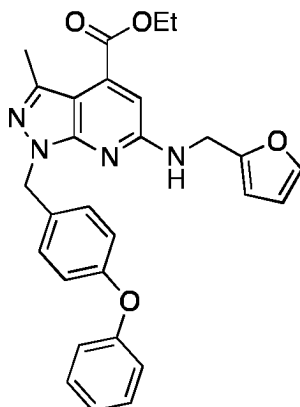


10 **6-Hidroxi-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de etilo (49)** (véase, por ejemplo, Neres, J., y col., J Med Chem 2013, 56, 2385-405). Una solución de sal sódica de oxaloacetato de dietilo (516 mg, 2,46 mmol) y **28** (646 mg, 2,31 mmol) en una mezcla de tolueno: H₂O: AcOH glacial (5 ml/5 ml/0,5 ml) se calentó a 80 °C durante una noche. La mezcla se diluyó con H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto en bruto deseado. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

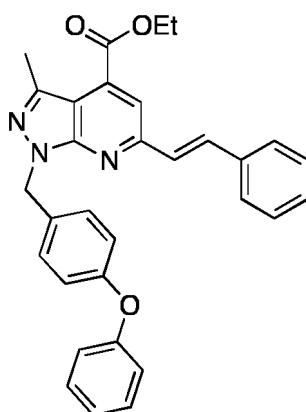
Una suspensión de 2-(5-amino-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazol-4-il)-2-hidroxisuccinato de dietilo (producto en bruto a partir de lo anterior) (2,31 mmol) de x en AcOH glacial (14 ml) se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida tanto como fue posible. Después, se añadió MeOH y el producto cristalizó en forma de un sólido de color blanco que se filtró, se lavó con MeOH frío y se secó en un horno de vacío para proporcionar el compuesto del título (628 mg, 67 % en dos etapas) en forma de un sólido de color castaño. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,40 (d, J= 8,3 Hz, 2H), 7,31 (t, J= 7,3 Hz, 2H), 7,09 (t, J= 7,4 Hz, 1H), 6,97 (d, J= 8,0 Hz, 2H), 6,92 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 6,78 (s, 1H), 5,50 (s, 2H), 4,44 (c, J= 7,1 Hz, 2H), 2,53 (s, 3H), 1,43 (t, J= 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 164,83, 164,75, 157,17, 156,81, 143,45, 143,12, 139,06, 130,59, 129,72, 129,51, 123,43, 119,11, 118,70, 113,27, 103,16, 62,13, 50,60, 15,44, 14,16. IEN EM: m/z 404,1 (M+H)+.



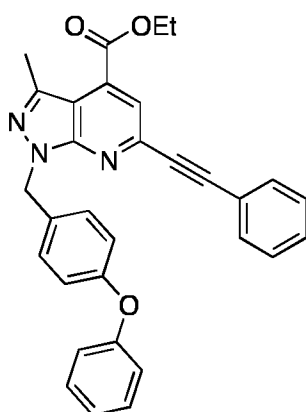
5 **6-Cloro-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-carboxilato de etilo (50)** (véase, por ejemplo, Sercel, A. D., y col., Synthetic Communications 2007, 37, 4199-4208). Se preparó reactivo de Vilsmeier fresco como sigue a continuación: a una solución en agitación de 1,2 DCE (4 ml) se le añadió DMF (0,2 ml, 2,6 mmol). La solución resultante se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota (COCl)₂ (0,22 ml, 2,6 mmol). La suspensión viscosa se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y después se añadió **49** (104 mg, 0,26 mmol) a la mezcla. La suspensión se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (15 ml x 2). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (120 mg, rendimiento cuantitativo) en forma de un aceite de color amarillo. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (s, 1H), 7,31 (t, *J* = 8,2 Hz, 4H), 7,08 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 6,93 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 5,59 (s, 2H), 4,48 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,69 (s, 3H), 1,46 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 164,34, 157,00, 156,91, 151,20, 150,30, 141,77, 135,67, 131,25, 129,71, 129,54, 123,37, 119,00, 118,78, 117,69, 110,41, 62,31, 50,03, 16,16, 14,20.



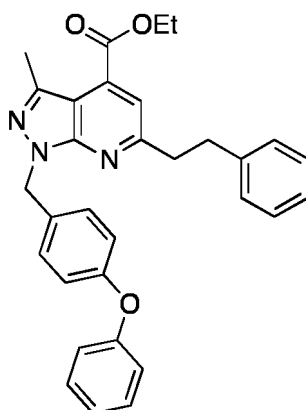
15 **6-((Furan-2-ilmetil)amino)-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-6]piridin-4-carboxilato de etilo (51)** (véase, por ejemplo, el documento WO2013039988A1). Se cargó un recipiente de presión con **50** (119 mg, 0,28 mmol), 2-aminometilfuran (0,12 ml, 1,36 mmol) y iPrOH (4 ml). El recipiente se cerró herméticamente y la mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante una noche. Se añadió 1 ml adicional (11,3 mmol) de amina y la mezcla se calentó a 150 °C durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (15 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (40 mg, 30 %) en forma de un aceite de color naranja. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36-7,24 (m, 5H), 7,07 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,91 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,80 (s, 1H), 6,30 (s, 1H), 6,22 (s, 1H), 5,47 (s, 2H), 5,14 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,68 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 4,43 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,58 (s, 3H), 1,42 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 165,83, 157,16, 156,86, 156,51, 152,16, 152,06, 141,97, 141,27, 134,71, 132,57, 129,67, 129,44, 123,17, 118,82, 110,40, 107,27, 106,91, 104,45, 61,66, 49,53, 38,75, 16,15, 14,23. IEN EM: *m/z* 483,1 (M+H)⁺.



5 **3-Metil-1-(4-fenoxibencil)-6-estiril-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de (E)-etilo (52)** (véase, por ejemplo, Greig, I. R., y col., J Med Chem 2006, 49, 7487-92; Li, X., y col., J Med Chem 2003, 46, 5663-73). A una mezcla de 50 (205 mg, 0,49 mmol), Pd(PPh₃)₄ (27 mg, 0,02 mmol) y ácido (E)-2-fenilvinilborónico (112 mg, 0,74 mmol) en 1,4-dioxano:H₂O (3 ml/2 ml) se le añadió Na₂CO₃ (153 mg, 1,45 mmol), seguido de agitación a 90 °C durante una noche. A la mezcla de reacción se le añadió H₂O (10 ml) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (10 ml x 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (216 mg, 90 %) en forma de un aceite de color amarillo claro el cual solidificó después de un periodo de reposo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (d, J = 16,1 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,63 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,41 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,39-7,33 (m, 3H), 7,30 (t, J = 7,7 Hz, 3H), 7,07 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,95 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 5,69 (s, 2H), 4,51 (c, J = 7,1 Hz, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,49 (t, J = 7,0 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,76, 157,04, 156,79, 154,93, 152,39, 141,19, 136,28, 134,74, 133,60, 132,13, 129,69, 129,50, 128,81, 127,69, 127,33, 123,28, 118,94, 118,82, 116,48, 110,28, 61,93, 49,80, 16,30, 14,30.



15 **3-Metil-1-(4-fenoxibencil)-6-(feniletinil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de etilo (53)** (véase, por ejemplo, Dai, W., y col., Org Lett 2006, 8, 4665-7). Una mezcla de 50 (95 mg, 0,22 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (16 mg, 0,02 mmol) y Cul (8,6 mg, 0,04 mmol) en Et₃N (0,5 ml) y THF seco (1 ml) se añadió gota a gota a una solución de fenilacetileno (40 µl, 0,36 mmol) en Et₃N (0,5 ml) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó durante una noche después se diluyó con EtOAc (10 ml) y se lavó con NH₄Cl acuoso saturado (15 ml x 2) y salmuera (15 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró, se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para dar el compuesto del título (33 mg, 31 %) en forma de un aceite de color naranja. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (s, 1H), 7,68-7,63 (m, 2H), 7,42-7,37 (m, 3H), 7,35-7,29 (m, 4H), 7,08 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,68 (s, 2H), 4,50 (c, J = 7,1 Hz, 2H), 2,72 (s, 3H), 1,47 (t, J = 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,08, 157,02, 156,83, 152,00, 141,84, 141,44, 133,56, 132,20, 131,77, 129,69, 129,47, 129,36, 128,45, 123,28, 121,86, 121,06, 118,94, 118,81, 110,56, 90,88, 88,87, 62,09, 49,81, 16,24, 14,26.

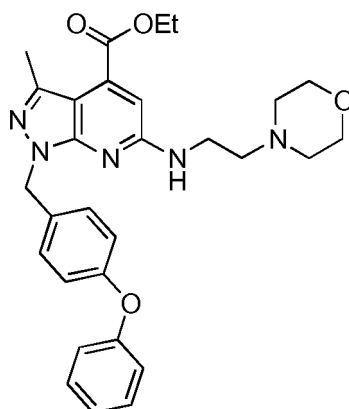


5 **3-Metil-6-fenetil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de etilo (54)** (véase, por ejemplo, el documento WO2013039988A1). A una suspensión de Pd al 10 %/C (70 mg) en EtOH (5 ml) se le añadió **52** (186 mg, 0,38 mmol) disuelto en THF (1,5 ml). La suspensión se agitó en una atmósfera de hidrógeno (aprox. 1 atm, globo) durante una noche. La suspensión se filtró a través de un lecho de celite y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (159 mg, 84 %) en forma de un aceite de color pardo claro. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,44 (s, 1H), 7,36-7,31 (m, 3H), 7,31-7,26 (m, 3H), 7,26-7,22 (m, 2H), 7,19 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,09 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 6,95 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 5,67 (s, 2H), 4,49 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,35-3,27 (m, 2H), 3,24-3,17 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 1,47 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 165,85, 161,09, 157,08, 156,78, 152,23, 141,30, 140,97, 133,36, 132,21, 129,72, 129,55, 128,49, 128,41, 126,04, 123,30, 118,95, 118,80, 117,33, 109,68, 61,83, 49,83, 39,82, 35,23, 16,31, 14,30. IEN EM: m/z 516,9 (M+H)+.

10

10

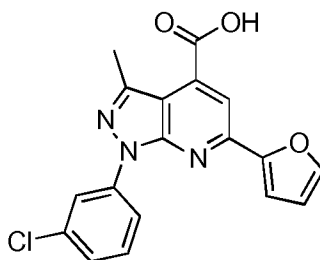
10



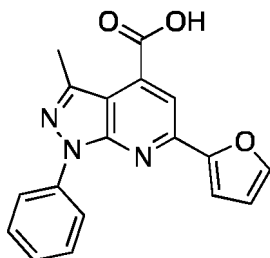
15 **3-Metil-6-(2-morfolinoetil)amino-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxilato de etilo (55)** (véase, por ejemplo, el documento WO2013039988A1). Se cargó un recipiente de presión con **50** (121 mg, 0,29 mmol), 4-(2-aminoetil)morfolina (1,0 ml, 7,6 mmol) e iPrOH (3 ml) y NMP (1 ml). El recipiente se cerró herméticamente y la mezcla de reacción se calentó a 150 °C durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 ml) y se lavó con H₂O (10 ml x 3) para retirar NMP. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (40 mg, 26 %) en forma de un aceite de color amarillo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,29 (c, *J* = 7,1, 6,6 Hz, 4H), 7,07 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,91 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,78 (s, 1H), 5,46 (s, 2H), 4,43 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,76-3,70 (m, 4H), 3,55 (c, *J* = 5,0 Hz, 2H), 2,63 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,58 (s, 3H), 2,49 (s, 4H), 1,42 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 166,00, 157,47, 157,15, 156,51, 152,39, 141,23, 134,44, 132,67, 129,66, 129,31, 123,18, 118,83, 118,77, 107,03, 103,90, 66,92, 61,62, 57,03, 53,40, 49,37, 37,75, 16,16, 14,26.

25

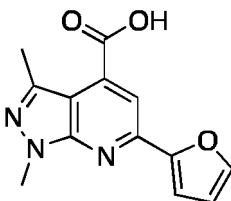
Un procedimiento representativo para la síntesis de ácidos carboxílicos.



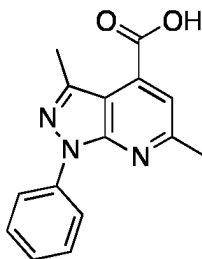
5 **Ácido 1-(3-clorofenil)-6-(furan-2-il)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (1)** (véase, por ejemplo, Volochnyuk, D. M., y col., J Comb Chem 2010, 12, 510-7). Una solución de éster **35** (108 mg, 0,29 mmol) y KOH (29 mg, 0,52 mmol) en iPrOH (6 ml) se calentó a reflujo durante 1 h 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml) y se lavó con EtOAc (10 ml x 2). La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc (10 ml x 2). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **1** (88 mg, 86 %) en forma de un sólido de color amarillo brillante. 99 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,35 (s, 1H), 8,29 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,55 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,37-7,31 (m, 2H), 6,76-6,71 (m, 1H), 2,62 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 166,48, 152,40, 151,70, 148,29, 146,21, 143,65, 140,42, 136,54, 133,86, 131,32, 125,57, 119,83, 118,66, 113,69, 113,32, 112,21, 112,10, 16,20. IEN EM: m/z 354,0 (M+H)⁺.



15 **Ácido 6-(furan-2-il)-3-metil-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (2)**. Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **36** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (288 mg, 90 %) en forma de un sólido de color blanco. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,26 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,95 (s, 2H), 7,55 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,32 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,73 (s, 1H), 2,65 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 166,68, 152,54, 151,60, 148,24, 146,07, 142,86, 139,27, 136,37, 129,60, 126,17, 120,94, 113,46, 113,27, 112,07, 111,82, 16,17. IEN EM: m/z 320,1 (M+H)⁺.

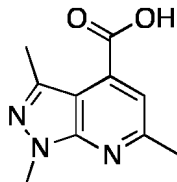


20 **Ácido 6-(furan-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (3)**. Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **37** como el material de partida. Después del tratamiento y la acidificación de la capa acuosa con HCl 1 N, el sólido precipitó, el cual se retiró por filtración y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto del título (203 mg, 79 %) en forma de un sólido de color beis. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,91 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,33 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 6,72-6,67 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 2,55 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 166,91, 152,73, 152,00, 147,61, 145,67, 140,08, 135,59, 113,13, 112,56, 111,40, 109,74, 33,82, 15,92. IEN EM: m/z 258,0 (M+H)⁺.

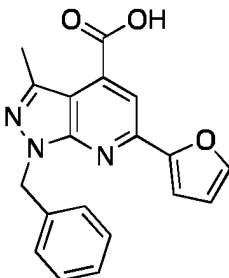


Ácido 3,6-dimetil-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (4). Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **46** como el material de partida. Después del tratamiento y la acidificación de la capa

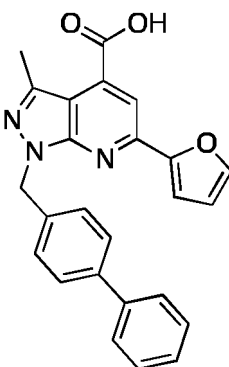
acuosa con HCl 1 N, el sólido precipitó, el cual se retiró por filtración y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto del título (165 mg, 81 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,90 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,56-7,48 (m, 3H), 7,29 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 2,65 (s, 3H), 2,63 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 167,04, 159,52, 151,67, 142,43, 139,35, 135,32, 129,49, 126,12, 121,13, 118,29, 111,04, 24,92, 16,12. IEN EM: *m/z* 268,1 (M+H)⁺.



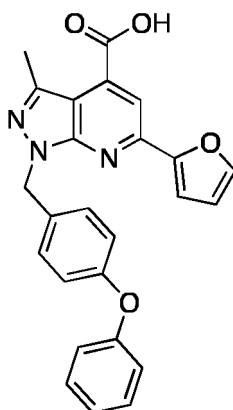
Ácido 1,3,6-trimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (12). Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **47** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (157 mg, 84 %) en forma de un sólido de color blanco. 95 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,37 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 2,60 (s, 3H), 2,53 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 167,25, 158,47, 152,04, 139,56, 134,57, 117,22, 108,94, 33,73, 24,66, 15,89. IEN EM: *m/z* 206,1 (M+H)⁺.



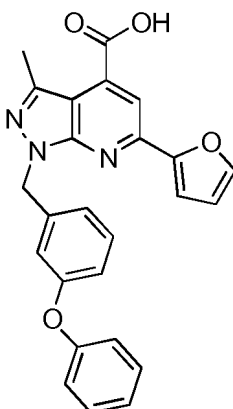
Ácido 1-bencil-6-(furan-2-il)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (6). Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **38** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (67 mg, rendimiento cuantitativo) en forma de un sólido de color amarillo claro. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,08-8,03 (m, 1H), 8,03-7,98 (m, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,33-7,27 (m, 2H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,78 (s, 1H), 5,67 (s, 2H), 2,65 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166,49, 151,92, 150,08, 147,52, 146,28, 140,99, 137,81, 133,82, 128,98, 127,93, 113,74, 113,56, 113,34, 110,95, 50,03, 16,86. IEN EM: *m/z* 334,2 (M+H)⁺.



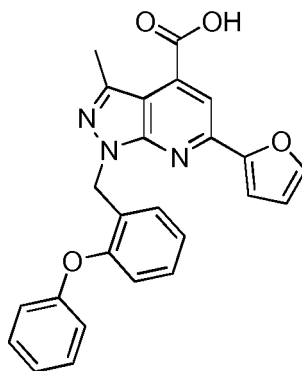
Ácido 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-6-(furan-2-il)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (7). Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **39** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (58 mg, 87 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,47 (s, 1H), 8,04 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 7,4 Hz, 5H), 7,45-7,39 (m, 3H), 7,33 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H), 6,78 (s, 1H), 5,72 (s, 2H), 2,67 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166,48, 151,95, 150,09, 147,53, 146,30, 141,05, 140,19, 139,91, 136,98, 133,86, 129,34, 128,57, 127,89, 127,35, 127,07, 113,77, 113,60, 113,35, 111,00, 49,75, 16,89. IEN EM: *m/z* 410,2 (M+H)⁺.



5 **Ácido 6-(furan-2-il)-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (8).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **40** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (63 mg, 43 %) en forma de un sólido de color naranja. 99 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,94 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,40 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,34 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,10 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,95 (t, *J* = 8,1 Hz, 4H), 6,74-6,71 (m, 1H), 5,61 (s, 2H), 2,59 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166,87, 156,95, 156,51, 152,71, 151,97, 147,92, 145,83, 140,95, 135,93, 132,85, 130,46, 129,94, 123,92, 119,10, 119,04, 113,21, 112,86, 111,69, 109,96, 49,50, 16,04. IEN EM: *m/z* 426,0 (M+H)⁺.

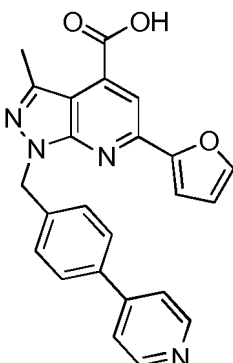


10 **Ácido 6-(furan-2-il)-3-metil-1-(3-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (9).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **41** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (84 mg, 86 %) en forma de un sólido de color naranja claro. 99 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,91 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,33-7,26 (m, 4H), 7,09 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,88 (s, 1H), 6,85 (d, *J* = 9,8 Hz, 1H), 6,72-6,69 (m, 1H), 5,60 (s, 2H), 2,56 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166,83, 157,39, 156,47, 152,64, 152,08, 147,91, 145,80, 141,07, 140,01, 135,92, 130,63, 130,41, 124,11, 122,72, 119,34, 117,73, 117,65, 113,17, 112,89, 111,65, 109,95, 49,77, 16,01. IEN EM: *m/z* 426,2 (M+H)⁺.

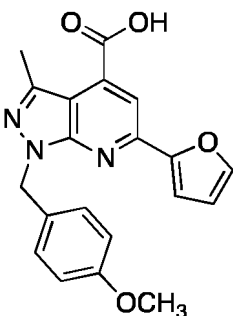


20 **Ácido 6-(furan-2-il)-3-metil-1-(2-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (10).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **42** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (86 mg, rendimiento cuantitativo) en forma de un aceite de color amarillo el cual solidificó después de un periodo de reposo. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,88 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,31-7,20 (m, 4H), 7,11-7,06 (m, 2H), 7,01 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,89 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,80 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 6,70-6,66

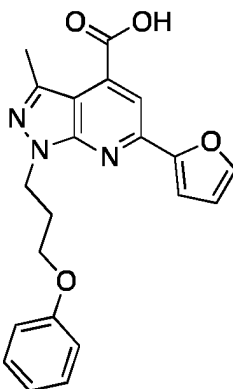
(m, 1H), 5,65 (s, 2H), 2,53 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,84, 157,37, 153,97, 152,72, 152,16, 147,73, 145,69, 140,97, 135,69, 130,19, 130,12, 129,76, 129,16, 124,60, 123,28, 119,94, 117,86, 113,11, 112,76, 111,43, 109,86, 45,04, 16,02. IEN EM: m/z 426,1 (M+H) $^+$.



- 5 **Ácido 6-(furan-2-il)-3-metil-1-(4-(piridin-4-il)benzil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (11).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **43** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (31 mg, 32 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,68 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 7,94 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,85-7,80 (m, 3H), 7,79 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,40 (s, 2H), 6,74-6,70 (m, 1H), 5,71 (s, 2H), 2,59 (s, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 166,85, 152,65, 152,12, 149,44, 148,39, 147,99, 145,89, 141,18, 139,74, 136,00, 128,91, 127,90, 122,31, 113,22, 112,97, 111,79, 109,99, 49,69, 16,06. IEN EM: m/z 411,1 (M+H) $^+$.



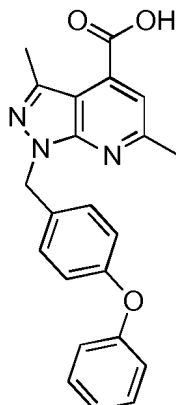
- 15 **Ácido 6-(furan-2-il)-1-(4-metoxibenzil)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (12).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **44** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (158 mg, 99 %) en forma de un sólido de color blanquecino. 100 % puro mediante HPLC. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,92 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,24 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 6,85 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 6,72 (s, 1H), 5,54 (s, 2H), 3,68 (s, 3H), 2,57 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,90, 159,13, 152,77, 151,87, 147,81, 145,78, 140,74, 135,94, 129,79, 129,59, 114,35, 113,19, 112,74, 111,58, 109,96, 55,49, 49,63, 16,01. IEN EM: m/z 364,2 (M+H) $^+$.



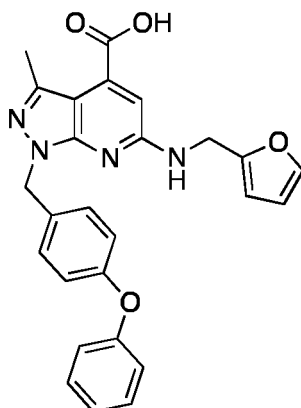
- 20 **Ácido 6-(furan-2-il)-3-metil-1-(3-fenoxipropil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (13).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **45** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (122 mg, 81 %) en forma de un sólido de color amarillo. 99 % puro mediante HPLC. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,91 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,25-7,16 (m, 3H), 6,90-6,81 (m, 3H), 6,70-6,63 (m, 1H), 4,58 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,97 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,57 (s, 3H), 2,35-2,24 (m, 2H). RMN ^{13}C (101 DMSO- d_6) δ 166,93, 158,83, 152,70, 152,02, 147,61, 145,64, 140,43, 135,68, 129,81, 120,92, 114,83, 113,10, 112,66, 111,37, 109,87, 65,17, 43,71, 29,32,

25

16,04. IEN EM: m/z 378,2 (M+H)⁺.



5 **Ácido 3,6-dimetil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (14).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **48** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (11 mg, 20 %) en forma de un sólido de color blanquecino. 97 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,42 (s, 1H), 7,34 (t, *J*= 7,6 Hz, 2H), 7,22 (d, *J*= 8,1 Hz, 2H), 7,10 (t, *J*= 6,8 Hz, 1H), 6,98-6,88 (m, 4H), 5,55 (s, 2H), 2,63 (s, 3H), 2,55 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 167,28, 158,92, 156,97, 156,39, 152,02, 140,48, 133,05, 130,46, 129,66, 123,90, 119,09, 119,00, 117,53, 109,99, 109,14, 49,25, 24,80, 15,98. IEN EM: m/z 374,0 (M+H)⁺.

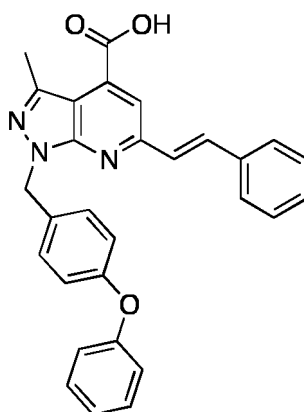


10 **Ácido 6-((furan-2-ilmetil)amino)-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (15)** (véase, por ejemplo, Neres, J., y col., J Med Chem 2013, 56, 2385-405). Una solución de éster **51** (40 mg, 0,08 mmol) y NaOH 1 N (3,5 ml, 3,5 mmol) en THF (1,5 ml) se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (10 ml) y se lavó con EtOAc (10 ml x 2). La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc (10 ml x 2). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se filtraron. El disolvente se retiró a presión reducida para dar el compuesto del título (22 mg, 61 %) en forma de un sólido de color naranja. 99 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,79 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,34 (t, *J*= 7,6 Hz, 2H), 7,27 (d, *J*= 8,1 Hz, 2H), 7,10 (t, *J*= 6,8 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,33 (s, 1H), 6,25 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 4,57 (d, *J*= 5,2 Hz, 2H), 2,41 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 167,35, 157,85, 157,05, 156,29, 153,26, 152,02, 142,37, 140,38, 135,41, 133,48, 130,46, 130,44, 130,08, 123,85, 118,98, 118,97, 110,81, 107,38, 103,37, 49,09, 37,87, 15,96. IEN EM: m/z 455,0 (M+H)⁺.

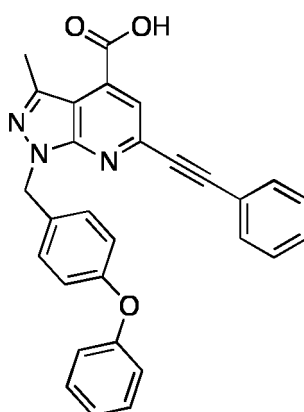
15

20

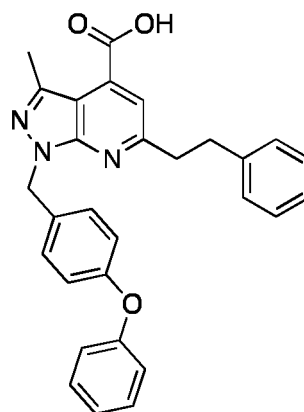
Un procedimiento modificado para la síntesis de ácidos carboxílicos.



5 **Ácido (E)-3-metil-1-(4-fenoxibencil)-6-stiril-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (16).** Una solución de éster **52**
 (56 mg, 0,11 mmol) y KOH (19 mg, 0,34 mmol) en iPrOH:THF (2 ml/1 ml) se calentó a reflujo a 87 °C durante 2 h. La
 mezcla de reacción se diluyó con agua (10 ml) y se lavó con EtOAc (10 ml x 2). La capa acuosa se acidificó con HCl
 1 N y se extrajo con EtOAc (10 ml x 2). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron
 10 (Na₂SO₄) y se filtraron. El disolvente se retiró a presión reducida para dar el compuesto del título (45 mg, 94 %) en
 forma de un sólido de color amarillo. 88 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,86 (s, 1H), 7,87
 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,74 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,42 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,37-7,29
 (m, 5H), 7,09 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,98-6,92 (m, 4H), 5,64 (s, 2H), 2,58 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 167,16,
 156,97, 156,47, 155,22, 152,20, 140,74, 136,47, 135,39, 134,92, 133,00, 130,46, 129,90, 129,30, 128,04, 127,87,
 123,90, 119,11, 119,02, 116,60, 110,13, 49,41, 16,02. IEN EM: m/z 462,0 (M+H)⁺.

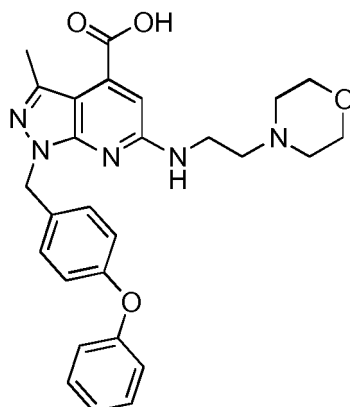


15 **Ácido 3-metil-1-(4-fenoxibencil)-6-(feniletinil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-carboxílico (17).** Sintetizado usando el
 procedimiento para **16** excepto que se usó el éster **53** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título
 (13 mg, 39 %) en forma de un sólido de color pardo claro. 98 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆)
 δ 7,75 (s, 1H), 7,69 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,51-7,45 (m, 3H), 7,35 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,24 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,10 (t, J =
 6,9 Hz, 1H), 6,96 (t, J = 8,4 Hz, 4H), 5,63 (s, 2H), 2,61 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166,45, 156,94, 156,51,
 151,85, 141,39, 141,14, 132,72, 132,43, 130,46, 130,35, 129,62, 129,37, 123,93, 121,34, 120,69, 119,13, 119,05,
 110,56, 90,88, 89,26, 49,53, 15,97. IEN EM: m/z 460,0 (M+H)⁺.



20

5 **Ácido 3-metil-6-fenetil-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-carboxílico (18).** Sintetizado usando el procedimiento para **16** excepto que se usó el éster **54** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (67 mg, 91 %) en forma de un sólido de color blanco. 96 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,75 (s, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,34 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,24 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,22-7,17 (m, 4H), 7,11 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 6,95 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,91 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 5,57 (s, 2H), 3,24 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,09 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,55 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,24, 161,61, 156,94, 156,49, 151,91, 141,54, 140,43, 134,92, 132,98, 130,46, 129,89, 128,85, 128,64, 126,26, 123,95, 119,08, 119,00, 117,34, 109,43, 49,45, 34,84, 15,99. IEN EM: m/z 464,1 (M+H)⁺.



10 **Ácido 3-metil-6-((2-morfolinetil)amino)-1-(4-fenoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-carboxílico (19).** Sintetizado usando el procedimiento para **1** excepto que se usó el éster **55** como el material de partida. Se obtuvo el compuesto del título (35 mg, 89 %) en forma de un sólido de color blanco. 100 % puro mediante HPLC. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,50 (s, 1H), 11,03 (s, 1H), 7,79-7,71 (m, 1H), 7,39-7,32 (m, 2H), 7,32-7,26 (m, 2H), 7,14-7,07 (m, 1H), 6,99-6,90 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,05-3,97 (m, 2H), 3,84-3,73 (m, 3H), 3,40-3,26 (m, 3H),
15 2,42 (s, 3H), 1,97 (s, 2H), 1,19-1,12 (m, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,26, 157,73, 157,04, 156,29, 151,98, 140,48, 135,53, 133,48, 130,47, 129,99, 123,88, 119,05, 118,97, 107,78, 103,53, 63,55, 60,20, 55,24, 51,64, 49,09, 21,22, 16,00, 14,54. IEN EM: m/z 488,0 (M+H)⁺.

Purificación de proteínas

20 Las proteínas marcadas con His que contienen Mcl-1 (restos 171-327), Bcl-2 (restos 1-202 con la secuencia de Bcl-X_L insertada desde los restos 35 a 50), Bcl-X_L (restos 1-209 que carecen de su dominio transmembrana C-terminal con una delección de la región de bucle flexible 45-85) se expresaron a partir del vector pHis-TEV (un vector pET modificado) en células *E. coli* BL21 (DE3). Las células se cultivaron a 37 °C en 2xYT que contenían antibióticos hasta una densidad DO₆₀₀ de 0,6. La expresión de la proteína se indujo mediante IPTG 0,4 mM a 37 °C durante 4 horas. Las células se lisaron en tampón Tris 50 mM a pH 8,0 que contenía NaCl 500 mM, 0,1 % de bME y 40 μl de leupeptina/aprotina. Todas las proteínas se purificaron a partir de la fracción soluble usando resina Ni-NTA (QIAGEN),
25 siguiendo las instrucciones del fabricante. Mcl-1 se purificó adicionalmente en una columna Source Q15 (Amersham Biosciences) en tampón Tris 25 mM a pH 8,0, con gradiente de NaCl. Bcl-2 y Bcl-X_L se purificaron en una columna Superdex75 (Amersham Biosciences) en tampones Tris 25 mM a pH 8,0 que contenían NaCl 150 mM y DTT 2 mM y a -80 °C en presencia de glicerol al 25 %.

30 Determinación de los valores de K_d de sondas fluorescentes a proteínas antiapoptóticas

El péptido BID BH3 (Bcl-2 Homología 3) marcado con fluoresceína se usó como una sonda fluorescente en los ensayos de unión basados en FP. Se usaron dos sondas de péptidos BID BH3 marcados con fluorescencia: i) péptido BID marcado con fluoresceína (Flu-BID), marcado con fluoresceína en el extremo N del péptido BH3 (79-99); ii) el segundo rastreador se adquirió de Abgent (n.º de catálogo SP2121a), denominado FAM-BID, donde el péptido BH3 (80-99)
35 está marcado con 5-FAM. Sus valores de K_d se determinaron para todos los miembros de las proteínas de la familia Bcl-2 con una concentración fija del marcador (2 nM de Flu-BID y FAM-BID) y diferentes concentraciones de las proteínas analizadas, en un volumen final de 125 μl en el tampón de ensayo (fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % Pluronic F68 y 4 % DMSO). Las placas se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y los valores de polarización en unidades de milipolarización (mP) se midieron a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Las constantes de disociación de equilibrio (K_d) se calcularon ajustando los aumentos sigmoideos de FP dependientes de la dosis en función de las concentraciones de proteínas utilizando el software Graphpad Prism 6.0. Basado en el análisis de los intervalos dinámicos para las señales y sus valores de K_d, Flu-BID se seleccionó como el marcador en el ensayo de unión competitiva Mcl-1, mientras que FAM-BID se seleccionó como el rastreador de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL. El valor de K_d de Flu-BID para Mcl-1 fue de 2,3 ± 0,3 nM, y los valores de K_d de FAM-BID contra Bcl-2 fueron 14,2 ± 1,0 nM y para Bcl-xL fueron
45 24,1 ± 7,6 nM, respectivamente, en los experimentos de saturación de los inventores.

Ensayos de unión basados en polarización de fluorescencia

Se desarrollaron y optimizaron ensayos de unión basados en FP sensibles y cuantitativos para determinar las afinidades de unión de los inhibidores de molécula pequeña a las proteínas recombinantes Mcl-1, A1/Bfl-1, Bcl-w, Bcl-2 y Bcl-xL. Las concentraciones de las proteínas utilizadas en los experimentos de unión competitiva fueron 10 nM para Mcl-1, 80 nM para Bcl-xL y 60 nM para Bcl-2. Las sondas fluorescentes, Flu-BID o FAM-BID se fijaron a 2 nM para todos los ensayos, que se une con valores de K_d de 2,3 nM, 14,2 nM y 24,1 nM contra Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-xL, respectivamente. Se añadieron 5 μ l del compuesto probado en DMSO y 120 μ l del complejo proteína/sonda en el tampón de ensayo (fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % de Pluronic F68) a placas de ensayo negras de 96 pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas y los valores de polarización (mP) se midieron a una longitud de onda de excitación a 485 nm y una longitud de onda de emisión a 530 nm utilizando el lector de placas Synergy H1 Hybrid, BioTek. Los valores de CI_{50} se determinaron por ajuste de regresión no lineal de las curvas de competencia (Software GraphPad Prism 6.0). Los valores de K_i se calcularon como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Nikolovska-Coleska, Z., y col., Anal Biochem 2004, 332, 261-73).

Modelización molecular

La estructura cristalina de Mcl-1 en complejo con el péptido mNoxa BH3 (entrada PDB 2NLA) y el IFD de Schrödinger *in silico* se usaron para modelar las posturas de unión de nuestros compuestos diseñados con Mcl-1. IFD permite la incorporación de la proteína y la flexibilidad del ligando en el protocolo de acoplamiento, que consiste en las siguientes etapas: (i) minimización restringida de la proteína con un corte de RMSD de 0,18 Å; (ii) acoplamiento de Glide inicial del ligando usando un potencial suavizado (escala de radios de Van der Waals); (iii) una ronda de predicción de la cadena lateral Prime para cada complejo proteína/ligando, en restos dentro de la distancia definida de cualquier posición de ligando; (iv) minimización primaria del mismo conjunto de restos y el ligando para cada posición del complejo proteína/ligando; (v) Reacoplamiento de Glide de cada estructura del complejo de proteína/ligando dentro de una energía especificada de la estructura de energía más baja; (vi) estimación de la energía de unión (IFDScore) para cada posición de salida. Todos los cálculos de acoplamiento se ejecutaron en el modo de precisión adicional (XP) de Glide. El centro de la cuadrícula de la Mcl-1 estaba definido por la Val 249 (en h1), la Phe 270 (en h2), la Val 220 (en h3/h4) y la Val 216 (en h4). El tamaño del cuadro de la cuadrícula se estableció en 15 Å. Los valores predeterminados se utilizaron para todos los demás parámetros. La simulación dinámica de MC/SD de Schrödinger realiza cálculos de temperatura constantes que aprovechan las fortalezas de los procedimientos de Monte Carlo para introducir rápidamente grandes cambios en unos pocos grados de libertad y dinámica estocástica para su muestreo local efectivo de movimientos colectivos. El tiempo de simulación dinámica MC/SD en el estudio de los inventores se ajustó a 100 ps al permitir el movimiento del ligando acoplado y los restos que es inferior a 6 Å al ligando. El campo de fuerza utilizado se estableció en OPLS_2001. Los valores predeterminados se utilizaron para todos los demás parámetros.

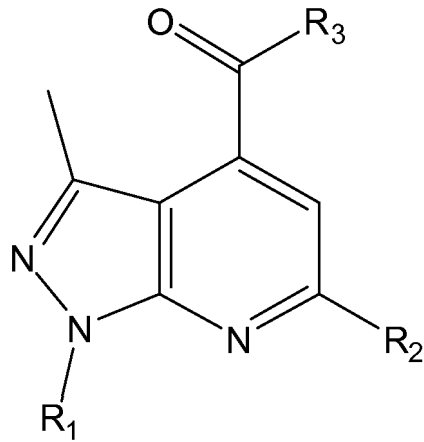
Estudios de RMN

Las proteínas Mcl-1 marcadas con ^{15}N o ^{13}C , marcadas con ^{13}C para estudios de RMN se prepararon y se purificaron usando el mismo protocolo que para la proteína sin marcar, con la excepción de que las bacterias se cultivaron en medios mínimos M9 soportados con 3 g/l de ^{13}C -glucosa y/o 1 g/l de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El Mcl-1 marcado con ^{15}N y ^{13}C se usó para la reasignación de la columna vertebral y el 80 % de los residuos se reasignaron en base al trabajo de Liu y *col*²⁶. Se prepararon muestras de proteínas en una solución de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM y DTT 1 mM a pH 7 en D_2O al 7 %. El modo de unión de los compuestos se ha caracterizado por registrar experimentos ^1H , ^{15}N -HSQC con una solución de 138 μ l de Mcl-1 uniformemente marcado con ^{15}N (75 μM) en ausencia y presencia de compuestos añadidos con las concentraciones de relación molar indicadas. Todos los espectros se adquirieron a 30 °C en un espectrómetro de RMN Bruker de 600 MHz equipado con una sonda criogénica, se procesaron usando Bruker TopSpin y rNMR²⁵ y se analizaron con Sparky²⁷. Los gráficos de los cambios de desplazamiento químico se calcularon como $((\Delta^1\text{H ppm})^2 + (0,2 (\Delta^{15}\text{N ppm}))^2)^{0,5}$ de Mcl-1 amida tras la adición del compuesto. La ausencia de una barra en un gráfico de desplazamiento químico indica que no hay diferencia de desplazamiento químico, o la presencia de una prolina o residuo que se superpone o no se asigna.

Habiendo descrito ahora completamente la invención, los expertos en la materia entenderán que puede realizarse dentro de un amplio y equivalente intervalo de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar el ámbito de la invención o cualquier realización de la misma.

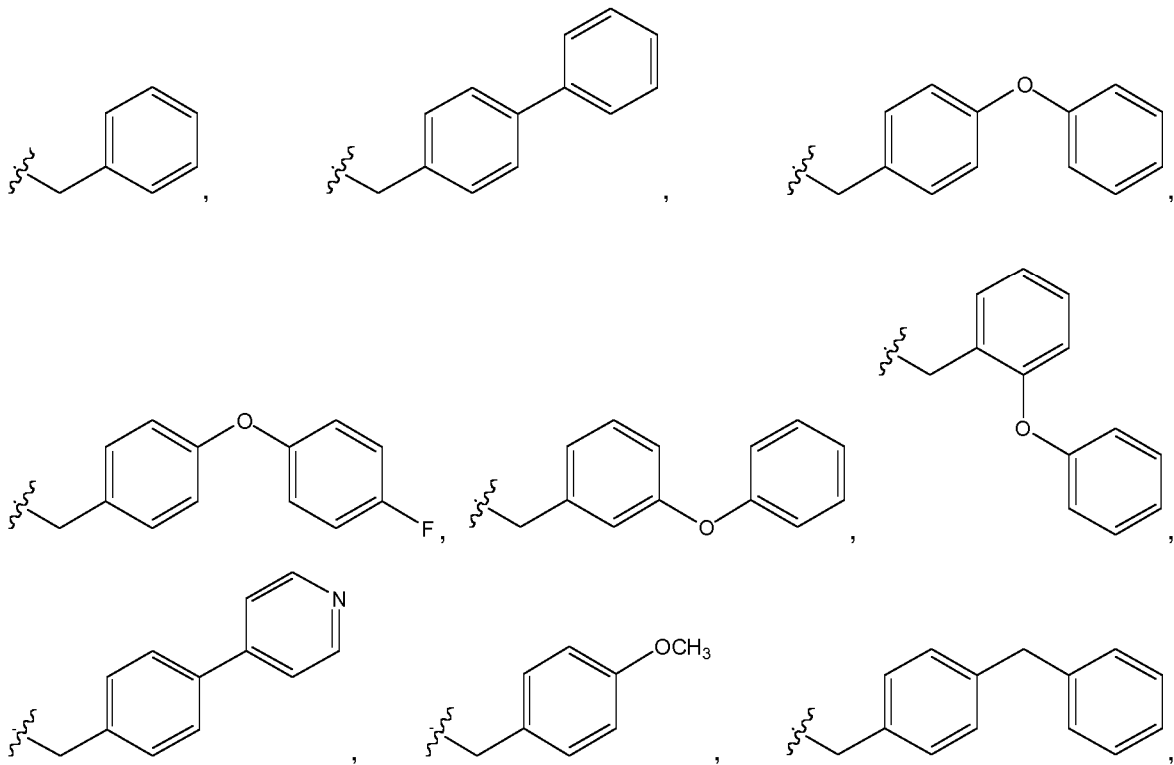
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de Fórmula I:

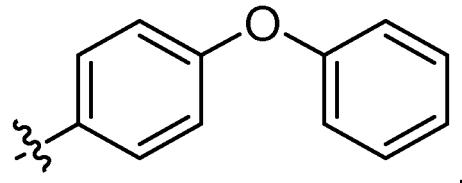
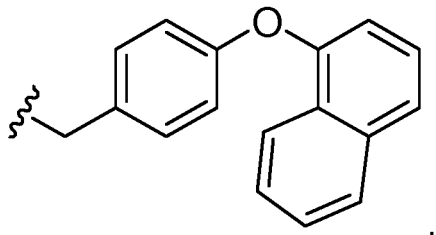
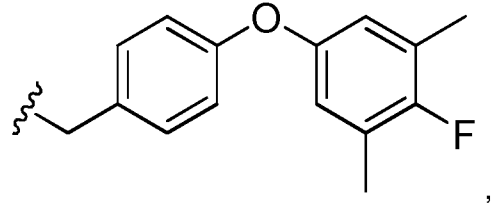
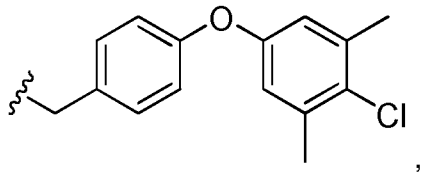
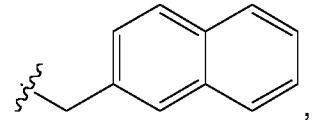
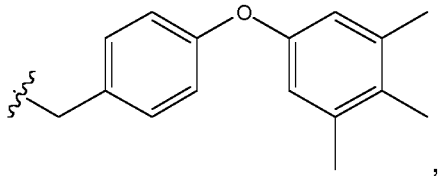


incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del las mismo, en la que:

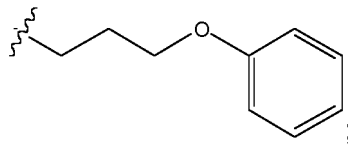
5 - R1 se selecciona entre el grupo que consiste en:



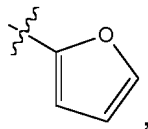
108



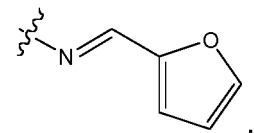
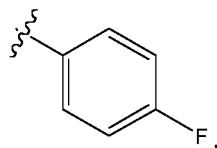
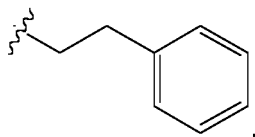
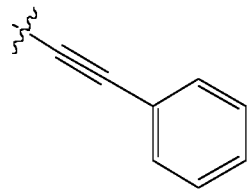
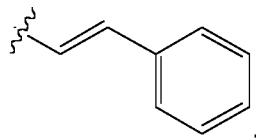
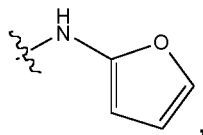
y

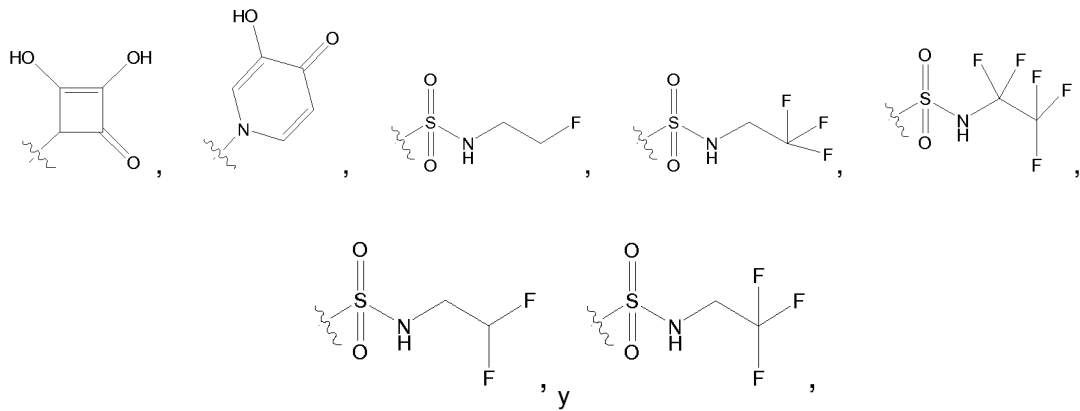


5 - R2 se selecciona entre el grupo que consiste en



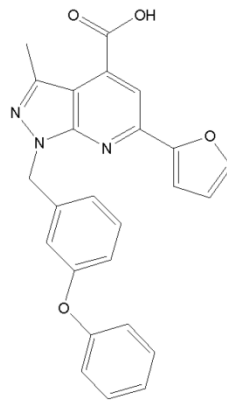
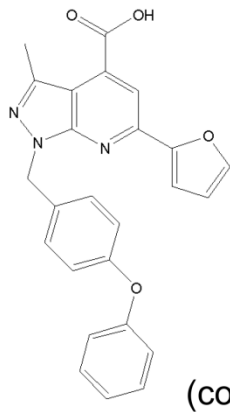
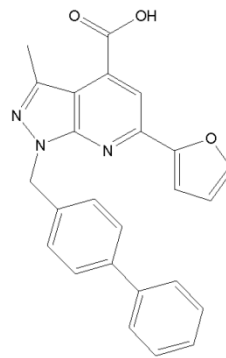
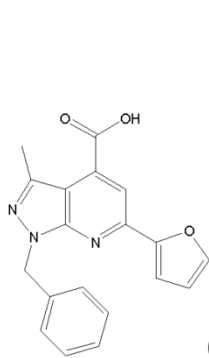
Cl, CH₃,

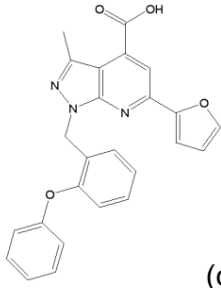




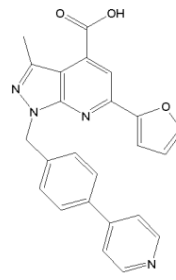
en las que X, Y, Z son independientemente N, C o CO.

2. Compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en

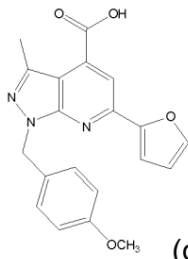




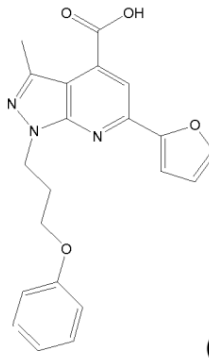
(compuesto 10),



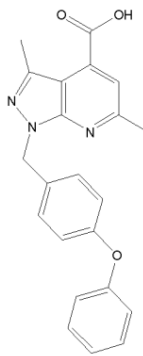
(compuesto 11),



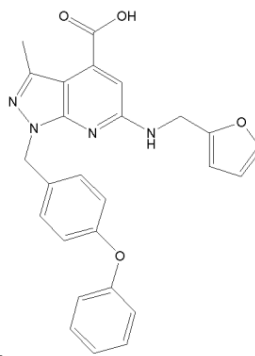
(compuesto 12),



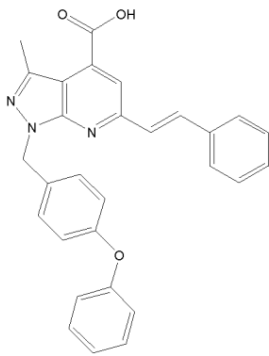
(compuesto 13),



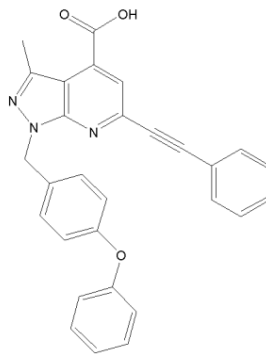
(compuesto 14),



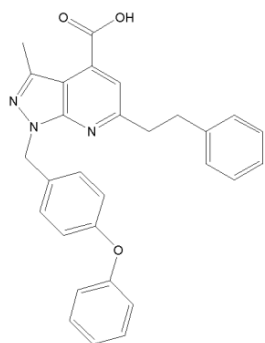
(compuesto 15),



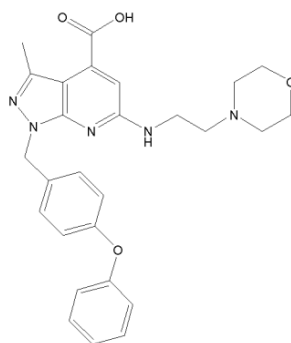
(compuesto 16),



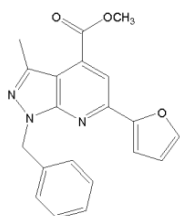
(compuesto 17),



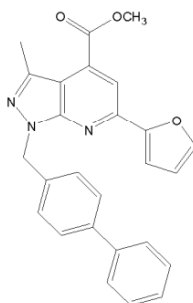
(compuesto 18),



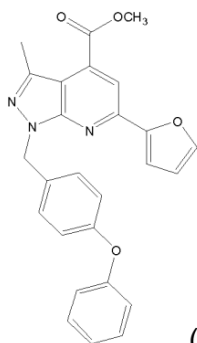
(compuesto 19),



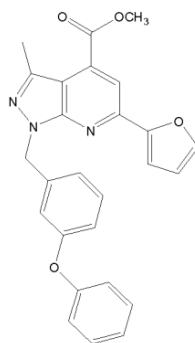
(compuesto 38),



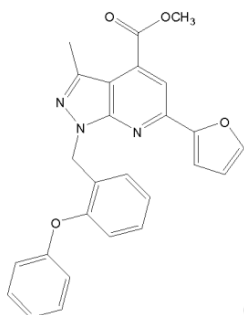
(compuesto 39),



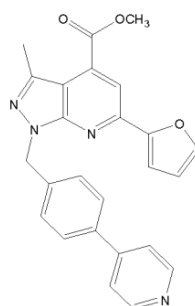
(compuesto 40),



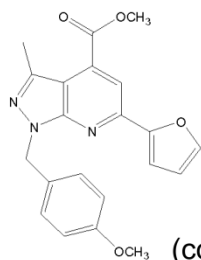
(compuesto 41),



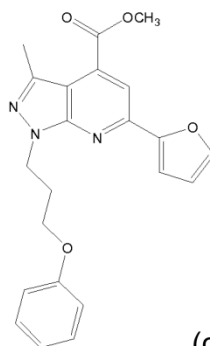
(compuesto 42),



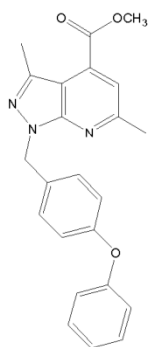
(compuesto 43),



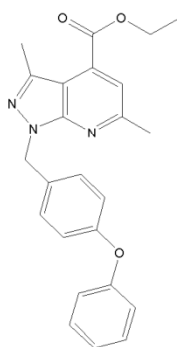
(compuesto 44),



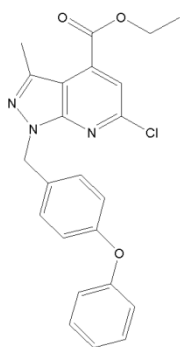
(compuesto 45),



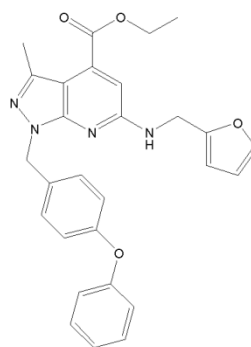
(compuesto 48),



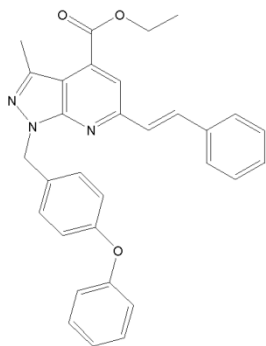
(compuesto 49),



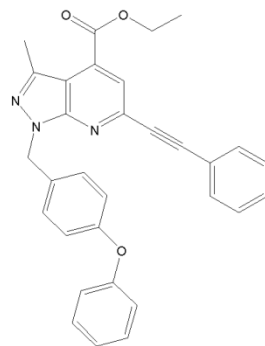
(compuesto 50),



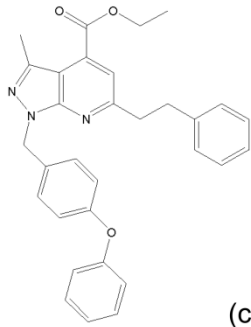
(compuesto 51),



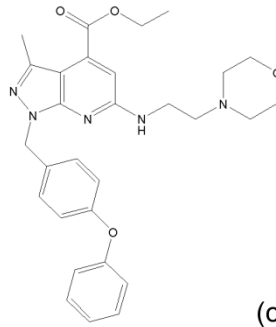
(compuesto 52),



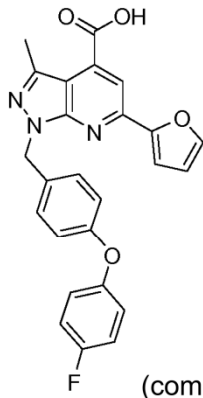
(compuesto 53),



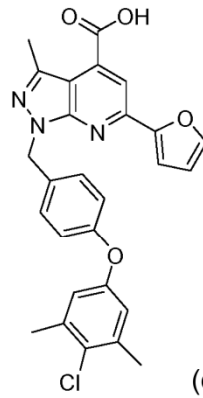
(compuesto 54),



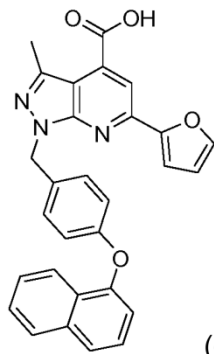
(compuesto 55),



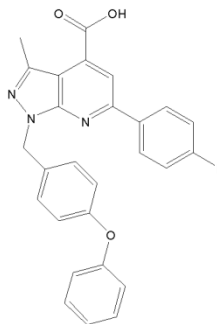
(compuesto 56),



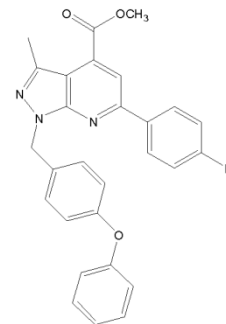
(compuesto 57),



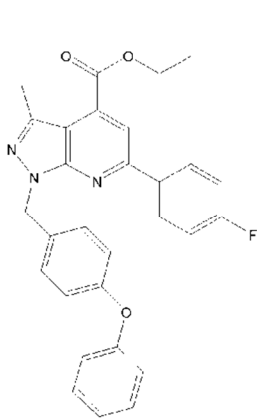
(compuesto 58),



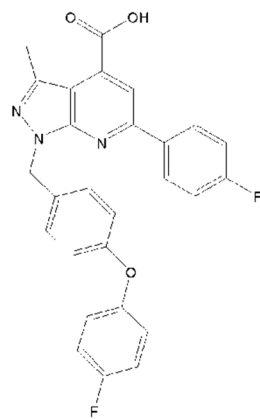
,



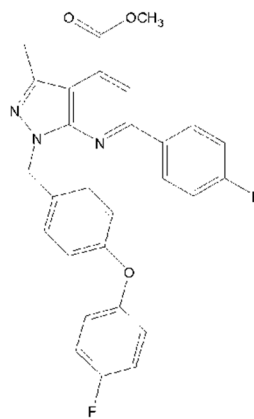
,



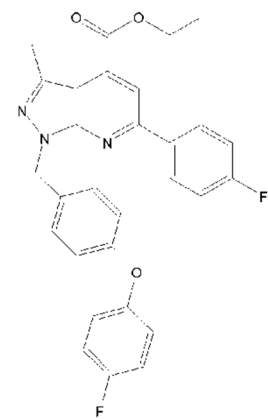
,



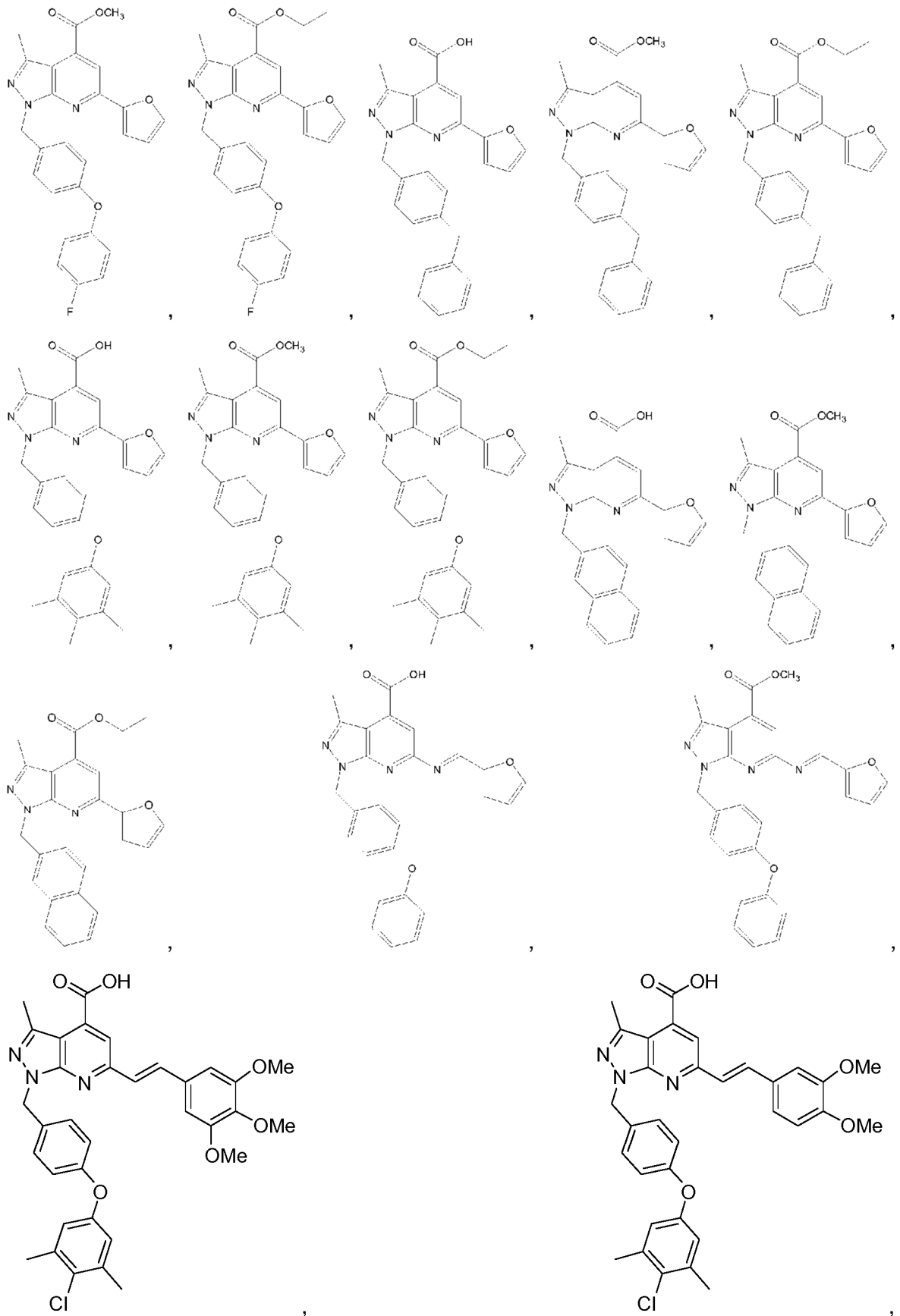
,

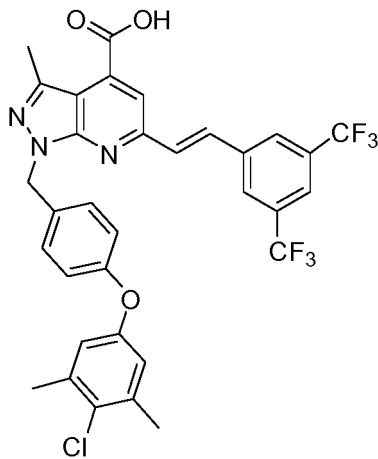


,



,





y un portador farmacéuticamente aceptable.

3. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para su uso en un procedimiento de tratamiento para mejorar o prevenir una enfermedad hiperproliferativa en un paciente.
- 5 4. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa es cáncer.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 4, dicho cáncer es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, melanoma, cáncer de mama y / o cáncer pancreático.
6. Compuesto para su uso según la reivindicación 5, en el que dicho paciente es un paciente humano.
- 10 7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1.
8. Composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende además uno o más agentes anticancerosos.
9. Composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que dicho agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico.
- 15 10. Kit, que comprende un compuesto de la reivindicación 1 e instrucciones para administrar dicho compuesto a un paciente que tiene una enfermedad hiperproliferativa.
11. Kit de la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa es cáncer.
12. Kit de la reivindicación 11, en el que dicho cáncer es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, melanoma, cáncer de mama y / o cáncer pancreático.
13. Kit de la reivindicación 11, que comprende además uno o más agentes anticancerosos.
- 20 14. Kit de la reivindicación 13, en el que dicho compuesto es para ser administrado junto con uno o más agentes anticancerosos.

FIG. 1

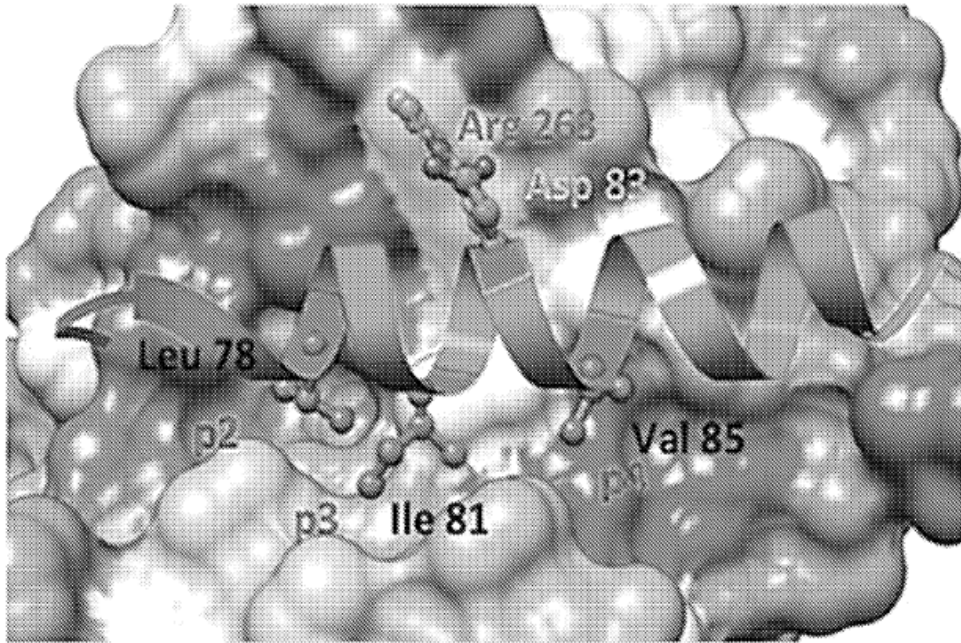


FIG. 2

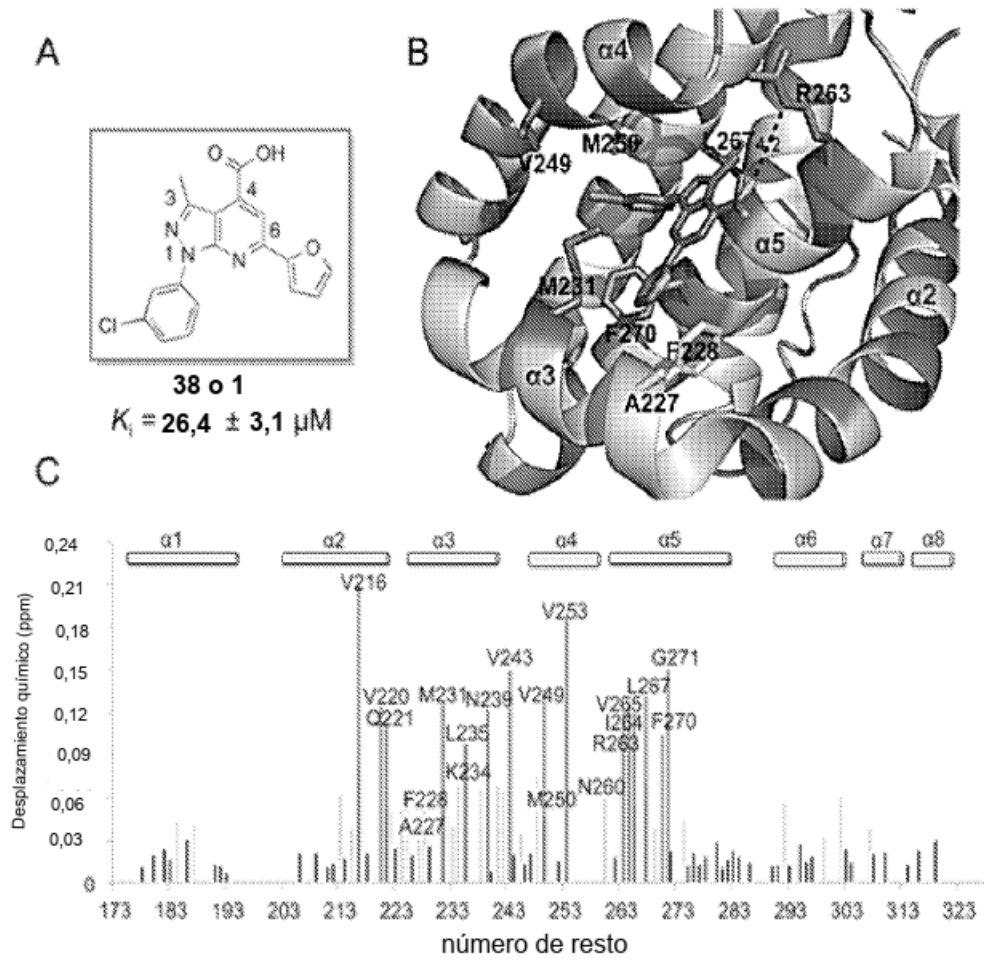


FIG. 3

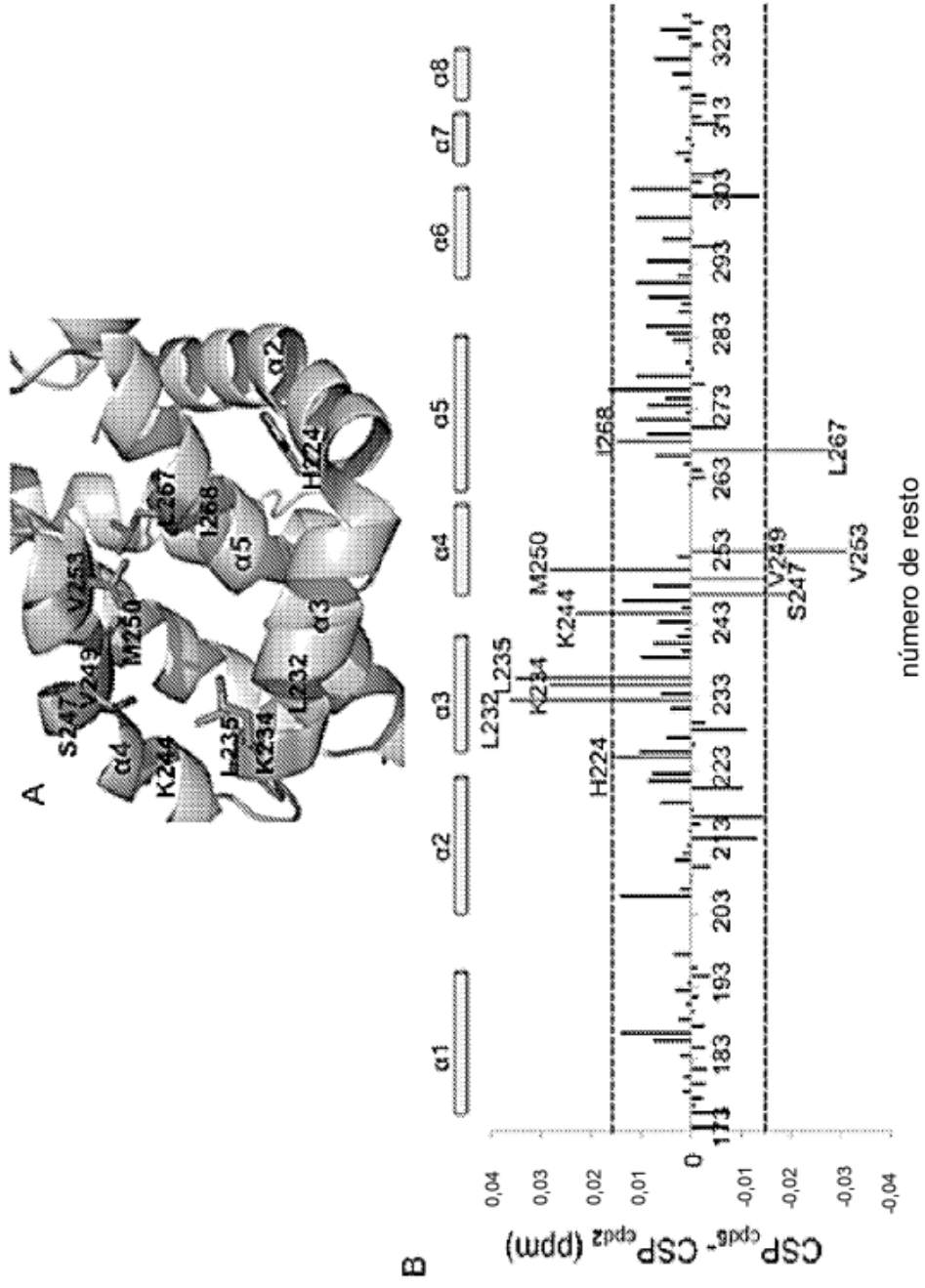


FIG. 4

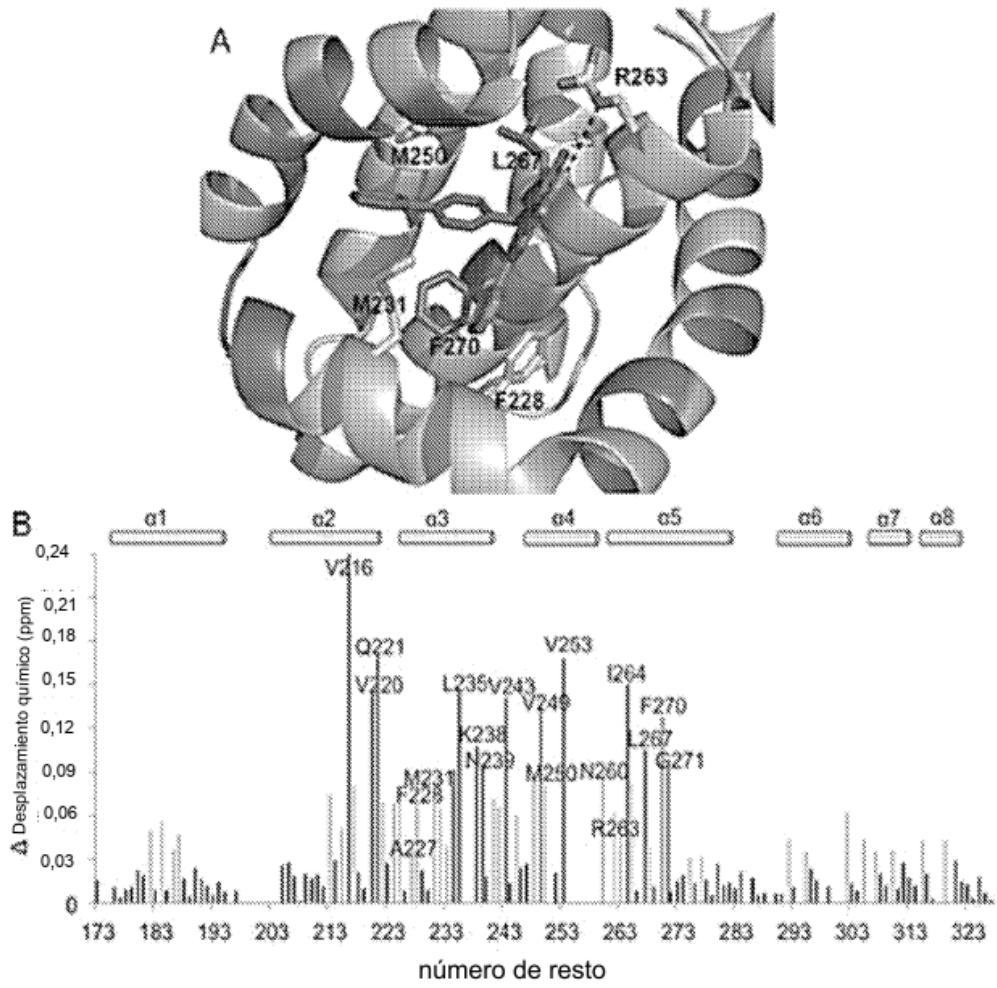


FIG. 5

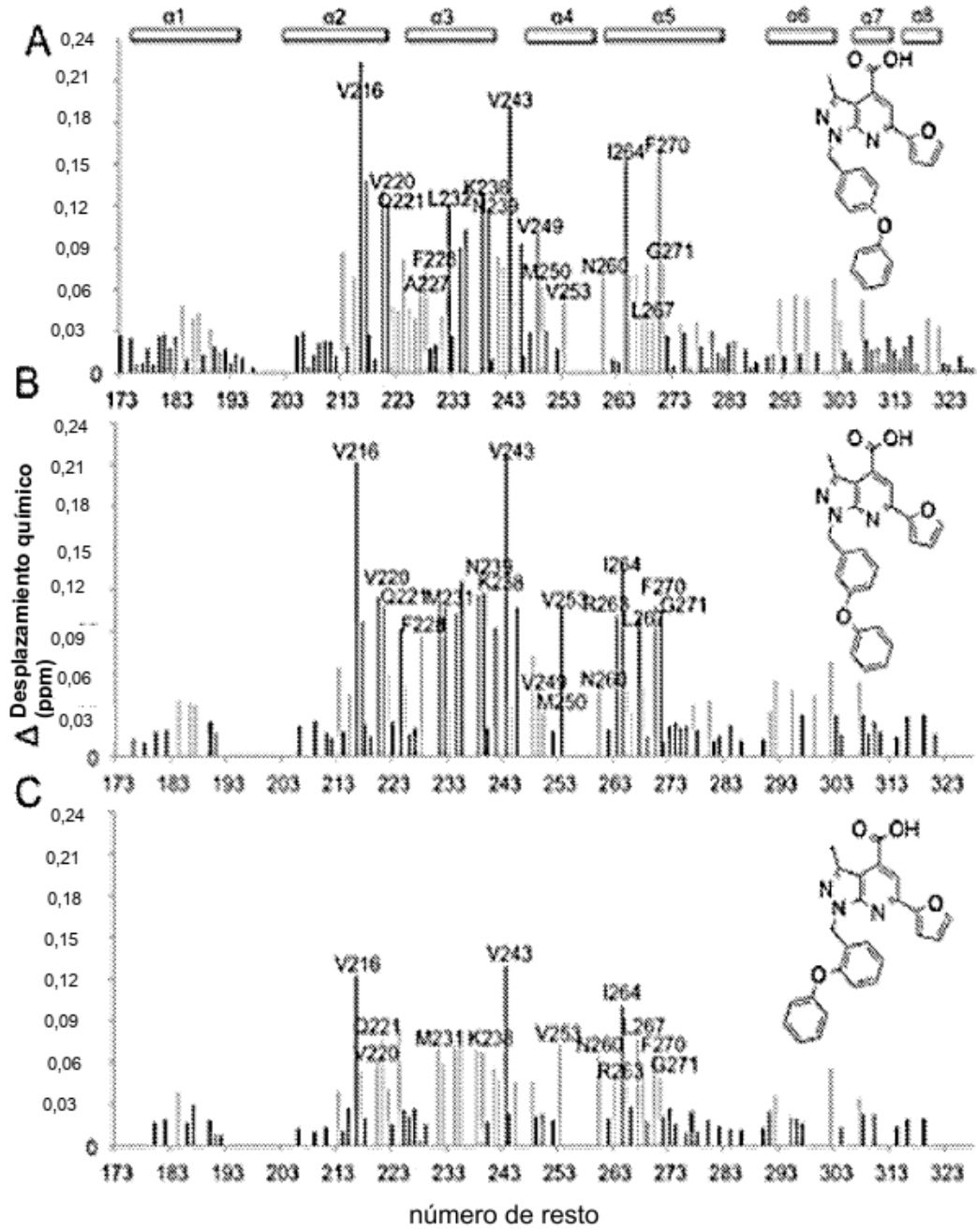


FIG. 6

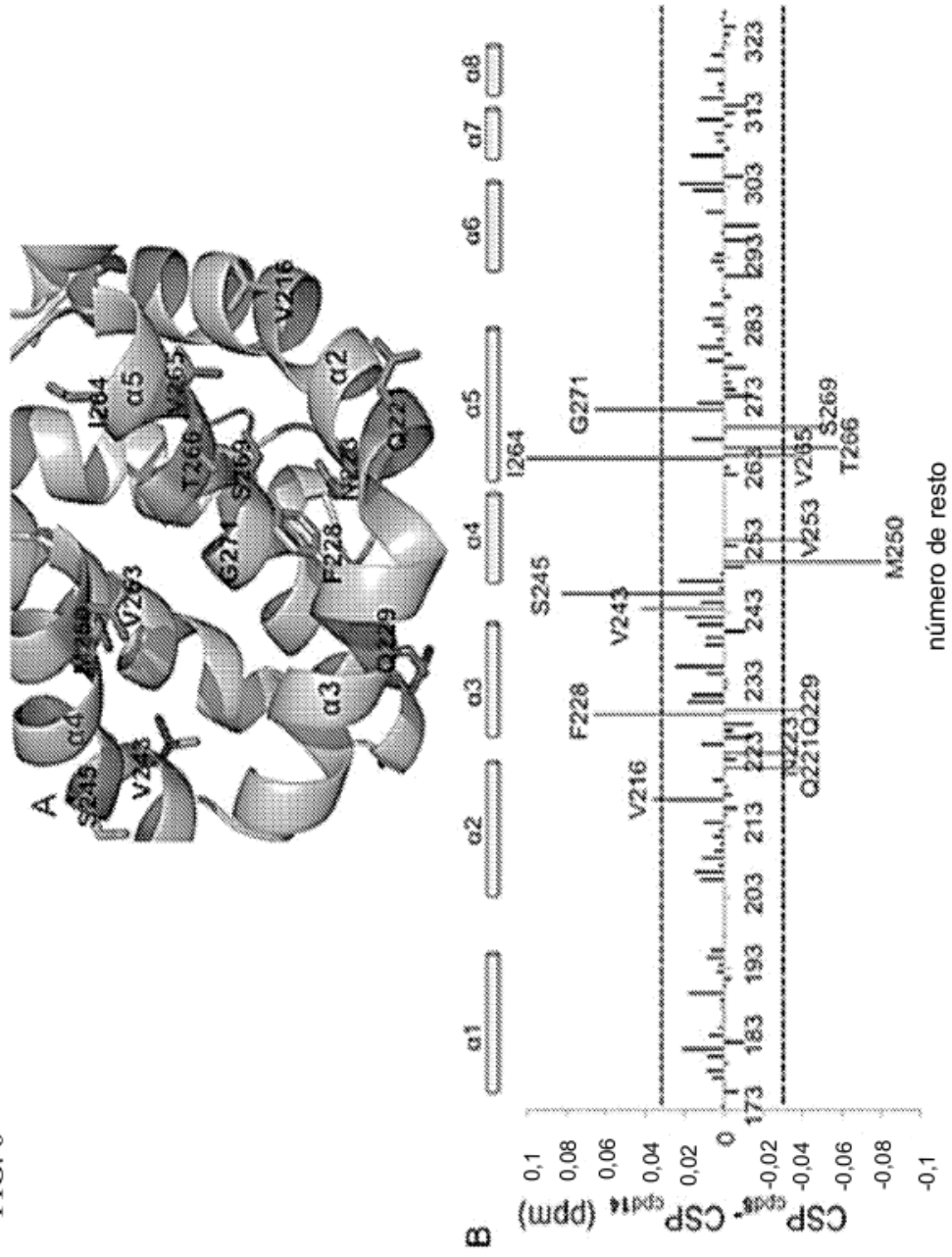


FIG. 7

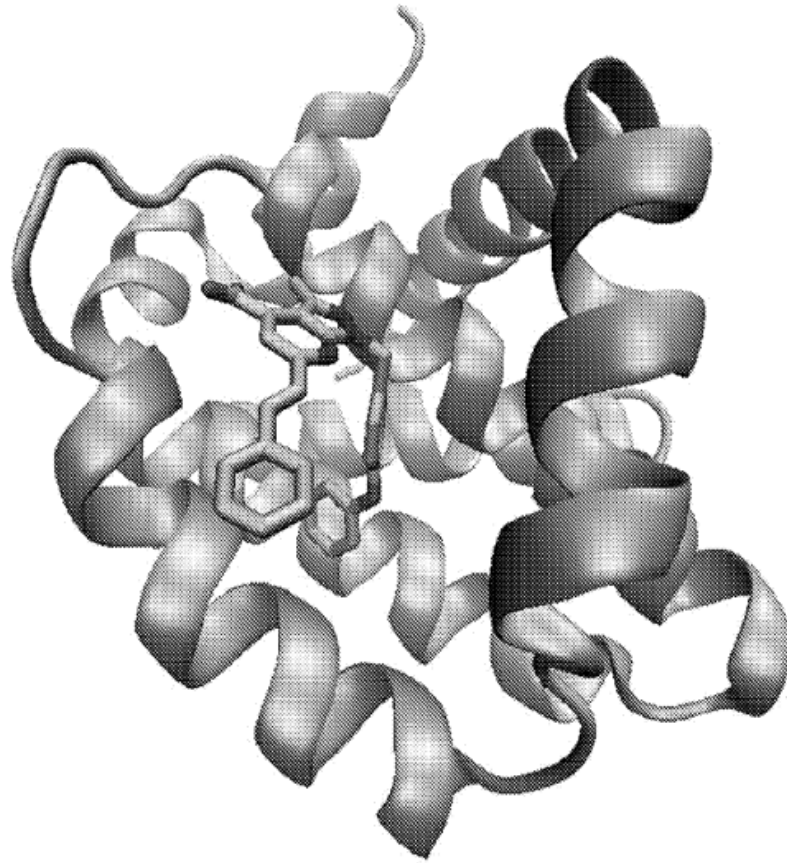


FIG. 8

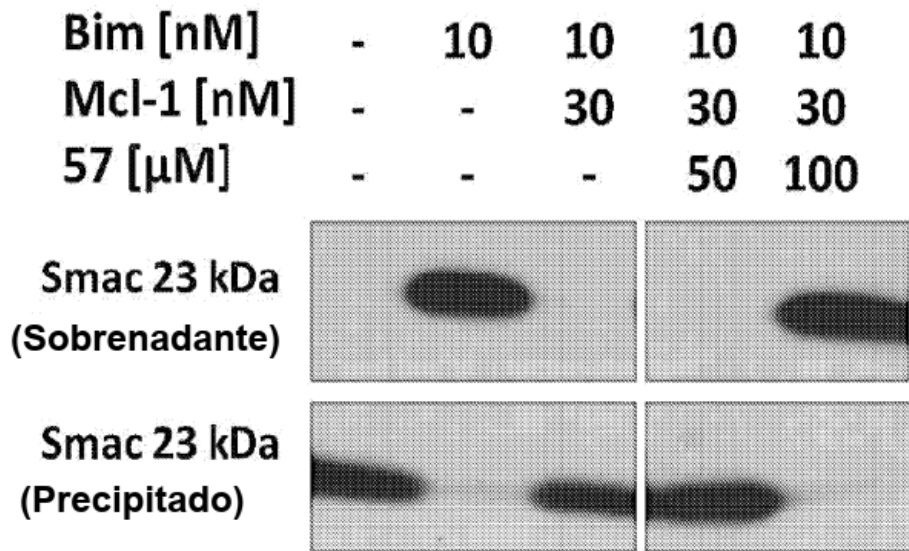


FIG. 9

