

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 317**

51 Int. Cl.:

C07D 401/12 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2010 PCT/IB2010/002539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11042798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2010 E 10776149 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2509974**

54 Título: **Moduladores de derivados de pirazoles del canal de calcio activado por la liberación de calcio y métodos para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas**

30 Prioridad:

08.10.2009 IN 2439CH2009
30.10.2009 IN 2636CH2009
25.01.2010 IN 158CH2010
02.06.2010 IN 1513CH2010
02.06.2010 IN 1514CH2010
19.08.2010 IN 2385CH2010
01.12.2009 US 265540 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2018

73 Titular/es:

RHIZEN PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)
Fritz Courvoisier 40
2300 La Chaux de Fonds, CH

72 Inventor/es:

MUTHUPPALANIAPPAN, MEYYAPPAN;
VISWANADHA, SRIKANT;
VARANASI, KANTHIKIRAN VS.;
MERIKAPUDI, GAYATRI SWAROOP y
VAKKALANKA, SWAROOP KUMAR V. S.

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 676 317 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

Moduladores de derivados de pirazoles del canal de calcio activado por la liberación de calcio y métodos para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas

5

Esta solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes de Patente Provisional de la India N.º 2440/CHE/2009, con fecha del 8 de octubre 2009; 2636/CHE/2009, con fecha del 30 de octubre de 2009; 158/CHE/2010, con fecha del 25 de enero de 2010; 1513/CHE/2010, con fecha del 2 de junio de 2010; 1514/CHE/2010, con fecha del 2 de junio de 2010; y 2385/CHE/2010, con fecha del 19 de agosto de 2010, y la Solicitud de Patente Provisional de Estados

10 Unidos N.º 61/265.540, con fecha del 1 de diciembre de 2009, cada una de las cuales se incorpora por la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a inhibidores de los canales de calcio activados por la liberación de calcio (CRAC) de fórmula I y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a métodos para prepararlos, a composiciones farmacéuticas que los contienen, y métodos de tratamiento con los mismos.

La presente invención también se refiere a métodos para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con inhibidores de CRAC, y a métodos para identificar agentes terapéuticos para tratar y diagnosticar

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 La regulación del calcio intracelular es un elemento clave en la transducción de señales en y dentro de las células. Las respuestas celulares a factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas y una diversidad de moléculas señal diferentes se inician a través de procesos dependientes de calcio. La importancia del ión de calcio como segundo mensajero se enfatiza por muchos mecanismos diferentes que trabajan juntos para mantener la homeostasis del calcio. Los cambios en la concentración de iones de calcio libre intracelular representan el evento

30

de señalización más extendido e importante para la regulación de una plétora de respuestas celulares. Una ruta generalizada para la entrada de iones de calcio en la célula es a través de canales dependientes de depósito (SOC), es decir, muchos tipos de células emplean la entrada de iones de calcio dependiente de depósito como su ruta principal para la afluencia de iones de calcio. Este mecanismo se activa después de la liberación de iones de calcio de los depósitos, donde los depósitos agotados conducen a la activación de los canales de calcio activado por

35

liberación de calcio (CRAC). Los canales CRAC, una subfamilia de canales dependientes de depósito, se activan mediante la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, particularmente desde el retículo endoplásmico (RE). Estos canales son factores clave en la regulación de una amplia gama de funciones celulares, incluida la contracción muscular, la secreción de

40

proteínas y fluidos y el control sobre el crecimiento y la proliferación celular y, por lo tanto, desempeñan un papel esencial en diversas enfermedades tales como trastornos inmunitarios y respuestas alérgicas. Entre varias corrientes biofísicamente distintas dependientes de depósito, la mejor caracterizada y la más selectiva de iones de calcio es la corriente de CRAC. Por lo tanto, los canales CRAC median funciones esenciales desde la secreción a la expresión génica y el crecimiento celular y forman una red esencial para la activación de las células inmunes que

45

establecen la respuesta inmune adaptativa. Recientemente, dos proteínas, la molécula de interacción estromal (STIM1) y el modulador 1 de CRAC (CRACM1 u Orai1), se han identificado como los componentes esenciales que reconstituyen y amplifican completamente las corrientes de CRAC en sistemas de expresión heterólogos con una huella biofísica similar. En los mamíferos, existen varios homólogos de estas proteínas: STIM1 y STIM2 en el retículo endoplásmico y CRACM1, CRACM2 y CRACM3 en la membrana plasmática.

50

Las corrientes de CRAC se descubrieron inicialmente en linfocitos y mastocitos, y al mismo tiempo se han caracterizado en diversas líneas celulares tales como S2 drosophila, linfocitos B DT40, hepatocitos, dendríticas, megacarióticas y células de riñón canino Madin-Darby. En los linfocitos y en los mastocitos, la activación a través del antígeno o los receptores de Fc inicia la liberación de iones de calcio de los depósitos intracelulares causada por el

55

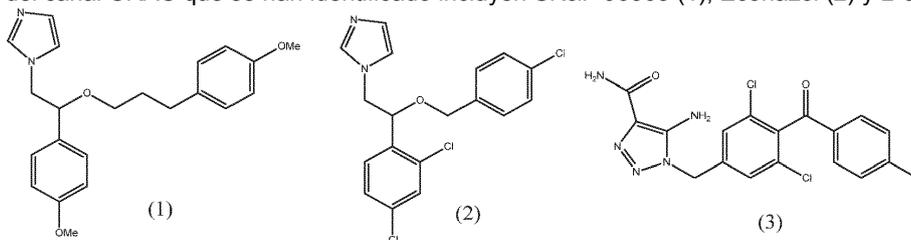
segundo mensajero inositol(1,4,5)-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃), que a su vez conduce a la entrada de iones de calcio a través de los canales CRAC en la membrana plasmática. Las corrientes de Ca²⁺ dependientes de depósito caracterizadas por músculo liso, células epidérmicas A431, células endoteliales de diversos tejidos, y líneas celulares de cáncer de próstata muestran características biofísicas alteradas que sugieren un origen molecular distinto.

- Por ejemplo, el influjo de iones de calcio a través de la membrana celular es importante en la activación de linfocitos y respuestas inmunes adaptativas. Se ha demostrado que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]$ desencadenadas a través de la estimulación del TCR (receptor de antígenos de linfocitos T) son prominentes, y parecen implicar solo una única vía de afluencia de iones calcio, el canal CRAC dependiente de depósito. Véanse, por ejemplo, Lewis "Calcium signalling mechanisms in T lymphocytes", *Annu. Rev. Immunol.* 19, (2001), 497-521; Feske et al. "Ca⁺⁺ calcineurin signalling in cells of the immune system", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, (2003), 1117-1132; Hogan et al. "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT", *Genes Dev.* 17, (2003) 2205-2232.
- 10 Está bien establecido ahora que el calcio intracelular desempeña un papel importante en diversas funciones celulares, y que su concentración está regulada por la afluencia de iones de calcio a través de canales de calcio en la membrana celular. Los canales de iones de calcio, que se encuentran en los sistemas nervioso, endocrino, cardiovascular y esquelético y están modulados por el potencial de membrana, se denominan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC). Estos canales se clasifican en los subtipos L, N, P, Q, R y T. El influjo excesivo de Ca^{2+} a través de los canales VOC causa hipertensión y disfunción cerebral. Por el contrario, los canales iónicos de calcio en las células inflamatorias, incluidos los linfocitos, los mastocitos y los neutrófilos, pueden activarse independientemente de su potencial de membrana. Se ha informado que este tipo de canal de iones de calcio actúa en la crisis y la exacerbación de la inflamación y las enfermedades autoinmunes. En los linfocitos T, se ha informado que las primeras fases de activación consisten en eventos pre y post Ca^{2+} . La estimulación de los receptores de linfocitos T induce eventos pre- Ca^{2+} , incluida la generación de IP₃, seguido de la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). En los eventos post- Ca^{2+} , el agotamiento de Ca^{2+} en el RE induce la activación de los canales CRAC, y la afluencia capacitativa de Ca^{2+} a través del canal CRAC mantiene una alta concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Este alto $[Ca^{2+}]_i$ prolongado activa la transducción de señal citosólica para producir mediadores lipídicos (por ejemplo, LTD₄), citocinas [por ejemplo, interleucina-2 (IL-2)] y metaloproteinasas de matriz, que participan en la patogénesis de la inflamación y enfermedades autoinmunes.

Estos hechos sugieren que los moduladores del canal CRAC pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades causadas por la activación de células inflamatorias sin efectos secundarios observados en esteroides. Dado que los moduladores del canal VOC causarían eventos adversos en los sistemas nervioso y cardiovascular, puede ser necesario que los moduladores del canal CRAC muestren una selectividad suficiente sobre los canales VOC si se van a usar como fármacos antiinflamatorios.

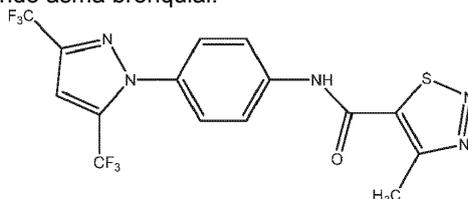
Por consiguiente, se ha dicho que los moduladores del canal CRAC son útiles en el tratamiento, prevención y/o mejora de enfermedades o trastornos asociados con el canal de calcio activado por la liberación de calcio incluyendo, pero sin limitación, inflamación, glomerulonefritis, uveítis, enfermedades o trastornos hepáticos, enfermedades o trastornos renales, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, vasculitis, dermatitis, osteoartritis, enfermedad muscular inflamatoria, rinitis alérgica, vaginitis, cistitis intersticial, esclerodermia, osteoporosis, eccema, trasplante alogénico o xenogénico, rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, diabetes tipo I, fibrosis pulmonar, dermatomiositis, tiroiditis, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, fibrosis quística, hepatitis recurrente crónica, cirrosis biliar primaria, conjuntivitis alérgica, hepatitis y dermatitis atópica, asma, síndrome de Sjogren, cáncer y otras enfermedades proliferativas, y enfermedades o trastornos autoinmunes. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N.º WO 2005/009954, WO 2005/009539, WO 2005/009954, WO 2006/034402, WO 2006/081389, WO 2006/081391, WO 2007/087429, WO 2007/087427, WO 2007/087441, WO 2007/087442, WO 2007/087443, WO 2007/089904, WO 2007/109362, WO 2007/112093, WO 2008/039520, WO 2008/063504, WO 2008/103310, WO 2009/017818, WO 2009/017819, WO 2009/017831, WO 2010/039238, WO 2010/039237, WO 2010/039236, WO 2009/089305 y WO 2009/038775, y las Publicaciones de Estados Unidos N.º: US 2006/0173006 y US 2007/0249051.

50 Los inhibidores del canal CRAC que se han identificado incluyen SK&F 96365 (1), Econazol (2) y L-651582 (3).



Sin embargo, estas moléculas carecen de potencia y selectividad suficientes sobre los canales VOC y, por lo tanto, no son adecuadas para uso terapéutico.

- 5 Publicaciones recientes de Tajji et al. (European Journal of Pharmacology, 560, 225-233, 2007) y Yasurio Yonetoky et al. (Bio. & Med. Chem., 16, 9457-9466, 2008) describen un inhibidor de canal CRAC selectivo codificado YM-58483 que es capaz de inhibir la función de los linfocitos T y se propone que sea beneficioso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluyendo asma bronquial.



YM-58483

10

Yasurio Yonetoky *et al.* describen que YM-58483 es selectivo para los canales CRAC sobre los canales dependientes de voltaje (VOC) con un índice selectivo de 31.

- Otros moduladores del canal CRAC descritos incluyen diversos compuestos de biarilo y/o carboxanilida heterocíclico que incluyen, por ejemplo, PCT o solicitudes de patente de Estados Unidos asignadas a Synta Pharmaceuticals viz. 15 WO 2005/009954, WO 2005/009539, WO 2005/009954, WO 2006/034402, WO 2006/081389, WO 2006/081391, WO 2007/087429, WO 2007/087427, WO 2007/087441, WO 2007/087442, WO 2007/087443, WO 2007/089904, WO 2007/109362, WO 2007/112093, WO 2008/039520, WO 2008/063504, WO 2008/103310, WO 2009/017818, WO 2009/017819, WO 2009/017831, WO 2010/039238, WO 2010/039237, WO 2010/039236, WO 2009/089305 y WO 20 2009/038775, US 2006/0173006 y US 2007/0249051.

- Otras publicaciones de patente relacionadas con moduladores de canal CRAC incluyen solicitudes de Astellas, Queens Medical Centre, Calcimedica y otros viz., WO 2007/121186, WO 2006/0502 14, WO 2007/139926, WO 2008/148108, US 7.452.675, US 2009/023177, WO 2007/139926, US 6.696.267, US 6.348.480, WO 2008/106731, 25 US 2008/0293092, WO 2010/048559, WO 2010/027875, WO2010/025295, WO 2010/034011, WO2010/034003, WO 2009/076454, WO 2009/035818, US 2010/0152241, US 2010/0087415, US 2009/0311720 y WO 2004/078995.

- La revisión adicional y la divulgación de la bibliografía en el área de los canales CRAC incluye Isabella Derler et al., Expert Opinion in Drug Discovery, 3(7), 787-800, 2008; Yousang G et al., Cell Calcium, 42, 145-156, 2007; Yasurio Yonetoky et al., Bio. & Med. Chem., 14, 4750-4760, 2006; y Yasurio Yonetoky et al., Bio. & Med. Chem., 14, 5370-5383, 2006. Todas estas patentes y/o publicaciones de patente y descripciones bibliográficas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos. 30

- El cáncer es un importante problema de salud pública en la India, EE. UU. y muchas otras partes del mundo. 35 Actualmente, 1 de cada 4 muertes en la India se debe al cáncer. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo debido a su alta incidencia y mortalidad, con estimaciones de supervivencia a 5 años de ~10 % para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se ha informado que se necesitan más investigaciones sobre los mecanismos de tumorigénesis y quimiorresistencia del cáncer de pulmón para mejorar la tasa de supervivencia (Jemal A, et al., Cancer Statistics, CA Cancer. J. Clin., 56, 106-130, 2006). Existen cuatro 40 tipos principales de NSCLC, concretamente, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma broncoalveolar y carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas son los tipos más comunes de NSCLC en función de la morfología celular (Travis et al., Lung Cancer Principles and Practice, Lippincott-Raven, Nueva York, 361-395, 1996). Los adenocarcinomas se caracterizan por una ubicación más periférica en el pulmón y a menudo tienen una mutación en el oncogén K-ras (Gazdar et al., Anticancer Res., 45 14, 261-267, 1994). Los carcinomas de células escamosas son típicamente más céntricos y con frecuencia llevan mutaciones del gen p53 (Niklinska et al., Folia Histochem. Cytobiol., 39, 147-148, 2001).

- La mayoría de los NSCLC se caracterizan por la presencia de la mutación *ras*, lo que hace que el paciente sea relativamente insensible al tratamiento con inhibidores de cinasas conocidos. Como resultado, los tratamientos 50 actuales del cáncer de pulmón generalmente se limitan a medicamentos citotóxicos, cirugía y radioterapia. Existe la

necesidad de tratamientos que tengan menos efectos secundarios y se dirijan más específicamente a las células cancerosas, sean menos invasivos y mejoren el pronóstico de los pacientes.

La identificación de células iniciadoras de tumores pulmonares y marcadores asociados puede ser útil para la optimización de enfoques terapéuticos y para la información predictiva y pronóstica en pacientes con cáncer de pulmón. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de nuevos métodos de predicción, evaluación y tratamiento de pacientes afectados de cáncer de pulmón.

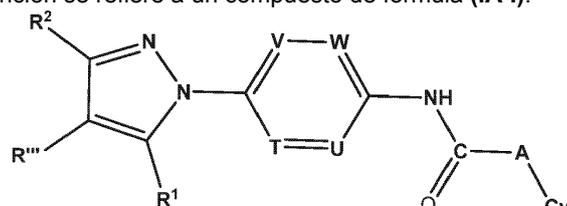
Todavía existe la necesidad insatisfecha y grave de moduladores de molécula pequeña que tengan especificidad hacia Stim1 y/u Orai1 con el fin de regular y/o modular la actividad de los canales CRAC, particularmente para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con el CRAC.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I), métodos para su preparación, composiciones farmacéuticas que los contienen, y métodos de tratamiento con estos.

En particular, los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables son moduladores de los canales de calcio activados por la liberación de calcio útiles en el tratamiento, prevención, inhibición y/o mejora de enfermedades o trastornos asociados con el canal de calcio activado por la liberación de calcio.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (IA-I):



(IA-I)

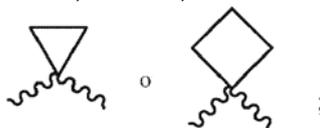
o un tautómero, N-óxido, éster farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

R¹ y R² son ambos ciclopropilo o uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo;

R³ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^a, -COOR^a, -S(=O)_q-R^a, -NR^aR^b, -C(=X)-R^a, grupo alquilo C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, alqueno C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, alquino C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, y cicloalquilo C₍₃₋₅₎ sustituido o sin sustituir;

T, U, V y W son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CR^a y N;

A está ausente o se selecciona de -CH₂-, -CHMe-,



Cy es un anillo bicíclico seleccionado de un grupo cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterociclo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir;

cada aparición de R^a y R^b es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^c, -S(=O)_q-R^c, -NR^cR^d, -C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-Y-CR^cR^d-, -C(=Y)-NR^cR^d-, -NRR^d-C(=Y)-NR^cR^d-, -S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-NR^cR^d-, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, heterociclo sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando R^a y R^b están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^c y S;

cada aparición de R^c y R^d puede ser igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino

sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando dos sustituyentes R^c y/o R^d están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que son iguales o diferentes y se seleccionan de O, NH y S;

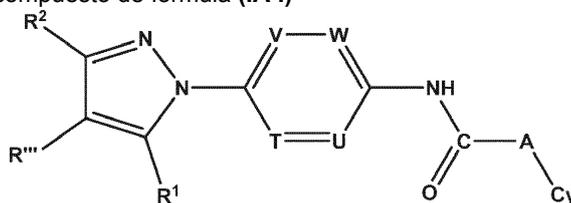
cada aparición de Y se selecciona de O, S y -NR^a; y

cada aparición de q representa independientemente 0, 1 o 2;

con la condición (e) de que el compuesto de fórmula (IA-I) no sea:

N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-1-metil-3-(trifluorometil)-1H-tieno[2,3-c]pirazol-5-carboxamida o N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-Pirazolo[1,5-a]pirimidin-2-carboxamida.

15 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I)



(IA)

o un tautómero del mismo, profármaco del mismo, N-óxido del mismo, éster farmacéuticamente aceptable del mismo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

20 R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CF₃ y ciclopropilo; con la condición de que tanto R¹ y R² al mismo tiempo no representen CF₃,

R³ es hidrogeno o halógeno;

T, U, V, W son independientemente CR^a o N;

R^a es hidrógeno o halógeno;

25 A está ausente o se selecciona de -CH₂-



Cy se selecciona de arilo bicíclico sustituido o sin sustituir o heteroarilo sustituido o sin sustituir, con la condición de que el compuesto de fórmula (IA) no sea ninguno de los compuestos con la condición (e) que se ha definido anteriormente.

30 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que tanto R¹ como R² representan ciclopropilo.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo.

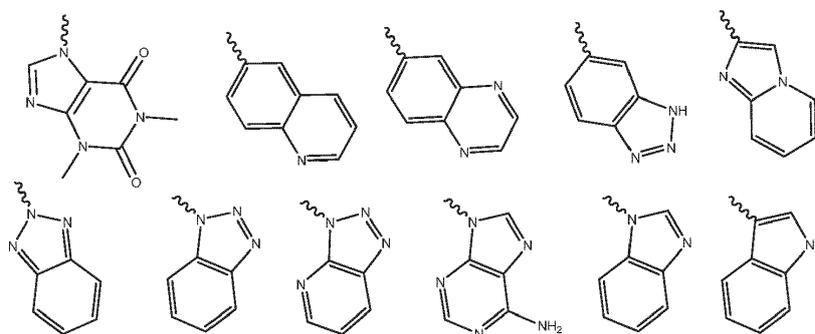
35 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que R¹ es ciclopropilo y R² es CF₃.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que T, U, V, W son CH, CF o N.

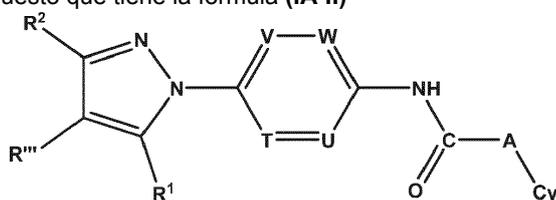
Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que T es CF o N y cada uno de U, V y W es CH.

40 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que cada uno de T y V es CF o N y cada uno de U y W es CH.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-I) en la que Cy se selecciona de



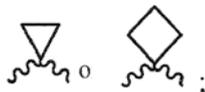
Aún otra realización es un compuesto que tiene la fórmula (IA-II)



(IA-II)

5 o un tautómero del mismo, profármaco del mismo, N-óxido del mismo, éster farmacéuticamente aceptable del mismo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

- 10 R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CF₃ y ciclopropilo; con la condición de que tanto R¹ y R² al mismo tiempo no representen CF₃,
 R³ es hidrógeno o halógeno;
 T, U, V, W son independientemente CR^a o N;
 R^a es hidrógeno o halógeno;
 A está ausente o se selecciona de
 -CH₂- -CHMe-,



y

Cy se selecciona de heteroarilo C₍₈₋₁₃₎ bicíclico sustituido o sin sustituir, con la condición de que el compuesto de fórmula (IA) no sea ninguno de los compuestos en la Condición definida anteriormente.

20 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que tanto R¹ como R² representan ciclopropilo.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que R¹ es ciclopropilo y R² es CF₃.

25

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que T, U, V, W son CH, CF o N.

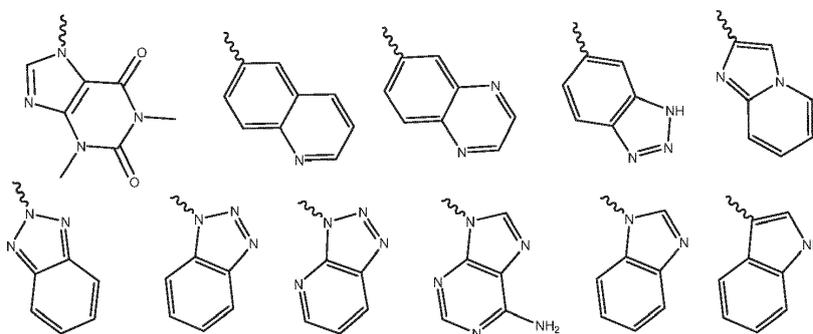
Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que T es CF o N y cada uno de U, V y W es CH.

30 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que cada uno de T y V es CF o N y cada uno de U y W es CH.

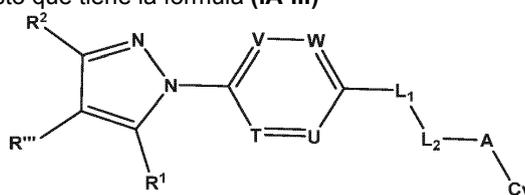
Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que A está ausente o -CH₂-.

35 En una realización, A es -CH₂-.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-II) en la que Cy se selecciona de



También se describe un compuesto que tiene la fórmula (IA-III)



(IA-III)

5 o un tautómero, profármaco, N-óxido, éster farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

- 10 R^1 y R^2 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CH_2F , CHF_2 , CF_3 , ciclopropilo con la condición de que tanto R^1 y R^2 al mismo tiempo no representen CF_3 ;
 T y V son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CF y N;
 Cada uno de U y V es CR^a ;
 L_1 y L_2 representan juntos $-\text{NH}-\text{C}(=\text{X})-$, $-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_q-$, $-\text{C}(=\text{X})\text{NH}-$, o $-\text{S}(=\text{O})_q\text{NH}-$ o $-\text{NH}-\text{CR}^r\text{R}^s-$;
 A está ausente o se selecciona de $-(\text{CR}^r\text{R}^s)-$ y $-\text{NR}^a$;
 15 cada aparición de R^1 y R^2 es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno o un grupo alquilo $\text{C}_{(1-6)}$ sustituido o sin sustituir, o R^1 y R^2 pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-6 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^a y S;
 R^3 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, o halógeno
 20 cada aparición de X se selecciona independientemente de O, S y $-\text{NR}^a$;
 Cy es un anillo bicíclico seleccionado de heterociclilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.
 cada aparición de R^a y R^b es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, $-\text{OR}^c$, $-\text{S}(=\text{O})_q-\text{R}^c$, $-\text{NR}^c\text{R}^d$, $-\text{C}(=\text{Y})-\text{R}^c$, $-\text{CR}^c\text{R}^d-\text{C}(=\text{Y})-\text{R}^c$, $-\text{CR}^c\text{R}^d-\text{Y}-\text{CR}^c\text{R}^d$, $-\text{C}(=\text{Y})-\text{NR}^c\text{R}^d$, $-\text{NRR}^d-\text{C}(=\text{Y})-\text{NR}^c\text{R}^d$, $-\text{S}(=\text{O})_q-\text{NR}^c\text{R}^d$, $-\text{NR}^c\text{R}^d-\text{S}(=\text{O})_q-\text{NR}^c\text{R}^d$, $-\text{NR}^c\text{R}^d-\text{NR}^c\text{R}^d$, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, heterociclilo sustituido o sin sustituir, heterocicilalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando los sustituyentes R^a y R^b están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^c y S;
 35 cada aparición de R^c y R^d puede ser igual o diferente y se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando dos sustituyentes R^c y/o R^d están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que son iguales o diferentes y

se seleccionan de O, NH y S;
 cada aparición de Y se selecciona de O, S y -NR^a; y
 cada aparición de q representa independientemente 0, 1 o 2.

5 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que tanto R¹ como R² representan ciclopropilo.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es CH₂F,
 10 CHF₂.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que R¹ es ciclopropilo y R² es CF₃.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que T es CF o N.

15

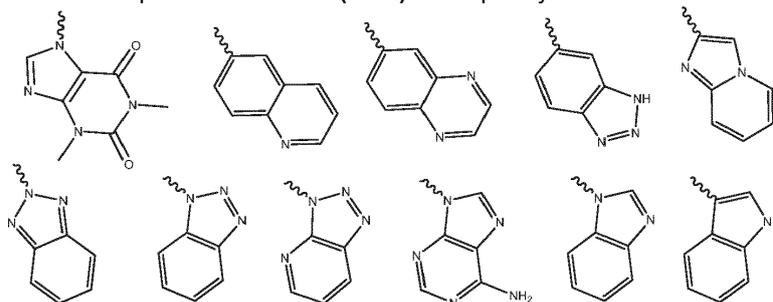
Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que U, V, W son CH, CF o N.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que L₁ y L₂ representan juntos -NH-C(=O)-,
 C(=O)NH- o -NH-CH₂-;

20

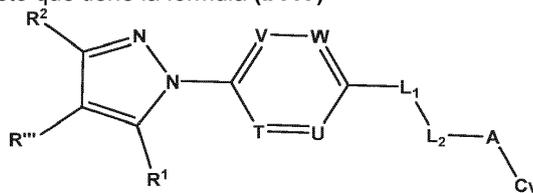
Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que A está ausente, es -NH- o -CH₂-.

Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-III) en la que Cy se selecciona de



25

También se describe un compuesto que tiene la fórmula (IA-IV)



(IA-IV)

o un tautómero, profármaco, N-óxido, éster farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéuticamente aceptable del
 mismo,

30 en la que

R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CH₂F, CHF₂, CF₃, ciclopropilo con
 la condición de que tanto R¹ y R² al mismo tiempo no representen CF₃;

T y V son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CH, CF y N;

35

Cada uno de U y V es CR^a;

L₁ y L₂ representan juntos -NH-C(=X)-, -NH-S(=O)_q-, -C(=X)NH-, o -S(=O)_qNH- o -NH-CR^R-;

A se selecciona de -(CR^R)₂- y -NR^a;

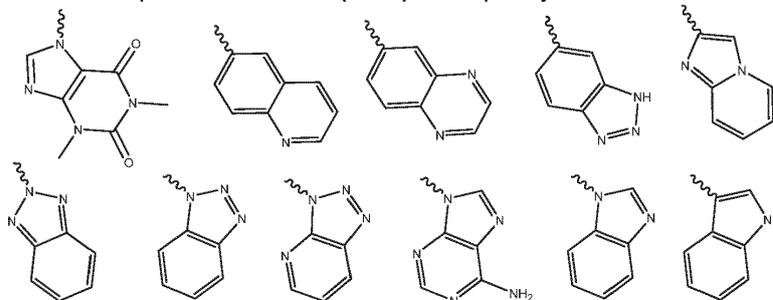
cada aparición de R¹ y R² es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno o grupo
 alquilo C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, o R¹ y R² pueden estar unidos para formar un anillo saturado o
 insaturado sustituido o sin sustituir de 3-6 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más
 40 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^a y S;

R^m se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, o halógeno
 cada aparición de X se selecciona independientemente de O, S y -NR^a;
 Cy es un heteroarilo bicíclico sustituido o sin sustituir.

- 5 cada aparición de R^a y R^b es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^c, -S(=O)_q-R^c, -NR^cR^d, -C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-Y-CR^cR^d-, -C(=Y)-NR^cR^d-, -NRR^d-C(=Y)-NR^cR^d-, -S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-NR^cR^d-, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, heterociclilo sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando los sustituyentes R^a y R^b están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^c y S;
- 10 cada aparición de R^c y R^d puede ser igual o diferente y se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando dos sustituyentes R^c y/o R^d están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que son iguales o diferentes y se seleccionan de O, NH y S;
- 15 cada aparición de Y se selecciona de O, S y -NR^a; y
 cada aparición de q representa independientemente 0, 1 o 2.

- 25 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que tanto R¹ como R² representan ciclopropilo.
- Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo.
- 30 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es CH₂F, CHF₂.
- Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que R¹ es ciclopropilo y R² es CF₃.
- 35 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que T es CH, CF o N.
- Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que U, V, W son CH, CF o N.
- 40 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que L₁ y L₂ representan juntos -NH-C(=O)-, C(=O)NH- o -NH-CH₂-;
- Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que A está ausente, es -NH- o -CH₂-.

- 45 Se prefiere adicionalmente un compuesto de fórmula (IA-IV) en la que Cy se selecciona de



También se describen métodos para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con inhibidores del canal de calcio activado por la liberación de calcio (CRAC), y métodos para identificar agentes terapéuticos para

tratar y diagnosticar cáncer. En ciertas realizaciones, el inhibidor de CRAC es un compuesto de Fórmula I, IA, IA-II, IA-III o IA-IV como en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Los presentes inventores han descubierto que las células cancerosas que expresan ORAI (tales como ORAI1, ORAI2 u ORAI3) o STIM (tales como STIM1 o STIM2) son susceptibles de tratamiento con inhibidores de los canales de calcio activados por la liberación de calcio (CRAC). Estos tipos de células cancerosas se expresan en muchos pacientes que padecen cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

Una de la presente descripción es un método para tratar a un paciente que padece NSCLC administrando al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de CRAC. En una realización preferida, al menos algunas de las células cancerosas expresan ORAI1, STIM1 o STIM2. El inhibidor de CRAC se puede usar como monoterapia o como terapia complementaria con uno o más de otros métodos para tratar el cáncer de pulmón (o NSCLC). En ciertas realizaciones, el inhibidor de CRAC es un compuesto de Fórmula I, IA, IA-II, IA-III o IA-IV como en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Otra descripción es un método para tratar a un paciente que padece NSCLC alterando el flujo de calcio en al menos algunas de las células cancerosas, preferiblemente aumentando los niveles de expresión de un canal de calcio activado por la liberación de calcio (CRAC) y/o una proteína STIM en la membrana plasmática de al menos algunas de las células cancerosas.

Todavía otra descripción es un método para identificar un agente candidato para tratar NSCLC. El método incluye (a) determinar (i) si un agente candidato modula un canal de calcio activado por la liberación de calcio (CRAC), y/o (ii) si un agente candidato modula la expresión de proteína Stim de un canal CRAC, o ambos; y (b) seleccionar el agente candidato basándose en su capacidad para modular un canal CRAC y/o proteína Stim de un canal CRAC.

En una realización preferida, el agente candidato puede alterar un flujo de calcio en una célula cancerosa. Por ejemplo, el agente candidato puede modular selectivamente un canal CRAC o proteína STIM. Preferiblemente, el agente candidato inhibe selectivamente un canal CRAC o proteína STIM. Por ejemplo, el canal CRAC que se inhibe se puede seleccionar de CRACM1/Orai1, CRACM2/Orai2 y CRACM3/Orai3. En otra realización, el agente candidato inhibe una proteína STIM localizada en la membrana venosa endoplásmica de una célula. En realizaciones particulares, la proteína STIM se selecciona de la familia STIM de proteínas transmembrana, tales como STIM1 o STIM2. De acuerdo con una realización preferida, la proteína STIM es STIM1. En ciertas realizaciones, el agente candidato es un compuesto de Fórmula I, IA, IA-II, IA-III o IA-IV como en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Aún otra realización es una composición farmacéutica para tratar NSCLC que comprende (a) un agente candidato eficaz para el tratamiento de NSCLC identificado de acuerdo con el método anterior, junto con (b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el agente candidato es un compuesto de Fórmula I, IA, IA-II, IA-III o IA-IV como en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Todavía otra descripción es un método para tratar a un paciente que padece NSCLC administrando al paciente (a) una cantidad eficaz de un agente candidato identificado de acuerdo con el método anterior, o (b) una o más composiciones farmacéuticas que comprenden (i) un agente candidato eficaz para el tratamiento de NSCLC identificado de acuerdo con el método anterior, junto con (b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la cantidad total de agente candidato proporcionada por las composiciones farmacéuticas proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del agente candidato. En cierta descripción, el agente candidato es un compuesto de Fórmula I, IA, IA-II, IA-III o IA-IV como en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Otra descripción más es un método para determinar si un ser humano está predispuesto al cáncer de pulmón o padece cáncer de pulmón detectando el nivel de un canal de calcio activado por la liberación de calcio (CRAC) y/o una proteína STIM en células de pulmón (tales como células cancerosas). En una descripción, el método incluye la detección de un nivel elevado de una proteína Orai y/o STIM. Por ejemplo, el método puede incluir la detección de niveles aumentados de una proteína STIM en una célula cancerosa. Por ejemplo, la proteína STIM a detectar es un miembro de la familia STIM de proteínas transmembrana, tales como STIM1 o STIM2. En una realización, la proteína STIM a seleccionar es STIM1.

Los compuestos representativos de la presente invención incluyen los especificados a continuación y en la Tabla 1, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. La presente invención no debe interpretarse como limitada a

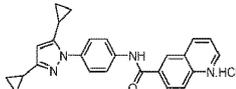
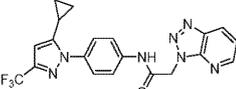
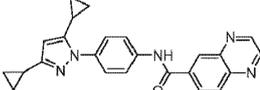
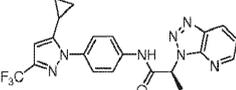
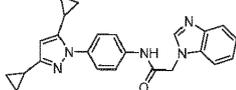
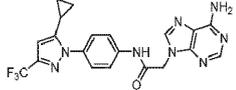
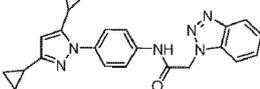
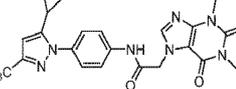
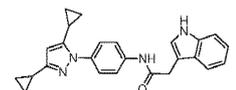
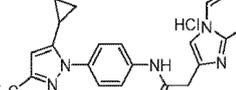
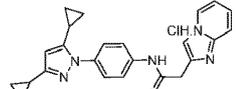
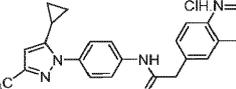
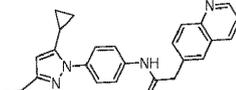
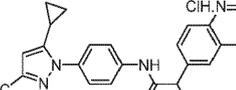
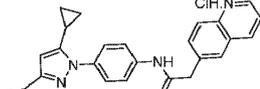
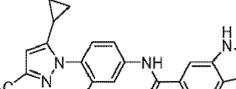
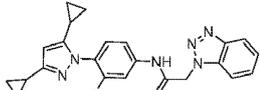
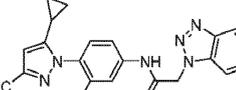
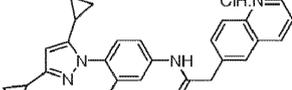
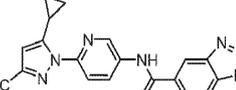
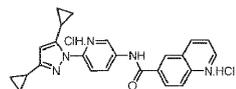
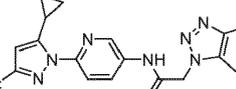
los mismos.

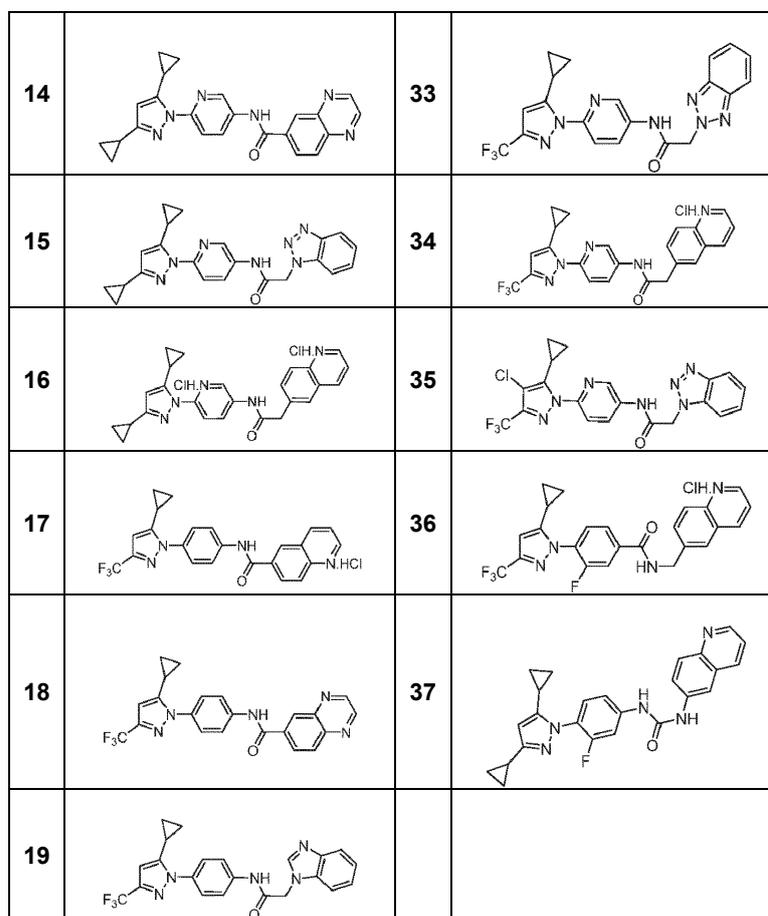
1. N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-1H-benzo[d]imidazol-6-carboxamida
2. N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-carboxamida
3. clorhidrato de N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]quinolin-6-carboxamida
4. N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]quinoxalin-6-carboxamida
5. 2-(1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]acetamida
6. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]acetamida
7. N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(1H-indol-3-il)acetamida
8. Clorhidrato de N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida
9. N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida:
10. Clorhidrato de N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida
11. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-(4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)-3-fluorofenil)acetamida
12. Clorhidrato de N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)-3-fluorofenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida
13. Diclorhidrato de N-[6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinolin-6-carboxamida
14. N-[6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinoxalin-6-carboxamida
15. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-[6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-il]acetamida
16. Diclorhidrato de N-[6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il)acetamida
17. Clorhidrato de N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]quinolin-6-carboxamida
18. N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]quinoxalin-6-carboxamida
19. 2-(1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida
20. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida
21. 2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida
22. 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida
23. (S)-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}propanamida
24. 2-(6-amino-9H-purin-9-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida
25. N-(4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil)-2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-2,3-dihidro-1H-purin-7(6H)-il)acetamida
26. Clorhidrato de N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida
27. Clorhidrato de N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)acetamida
28. Clorhidrato de N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)propanamida
29. N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluorofenil]-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-carboxamida
30. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluorofenil}acetamida
31. N-[6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il]-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-5-carboxamida
32. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-[6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il]acetamida
33. 2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-N-[6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il]acetamida
34. Clorhidrato de N-[6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il)acetamida
35. 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-{4-[4-cloro-5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il}acetamida
36. Clorhidrato de 4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluoro-N-(quinolin-6-ilmetil)benzamida
37. 1-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-3-(quinolin-6-il)urea:

Tabla 1

1		20	
2		21	

45

3		22	
4		23	
5		24	
6		25	
7		26	
8		27	
9		28	
10		29	
11		30	
12		31	
13		32	



Los compuestos de la presente invención (incluyendo sus ésteres y sales farmacéuticamente aceptables) son útiles para el tratamiento, prevención, inhibición y/o mejora de enfermedades o trastornos asociados con el canal de calcio activado por la liberación de calcio (CRAC).

5

Otra realización de la presente invención está representada por los compuestos de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediante la modulación de canales CRAC administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención.

10 Aún otra realización de la presente invención está representada por los compuestos de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediante la modulación de canales CRAC administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención en combinación (simultánea o secuencialmente) con al menos un agente antiinflamatorio diferente.

15 Aún otra descripción es un método para tratar una enfermedad o trastorno a través de la modulación de los canales CRAC administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de fórmula I, IA, IA-I, IA-II, IA-III y/o IA-IV como se ha definido anteriormente), en combinación (simultánea o secuencialmente) con al menos un agente anticanceroso diferente.

20 Los compuestos de la presente invención pueden inhibir la entrada de calcio dependiente de depósito, interrumpir el ensamblaje de unidades SOCE, alterar las interacciones funcionales de las proteínas que forman complejos de canales de calcio dependientes de depósito, y alterar las interacciones funcionales de STIM1 con Orai1. Estos compuestos son bloqueadores de poro del canal SOC y son bloqueantes de poro del canal CRAC.

25 Los compuestos descritos en el presente documento modulan el calcio intracelular y se usan en el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones donde la modulación del calcio intracelular tiene un efecto beneficioso. En

- una realización, los compuestos descritos en el presente documento inhiben la entrada de calcio dependiente de depósito. En una realización, los compuestos de la presente invención capaces de modular los niveles de calcio intracelular interrumpen el ensamblaje de unidades SOCE. En otra realización, los compuestos de la presente invención capaces de modular los niveles de calcio intracelular alteran las interacciones funcionales de proteínas
- 5 que forman complejos de canales de calcio dependiente de depósito. En una realización, los compuestos de la presente invención capaces de modular los niveles de calcio intracelular alteran las interacciones funcionales de STIM1 con Orai1. En otras realizaciones, los compuestos de la presente invención capaces de modular los niveles de calcio intracelular son bloqueadores de poro del canal SOC. En otras realizaciones, los compuestos de la presente invención capaces de modular los niveles de calcio intracelular son bloqueadores de poro del canal CRAC.
- 10 En un aspecto, los compuestos de la presente invención capaces de modular los niveles de calcio intracelular inhiben la corriente electrofisiológica (I_{SOC}) directamente asociada con los canales SOC activados. En un aspecto, los compuestos capaces de modular los niveles de calcio intracelular inhiben la corriente electrofisiológica (I_{CRAC}) directamente asociada con los canales CRAC activados.
- 15 Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades, afecciones o trastornos que se benefician de la modulación del calcio intracelular, incluyendo, pero sin limitación, una enfermedad relacionada con el sistema inmune (por ejemplo, una enfermedad autoinmune), una enfermedad o trastorno que implica inflamación (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, enfermedad
- 20 inflamatoria del intestino, glomerulonefritis, enfermedades neuroinflamatorias, esclerosis múltiple, uveítis y trastornos del sistema inmunitario), cáncer u otras enfermedades proliferativas, enfermedades o trastornos hepáticos, y enfermedades o trastornos renales. En una realización, los compuestos descritos en el presente documento se usan como inmunosupresores para prevenir (o inhibir) rechazos de injertos de trasplantes, rechazo de trasplantes alogénicos o xenogénicos (órgano, médula ósea, células madre, otras células y tejidos), y/o enfermedad de injerto
- 25 contra huésped. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden usar para prevenir (o inhibir) el rechazo de injertos de trasplantes como resultado de trasplantes de tejidos u órganos. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar para prevenir (o inhibir) la enfermedad de injerto contra huésped resultante de un trasplante de médula ósea o de células madre.
- 30 Más particular, los compuestos de fórmula (I, IA, IA-I, IA-II, IA-III y/o IA-IV) son útiles en el tratamiento de una diversidad de enfermedades inflamatorias, incluyendo, pero sin limitación, inflamación, glomerulonefritis, uveítis, enfermedades o trastornos hepáticos, enfermedades o trastornos renales, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, vasculitis, dermatitis, osteoartritis, enfermedad muscular
- 35 inflamatoria, rinitis alérgica, vaginitis, cistitis intersticial, esclerodermia, osteoporosis, eccema, trasplante alogénico o xenogénico, rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, diabetes tipo I, fibrosis pulmonar, dermatomiositis, tiroiditis, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, fibrosis quística, hepatitis recurrente crónica, cirrosis biliar primaria, conjuntivitis alérgica, hepatitis y dermatitis atópica, asma y síndrome de Sjogren.
- 40 Los compuestos descritos en el presente documento modulan una actividad de, modulan una interacción de, o se unen a, o interactúan con al menos una porción de una proteína en el complejo de canales de calcio dependientes de depósito. En una realización, los compuestos descritos en el presente documento modulan una actividad de, modulan una interacción de, o se unen a, o interactúan con al menos una porción de una proteína en el complejo de canales de calcio activados por la liberación de calcio. En una realización, los compuestos descritos en el presente
- 45 documento reducen el nivel de complejos de canales de calcio dependientes de depósito funcionales. En otra realización, los compuestos descritos en el presente documento reducen el nivel de complejos de canales de calcio dependientes de depósito activados. En una realización adicional, los complejos de canales de calcio dependientes de depósito son complejos de canales de calcio activados por la liberación de calcio.
- 50 Los compuestos de la presente invención que son capaces de modular los niveles de calcio intracelular para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, cuando se administran a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, reducen, mejoran o eliminan eficazmente un síntoma o manifestación de la enfermedad, afección o trastorno. En otras realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un sujeto predispuesto a una enfermedad, afección o trastorno que todavía no manifiesta un síntoma de la enfermedad,
- 55 afección o trastorno, y previene o retrasa el desarrollo de los síntomas. En realizaciones adicionales, el compuesto de la presente invención tiene dichos efectos solo o junto con otros agentes, o funciona para potenciar un efecto terapéutico de otro agente.

Otra descripción es un método para tratar una enfermedad proliferativa a través de la modulación de calcio

administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de al menos un compuesto de fórmula I, IA, IA-I, IA-II, IA-III y/o IA-IV, como se ha definido anteriormente.

- Aún otra descripción es un método para tratar una enfermedad proliferativa a través de la modulación de calcio
- 5 administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de al menos un compuesto de fórmula I, IA, IA-I, IA-II, IA-III y/o IA-IV, como se ha definido anteriormente, en combinación (simultánea o secuencialmente) con al menos un agente anticanceroso diferente. En una realización, la enfermedad proliferativa es cáncer.
- 10 Más particularmente, los compuestos de fórmula I, IA, IA-I, IA-II, IA-III y/o IA-IV y ésteres o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden administrar para el tratamiento, prevención y/o mejora de enfermedades o trastornos que involucran calcio, incluyendo, pero sin limitación, cáncer y otras enfermedades o trastornos proliferativos.
- 15 Los compuestos de fórmula I, IA, IA-I, IA-II, IA-III y/o IA-IV son útiles en el tratamiento de una diversidad de cánceres, incluyendo, pero sin limitación, los siguientes:
- tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, y linfoma de Burkett;
 - tumores hematopoyéticos de linaje mieloides, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica;
 - carcinoma, incluido el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas;
 - tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma;
 - tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; y
 - otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratoacantoma, cáncer folicular tiroideo y sarcoma de Kaposi.

Debido al papel clave del calcio en la regulación de la proliferación celular en general, los inhibidores del canal de calcio podrían actuar como agentes citostáticos reversibles que pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier proceso de enfermedad que presente una proliferación celular anormal, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, poliposis adenomatosa familiar, neuro-fibromatosis, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, psoriasis, glomerulonefritis, reestenosis después de angioplastia o cirugía vascular, formación de cicatriz hipertrófica, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplante, choque endotóxico e infecciones fúngicas.

Los compuestos de la presente invención, como moduladores de la apoptosis, son útiles en el tratamiento del cáncer (incluyendo, pero sin limitación, los tipos mencionados anteriormente en el presente documento), infecciones virales (incluyendo, pero sin limitación, virus del herpes, poxvirus, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis y adenovirus), prevención del desarrollo del sida en individuos infectados por VIH, enfermedades autoinmunes (incluyendo, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis mediada por autoinmunidad, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, y diabetes mellitus autoinmune), trastornos neurodegenerativos (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con el SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelosa), síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica, lesión isquémica asociados con infartos de miocardio, ictus y lesión por reperfusión, arritmia, aterosclerosis, enfermedades hepáticas inducidas por toxinas o relacionadas con alcohol, enfermedades hematológicas (incluyendo, pero sin limitación, anemia crónica y anemia aplásica), enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético (incluyendo, pero sin limitación, osteoporosis y artritis) rinosinusitis sensible a la aspirina, fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades renales y dolor por cáncer.

Los compuestos de la presente invención pueden modular el nivel de síntesis de ARN y ADN celular. Por lo tanto, estos agentes son útiles en el tratamiento de infecciones víricas (incluyendo, pero sin limitación, VIH, virus del papiloma humano, virus del herpes, virus de la viruela, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis y adenovirus).

Los compuestos de la presente invención son útiles en la quimioprevención de cáncer. La quimioprevención se define como la inhibición del desarrollo de cáncer invasivo bloqueando el evento mutagénico iniciador o bloqueando la progresión de células pre-neoplásicas que ya han sufrido un insulto o que inhiben la recaída tumoral. Los

compuestos también son útiles para inhibir la angiogénesis y la metástasis tumoral.

Los compuestos de la presente invención también son útiles en combinación (administrados conjunta o secuencialmente) con tratamientos anticancerosos conocidos tales como terapia de radiación o con agentes 5 citostáticos o citotóxicos o anticancerosos, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, agentes interactivos de ADN, tal como cisplatino o doxorubicina; inhibidores de topoisomerasa II, tales como etopósido; inhibidores de topoisomerasa I tales como CPT-11 o toptotecán; agentes que interaccionan con tubulina, tales como paclitaxel, docetaxel o las epotilonas (por ejemplo, ixabepilona), ya sean naturales o sintéticas; agentes hormonales, tales como tamoxifeno; inhibidores de timidilato sintasa, tales como 5-fluorouracilo; y antimetabolitos, tales como 10 metotrexato, otros inhibidores de tirosina cinasa tales como lressa y OSI-774; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de EGF; inhibidores de VEGF; inhibidores de CDK; inhibidores de SRC; inhibidores de c-Kit; inhibidores de Her1/2 y anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores de factores de crecimiento tales como erbitux (EGF) y herceptina (Her2), y también otros moduladores de proteína cinasa.

15 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todavía otra realización de la invención es una forma de dosificación que comprende uno o más compuestos de la presente invención, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La forma de dosificación puede 20 ser, por ejemplo, una forma de dosificación oral sólida tal como un comprimido o cápsula.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, se describirán ahora realizaciones 25 preferidas a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas en las que los mismos números de referencia se refieren a partes similares y en las que:

La Figura 1 es una imagen de un gel que muestra la expresión de ARNm de *Orai1* y STIM1 en líneas celulares A549 y NCI-H460. Se usó ARNm de Jurkat como control.

30 La Figura 2 es un gráfico del porcentaje de inhibición del flujo de calcio inducido por taspigargina frente al logaritmo de concentración del compuesto A.

La Figura 3 es un gráfico del porcentaje de inhibición de la proliferación de células NCI-H460 frente al logaritmo de concentración del compuesto A.

35 La Figura 4 es una imagen de un gel que muestra el efecto del compuesto B sobre la expresión de *Orai* y STIM en la línea celular NCI-H460.

La Figura 5 es un gráfico del volumen tumoral en ratones desnudos hembra Balb/c que portan un xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas NCI-H460, que se está tratando con un vehículo, taxol o compuesto A.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente en el campo al que pertenece la materia objeto reivindicada. En caso de que exista una pluralidad de definiciones para los términos en el presente documento, 45 prevalecerán las de esta sección.

Debe entenderse que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de ninguna materia objeto reivindicada. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente otra cosa. Debe observarse que, como se usa en la memoria 50 descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluir", "incluye" e "incluido", no es limitante.

55 La definición de términos de química estándar y biología molecular se encuentra en trabajos de referencia, incluyendo, pero sin limitación, Carey y Sundberg "ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY 4th edition" Vols. A (2000) y B (2001), Plenum Press, Nueva York y "MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 5th edition" (2007), Garland Science, Nueva York. A menos que se indique lo contrario, los métodos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, se

contemplan dentro del alcance de las realizaciones descritas en el presente documento.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura empleada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, y química médica y farmacéutica descrita en el presente documento son las utilizadas generalmente. En algunas realizaciones, las técnicas estándar se usan para análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes. En otras realizaciones, se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). En realizaciones más precisas, las reacciones y las técnicas de purificación se realizan, por ejemplo, usando kits de especificaciones del fabricante o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente por métodos convencionales y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva.

Como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique otra cosa. Además, muchos de los grupos definidos en el presente documento pueden estar opcionalmente sustituidos. La lista de sustituyentes en la definición es ejemplar y no debe interpretarse como limitante de los sustituyentes definidos en otra parte en la memoria descriptiva.

El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, que tiene de uno a ocho átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo y 1,1-dimetiletilo (t-butilo).

El término alquilo (C_{1-6}) sustituido o sin sustituir se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente que tiene hasta 6 átomos de carbono.

El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser una cadena lineal o ramificada que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), iso-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo y 2-butenilo.

El término alqueno (C_{1-6}) sustituido o sin sustituir se refiere a un grupo alqueno como se ha definido anteriormente que tiene hasta 6 átomos de carbono.

El término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, y que tiene en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono (prefiriéndose actualmente radicales que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 a 10 átomos de carbono), por ejemplo, etinilo, propinilo y butinilo.

El término alquino (C_{1-6}) sustituido o sin sustituir se refiere a un grupo alquino como se ha definido anteriormente que tiene hasta 6 átomos de carbono.

El término "alcoxi" representa un grupo alquilo como se ha definido anteriormente, unido a través de un enlace de oxígeno al resto de la molécula. Los ejemplos representativos de estos grupos son $-OCH_3$ y $-OC_2H_5$.

El término "cicloalquilo" representa un sistema anular no aromático mono o multicíclico de aproximadamente 3 a 12 átomos de carbono tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Los ejemplos no limitantes de grupos cicloalquilo multicíclicos incluyen grupos perhidronaftilo, adamantilo, norbornilo (grupo cíclico puenteado), o grupos espirobicíclicos, por ejemplo, espiro (4,4) non-2-ilo.

El término "cicloalquilalquilo" se refiere a un radical que contiene un anillo cíclico que contiene de 3 hasta 8 átomos de carbono directamente unidos a un grupo alquilo que luego se une a la estructura principal en cualquier carbono en el grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable tal como ciclopropilmetilo, ciclobutiletilo y ciclopentiletilo.

El término "cicloalqueno" se refiere a un radical que contiene anillos cíclicos que contiene en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono con al menos un doble enlace carbono-carbono, tal como ciclopropenilo, ciclobutenilo y ciclopentenilo.

El término "arilo" se refiere a un radical aromático que tiene en el intervalo de 6 hasta 20 átomos de carbono, tales como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, y bifenilo.

El término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo como se ha definido anteriormente, unido directamente a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, y $-\text{C}_2\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5$.

El término "anillo heterocíclico" se refiere a un radical anular no aromático de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. Para los fines de esta invención, el radical de anillo heterocíclico puede ser un sistema anular mono-, bi-, tri- o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados, puenteados o espiro, y los átomos de nitrógeno, fósforo, carbono, oxígeno o azufre en el radical de anillo heterocíclico se pueden oxidar opcionalmente a diversos estados de oxidación. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El radical de anillo heterocíclico puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático de 5-14 miembros opcionalmente sustituido que tiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S como átomos del anillo. El heteroarilo puede ser un sistema anular mono, bi o tricíclico. Los ejemplos de dichos radicales anulares de heteroarilo incluyen, pero sin limitación, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirrolilo, furanilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, carbazolilo, quinolilo e isoquinolilo. El radical de anillo de heteroarilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable.

Los ejemplos de dichos radicales "de anillo heterocíclico" o "heteroarilo" incluyen, pero sin limitación, azetidino, acridinilo, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofurnilo, carbazolilo, cinnolinilo, dioxolanilo, indolizino, naftiridinilo, perhidroazepinilo, fenazino, fenotiazino, fenoxazino, ftalazino, piridilo, pteridinilo, purinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazolo, imidazolilo, tetrahydroisoquinolilo, piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, azepinilo, pirrolilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, oxazolinilo, oxasolidinilo, triazolilo, indanilo, isoxazolilo, isoxasolidinilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, quinuclidinilo, isotiazolidinilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, decahidroisoquinolilo, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopirano, benzotiazolilo, benzooxazolilo, furilo, tetrahydrofurtilo, tetrahidropirano, tienilo, benzotienilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinil sulfóxido tiamorfolinil sulfona, dioxafosfolano, oxadiazolilo, cromano, isocromano, y similares.

El término "heteroarilalquilo" se refiere a un radical de anillo de heteroarilo como se ha definido anteriormente directamente unido a un grupo alquilo. El radical heteroarilalquilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier átomo de carbono del grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heterocicilalquilo" se refiere a un radical de anillo heterocíclico como se ha definido anteriormente unido directamente a un grupo alquilo. El radical heterocicilalquilo puede estar unido a la estructura principal en un átomo de carbono en el grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "sustituido", a menos que se especifique otra cosa, se refiere a una sustitución con uno cualquiera o cualquier combinación de los siguientes sustituyentes: hidrógeno, hidroxilo, halógeno, carboxilo, ciano, nitro, oxo (=O), tio(=S), alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, anillo heterocicilalquilo sustituido, heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir, guanidina sustituida o sin sustituir, $-\text{COOR}^x$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^x$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^x$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{C}(\text{O})\text{ONR}^x\text{R}^y$, $-\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{NR}^x\text{CONR}^y\text{R}^z$, $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SOR}^y$, $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SO}_2\text{R}^y$, $-(=\text{N}-\text{N}(\text{R}^x)\text{R}^y)$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$, $-\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{O})\text{R}^y$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{S})\text{R}^y$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{S})\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{SONR}^x\text{R}^y$, $-\text{SO}_2\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{OR}^x$, $-\text{OR}^x\text{C}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{OR}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^x$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{R}^x\text{NR}^y\text{C}(\text{O})\text{R}^z$, $-\text{R}^x\text{OR}^y$, $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$, $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{R}^x$, $-\text{R}^x\text{OC}(\text{O})\text{R}^y$, $-\text{SR}^x$, $-\text{SOR}^x$, $-\text{SO}_2\text{R}^x$, y $-\text{ONO}_2$, en los que R^x , R^y y R^z en cada uno de los grupos anteriores puede ser un átomo de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, anillo heterocicilalquilo sustituido, heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir, o cualesquiera dos de R^x , R^y y R^z pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente heteroátomos que pueden ser iguales o

diferentes y se seleccionan de O, NR^x o S. Los sustituyentes en los grupos "sustituídos" mencionados anteriormente no pueden estar sustituidos adicionalmente. Por ejemplo, cuando el sustituyente en "alquilo sustituido" es "arilo sustituido", el sustituyente en "arilo sustituido" no puede ser "alqueno sustituido". La sustitución o la combinación de sustituyentes previstos por esta invención son preferiblemente los que dan como resultado la formación de un compuesto estable.

El término "halógeno" o "halo" se refiere a radicales de flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "grupo protector" o "PG" se refiere a un sustituyente que se emplea para bloquear o proteger una funcionalidad particular. Otros grupos funcionales en el compuesto pueden permanecer reactivos. Por ejemplo, un "grupo protector de amino" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Los grupos protectores amino adecuados incluyen, pero sin limitación, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxycarbonilo (CBz) y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). De forma similar, un "grupo protector hidroxilo" se refiere a un sustituyente de un grupo hidroxilo que bloquea o protege la funcionalidad hidroxilo. Los grupos protectores hidroxilo adecuados incluyen, pero sin limitación, acetilo y sililo. Un "grupo protector carboxilo" se refiere a un sustituyente del grupo carboxilo que bloquea o protege la funcionalidad carboxilo. Los grupos protectores carboxilo adecuados incluyen, pero sin limitación, -CH₂CH₂SO₂Ph, cianoetilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, 2-toluenosulfonil)etilo, 2-(p-nitrofenilsulfenil)etilo, 2-difenil-1-fosfino)-etilo y nitroetilo. Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

El término "estereoisómero" se refiere a compuestos que tienen una composición química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos y los grupos en el espacio. Estos incluyen enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos, atropisómeros o isómeros conformacionales.

Todos los estereoisómeros de los compuestos descritos en el presente documento están dentro del alcance de esta invención. Las mezclas racémicas también se incluyen dentro del alcance de esta invención. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas, diastereoisoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención.

El término "tautómeros" se refiere a compuestos, que se caracterizan por una interconversión relativamente fácil de formas isoméricas en equilibrio. Se pretende que estos isómeros estén cubiertos por esta invención.

El término "profármaco" se refiere a compuestos, que son un precursor inactivo de un compuesto, convertido en su forma activa en el cuerpo mediante procesos metabólicos normales.

El término "éster" se refiere a compuestos, que se forman por reacción entre un ácido y un alcohol con eliminación de agua. Un éster se puede representar mediante la fórmula RCOOR', donde R es el compuesto base y R' es el resto éster (por ejemplo, un grupo etilo).

Adicionalmente, la presente invención también incluye los compuestos que difieren solamente en presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos, por ejemplo, la sustitución de hidrógeno por deuterio y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables que forman parte de esta invención incluyen sales derivadas de bases inorgánicas tales como Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn; sales de bases orgánicas tales como N,N'-diacetiletildiamina, glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, dicitclohexilamina, metformina, bencilamina, trialquilamina y tiamina; bases quirales tales como alquilfenilamina, glicinol y fenilglicol; sales de aminoácidos naturales tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxiprolina, histidina, ornitina, lisina, arginina y serina; sales de amonio cuaternario de los compuestos de la invención con haluros de alquilo o sulfatos de alquilo tales como MeI y (Me)₂SO₄; aminoácidos no naturales tales como D-isómeros o aminoácidos sustituidos; guanidina y guanidina sustituida en la que los sustituyentes se seleccionan de nitro, amino, alquilo, alqueno, alquinilo, sales de amonio o amonio sustituido y sales de aluminio. Las sales pueden incluir sales de adición de ácidos cuando sea apropiado, que son sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidroháluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, fumaratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencenosulfonatos, ascorbato, glicerofosfatos y cetoglutaratos.

El término "sujeto" o "paciente" incluye mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, cualquier miembro de la clase Mamíferos: seres humanos; primates no humanos, tales como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja, tales como ganado bovino, caballos, ovejas, cabras, y

cerdos; animales domésticos, tales como conejos, perros y gatos; y animales de laboratorio, incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas. Los ejemplos de animales no mamíferos incluyen, pero sin limitación, aves y peces. En una realización de los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento, el mamífero es un ser humano.

5

Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento", como se usan en el presente documento, incluyen aliviar, disminuir o mejorar síntomas de enfermedad, trastorno o afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad, trastorno o condición, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad, trastorno o afección, aliviar la enfermedad, trastorno o afección, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad, trastorno o afección, o detener los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección de forma profiláctica y/o terapéutica.

10

Como se usa en el presente documento, el término "proteína diana" se refiere a una proteína o una porción de una proteína capaz de unirse, o interactuar con un compuesto descrito en el presente documento, tal como un compuesto capaz de modular una proteína STIM y/o una proteína Orai. En ciertas realizaciones, una proteína diana es una proteína STIM. En otras realizaciones, una proteína diana es una proteína Orai, y en aún otras realizaciones, el compuesto se dirige tanto a la proteína STIM como a la proteína Orai.

15

El término "proteína STIM" se refiere a cualquier proteína situada en la membrana reticular o plasmática endoplásmica que activa un aumento en la tasa de flujo de calcio en una célula por un canal CRAC. (STIM se refiere a una molécula de interacción estromal). Como se usa en el presente documento, "proteína STIM" incluye, pero sin limitación, STIM-1 de mamífero, tal como STIM-1 humano y de roedor (por ejemplo, ratón), D-STIM de *Drosophila melanogaster*, C-STIM de *C. elegans*, STIM de *Anopheles gambiae* y STIM-2 mamífero, tal como STIM-2 humano y de roedor (por ejemplo, ratón). Como se describe en el presente documento, se ha identificado que dichas proteínas están involucradas en, participan y/o proporcionan la entrada del calcio dependiente de depósito o modulación del mismo, el tamponamiento citoplásmico de calcio y/o la modulación de los niveles de calcio en o el movimiento del calcio en, dentro o fuera de los depósitos de calcio intracelular (por ejemplo, retículo endoplásmico).

20

Se apreciará por "activar" o "activación" se entiende la capacidad de una proteína STIM para regular positivamente, estimular, potenciar o facilitar de otra manera el flujo de calcio en una célula por un canal CRAC. Se prevé que la comunicación cruzada entre la proteína STIM y el canal CRAC puede producirse por una interacción molecular directa o indirecta. Adecuadamente, la proteína STIM es una proteína transmembrana que está asociada con, o muy cerca de, un canal CRAC.

30

Se sabe en la técnica que STIM1 es un componente esencial de la activación del canal CRAC. Los presentes inventores han observado que STIM1 y STIM2 se expresan en ciertas líneas celulares de NSCLC. Además, CRACM1/Orai1 y CRACM3/Orai3 se expresan en exceso en determinadas líneas celulares de NSCLC. Aunque sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, las proteínas CRAC y STIM contribuyen potencialmente a la activación de las rutas proliferativas en las células NSCLC de la siguiente manera: (i) excesiva desregulación de STIM en células NSCLC da como resultado una acumulación incorrecta de STIM en la membrana plasmática, e ii) en la membrana plasmática, STIM activa CRAC (mediante interacción directa o indirecta), lo que da como resultado un influjo excesivo de calcio en la célula y promueve la transcripción, la proliferación y la invasividad en las células de NSCLC. Por lo tanto, la inhibición del canal CRAC o la ruta STIM es un tratamiento eficaz para NSCLC.

40

Como se usa en el presente documento, una "proteína Orai" incluye Orai1 (SEQ ID NO: 1 como se describe en el documento WO 07/081,804), Orai2 (SEQ ID NO: 2 como se describe en el documento WO 07/081,804), o Orai3 (SEQ ID NO: 3 como se describe en el documento WO 07/081,804). La secuencia de ácido nucleico Orai1 corresponde al número de acceso de GenBank NM-032790, la secuencia de ácido nucleico Orai2 corresponde al número de acceso de GenBank BC069270 y la secuencia de ácido nucleico Orai3 corresponde al número de acceso de GenBank NM-152288. Como se usa en el presente documento, Orai se refiere a cualquiera de los genes Orai, por ejemplo, Orai1, Orai2 y Orai3 (véase la Tabla I del documento WO 07/081,804). Como se describe en el presente documento, se ha identificado que dichas proteínas están involucradas en, participan y/o proporcionan la entrada del calcio dependiente de depósito o modulación del mismo, el tamponamiento citoplásmico de calcio y/o la modulación de los niveles de calcio en o el movimiento del calcio en, dentro o fuera de los depósitos de calcio intracelular (por ejemplo, retículo endoplásmico). En realizaciones alternativas, una proteína Orai puede marcarse con una molécula marcadora, solo a modo de ejemplo, un fragmento de enzima, una proteína (por ejemplo, c-myc u otra proteína marcadora o fragmento de la misma), una etiqueta enzimática, una etiqueta fluorescente, una etiqueta de fluoróforo, una etiqueta de cromóforo, una etiqueta activada por Raman, una etiqueta quimioluminiscente, un marcador de puntos cuánticos, un anticuerpo, una etiqueta radioactiva, o una combinación de los mismos.

50

55

El término "fragmento" o "derivado" cuando se refiere a una proteína (por ejemplo, STIM, Orai) significa proteínas o polipéptidos que retienen esencialmente la misma función o actividad biológica en al menos un ensayo como proteína o proteínas nativas. Por ejemplo, el fragmento o derivado de la proteína a la que se hace referencia 5 mantiene preferiblemente al menos aproximadamente el 50 % de la actividad de la proteína nativa, al menos el 75 %, o al menos aproximadamente el 95 % de la actividad de la proteína nativa, como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de afluencia de calcio.

Como se usa en el presente documento, "mejora" se refiere a una mejora en una enfermedad o afección o al menos 10 un alivio parcial de los síntomas asociados con una enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, la mejora de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular mediante la administración de un compuesto particular o composición farmacéutica se refiere a cualquier disminución de la gravedad, retraso en el inicio, ralentización de la progresión o acortamiento de la duración, ya sea permanente o temporal, duraderos o transitorios que se atribuyen a o asociados con la administración del compuesto o composición.

15 El término "modular", como se usa en el presente documento, significa interactuar con una proteína diana directa o indirectamente a fin de alterar la actividad de la proteína diana, incluyendo, solo a modo de ejemplo, inhibir la actividad de la diana, o limitar o reducir la actividad de la diana.

20 Como se usa en el presente documento, el término "modulador" se refiere a un compuesto que altera una actividad de una diana (por ejemplo, una proteína diana). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un modulador provoca un aumento o disminución en la magnitud de una determinada actividad de una diana en comparación con la magnitud de la actividad en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de una o más actividades de una diana. En ciertas realizaciones, un inhibidor evita completamente una o 25 más actividades de una diana.

Como se usa en el presente documento, "modulación" con referencia al calcio intracelular se refiere a cualquier alteración o ajuste en calcio intracelular que incluye, pero sin limitación, la alteración de la concentración de calcio en los orgánulos de almacenamiento de calcio del citoplasma y/o intracelular, por ejemplo, retículo endoplásmico, o 30 alteración de la cinética de los flujos de calcio en, fuera y dentro de las células. En aspecto, la modulación se refiere a la reducción.

Los términos "inhibe", "inhibir" o "inhibidor" de la actividad del canal SOC o actividad del canal CRAC, como se usan en el presente documento, se refieren a la inhibición de la actividad del canal de calcio dependiente de depósito o la 35 actividad del canal de calcio activado por la liberación de calcio.

El término "aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente, como se usa en el presente documento, significa que no tiene un efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que se está 40 tratando.

El término entidades moleculares "farmacéuticamente aceptables" y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen típicamente una reacción adversa alérgica o similar, tal como trastorno gástrico y mareo, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o 45 enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto de la presente invención con otros componentes químicos, tales como vehículos, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de 50 suspensión, agentes espesantes y/o excipientes.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por diversas vías de administración que incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, oral, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar y tópica. 55

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se trata. El resultado es la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por

ejemplo, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es la cantidad de un compuesto de la presente invención requerida para proporcionar una disminución clínicamente significativa en los síntomas de la enfermedad. En algunas realizaciones, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual se determina usando técnicas, tales como un estudio de escalamiento de dosis.

5

Los términos "potenciar" o "que potencia", como se usan en el presente documento, significan aumentar o prolongar en potencia o duración un efecto deseado. Por lo tanto, con respecto a potenciar el efecto de los agentes terapéuticos, el término "mejorar" se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, en potencia o duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una "cantidad eficaz potenciadora", como se usa en el presente

10

documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado.

El término "vehículo", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos o agentes químicos relativamente no tóxicos que facilitan la incorporación de un compuesto en células o tejidos.

15

El término "diluyente" se refiere a compuestos químicos que se usan para diluir el compuesto de interés antes de la administración. En algunas realizaciones, los diluyentes se usan para estabilizar compuestos porque proporcionan un entorno más estable. Las sales disueltas en soluciones tamponadas (que también proporcionan control de pH o mantenimiento) se utilizan como diluyentes, incluyendo, pero sin limitación, una solución salina tamponada con fosfato.

20

Por "célula cancerosa" se entiende una célula del pulmón, que incluye una célula preneoplásica, una célula neoplásica, una célula neoplásica, una célula tumorigénica, una célula no tumorigénica, y una célula madre de cáncer de pulmón.

25

Como se usa en el presente documento, "calcio intracelular" se refiere a calcio localizado en una célula sin especificación de una ubicación celular particular. Por el contrario, "citoplásmico" o "citoplásmico" con referencia al calcio se refiere al calcio localizado en el citoplasma de la célula.

30

Como se usa en el presente documento, un efecto sobre el calcio intracelular es cualquier alteración de cualquier aspecto del calcio intracelular, incluyendo, pero sin limitación, una alteración en los niveles de calcio intracelular y la ubicación y movimiento del calcio en, fuera o dentro de una célula o depósito de calcio intracelular u orgánulo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un efecto sobre el calcio intracelular es una alteración de las propiedades, tal como, por ejemplo, la cinética, las sensibilidades, la velocidad, la amplitud y las características electrofisiológicas del

35

flujo o movimiento de calcio que se produce en una célula o porción de la misma. En algunas realizaciones, un efecto sobre el calcio intracelular es una alteración en cualquier proceso de modulación de calcio intracelular, incluyendo la entrada de calcio dependiente de depósito, el tampón de calcio citoplásmico, y los niveles de calcio en o el movimiento del calcio en, fuera de o dentro de un almacén de calcio intracelular. Cualquiera de estos aspectos se evalúa en una variedad de formas incluyendo, pero sin limitación, la evaluación de los niveles de calcio u otro ión

40

(particularmente catión), el movimiento de calcio u otro ión (particularmente catión), fluctuaciones en los niveles de calcio u otro ión (particularmente catión), la cinética de los flujos de calcio u otro ión (particularmente catión) y/o el transporte del calcio u otro ión (particularmente catión) a través de una membrana. Una alteración es cualquier cambio que sea estadísticamente significativo. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, si se dice que el calcio intracelular en una célula de ensayo y una célula de control son diferentes, dichas diferencias son una

45

diferencia estadísticamente significativa.

La modulación de calcio intracelular es cualquier alteración o ajuste en calcio intracelular incluyendo, pero sin limitación, la alteración de la concentración o nivel de calcio en el citoplasma y/o orgánulos de almacenamiento de calcio intracelular, por ejemplo, el retículo endoplásmico, la alteración en el movimiento de calcio en, fuera de y

50

dentro de una célula o depósito de calcio intracelular u orgánulo, la alteración en la ubicación del calcio dentro de una célula, y la alteración de la cinética, u otras propiedades, de los flujos de calcio en, fuera y dentro de las células. En algunas realizaciones, la modulación de calcio intracelular implica la alteración o ajuste, por ejemplo, la reducción o inhibición, de la entrada de calcio dependiente de depósito, el tamponamiento de calcio citoplásmico, los niveles de calcio en o el movimiento del calcio en, fuera de o dentro de un depósito de calcio intracelular u orgánulo, y/o niveles

55

de calcio citoplásmico iniciales o en reposo. La modulación del calcio intracelular implica una alteración o ajuste en el movimiento de iones mediado por receptor (por ejemplo, calcio), el movimiento de iones dependiente del segundo mensajero (por ejemplo, calcio), entrada y salida de calcio de una célula, y/o la captación iónica (por ejemplo, calcio) en o la liberación de los compartimentos intracelulares, incluyendo, por ejemplo, endosomas y lisosomas.

- Como se usa en el presente documento, "implicado en", con respecto a la relación entre una proteína y un aspecto del calcio intracelular o la regulación del calcio intracelular significa que, cuando la expresión o actividad de la proteína en una célula se reduce, se altera o se elimina, hay una reducción, alteración o eliminación concomitante o asociada de uno o más aspectos del calcio intracelular o la regulación del calcio intracelular. Tal alteración o reducción en la expresión o actividad se produce en virtud de una alteración de la expresión de un gen que codifica la proteína o alterando los niveles de la proteína. Una proteína implicada en un aspecto del calcio intracelular, tal como, por ejemplo, la entrada de calcio dependiente de depósito, por lo tanto, es una que proporciona o participa en un aspecto del calcio intracelular o la regulación del calcio intracelular. Por ejemplo, una proteína que proporciona la entrada de calcio dependiente de depósito es una proteína STIM y/o una proteína Orai.
- Como se usa en el presente documento, una proteína que es un componente de un canal de calcio es una proteína que participa en el complejo de múltiples proteínas que forma el canal.
- Como se usa en el presente documento, "entrada de cationes" o "entrada de calcio" en una célula se refiere a la entrada de cationes, tales como calcio, en una ubicación intracelular, tal como el citoplasma de una célula o en el lumen de un orgánulo intracelular o sitio de almacenamiento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la entrada de cationes es, por ejemplo, el movimiento de cationes hacia el citoplasma celular desde el medio extracelular o desde un orgánulo o sitio de almacenamiento intracelular, o el movimiento de cationes hacia un orgánulo o sitio de almacenamiento intracelular desde el citoplasma o medio extracelular. El movimiento de calcio al citoplasma desde un orgánulo o sitio de almacenamiento intracelular también se denomina "liberación de calcio" desde el orgánulo o sitio de almacenamiento.
- Como se usa en el presente documento, "respuesta celular" se refiere a cualquier respuesta celular que da como resultado el movimiento de iones hacia o desde una célula o dentro de una célula. En algunas realizaciones, la respuesta celular está asociada con cualquier actividad celular que sea dependiente, al menos en parte, de iones tales como, por ejemplo, calcio. Dichas actividades incluyen opcionalmente, por ejemplo, activación celular, expresión génica, endocitosis, exocitosis, tráfico celular y muerte celular apoptótica.
- Como se usa en el presente documento, "células inmunes" incluyen células del sistema inmune y células que realizan una función o actividad en una respuesta inmune, tales como, pero sin limitación, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células plasmáticas, glóbulos blancos, células presentadoras de antígenos, y células asesinas naturales.
- Como se usa en el presente documento, "citocina" o "citocinas" se refiere a proteínas solubles pequeñas secretadas por células que en algunas realizaciones, alteran el comportamiento o las propiedades de la célula secretora u otra célula. Las citocinas se unen a receptores de citocinas y desencadenan un comportamiento o propiedad dentro de la célula, por ejemplo, proliferación celular, muerte o diferenciación. Las citocinas ejemplares incluyen, pero sin limitación, interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-1.alfa., IL-1.beta., e IL-1 RA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), oncostatina M, eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia (LIF), interferones, B7.1 (también conocido como CD80), B7.2 (también conocido como B70, CD86), miembros de la familia TNF (TNF-alfa, TNF-beta, LT-beta, ligando CD40, ligando Fas, ligando CD27, ligando CD30, 4-1BBL, Trail) y MIF.
- "Entrada de calcio dependiente de depósito" o "SOCE" se refiere al mecanismo mediante el cual la liberación de iones de calcio de los depósitos intracelulares se coordina con el influjo de iones a través de la membrana plasmática.
- La homeostasis del calcio celular es un resultado de la suma de los sistemas reguladores implicados en el control de los niveles y movimientos de calcio intracelular. La homeostasis celular del calcio se logra, al menos en parte, por la unión del calcio y por el movimiento del en y fuera de la célula a través de la membrana plasmática y dentro de la célula por movimiento de calcio a través de las membranas de los orgánulos intracelulares incluyendo, por ejemplo, el retículo endoplásmico, retículo sarcoplásmico, mitocondrias y orgánulos endocíticos, incluyendo endosomas y lisosomas.
- El movimiento de calcio a través de las membranas celulares se realiza mediante proteínas especializadas. Por ejemplo, el calcio del espacio extracelular entra a la célula a través de varios canales de calcio y un intercambiador de sodio/calcio y se extruye activamente de la célula mediante bombas de calcio y cambiadores de sodio/calcio. El calcio también se libera de los depósitos internos a través de receptores de trifosfato de inositol o rianodina y es

probable que se absorba por estos orgánulos por medio de bombas de calcio.

El calcio entra a las células por cualquiera de varias clases generales de canales, incluyendo, pero sin limitación, canales de calcio dependientes de voltaje (VOC), canales de calcio dependientes de depósito (SOC) e intercambiadores de sodio/calcio que funcionan de modo inverso. Los canales VOC se activan por la despolarización de la membrana y se encuentran en células excitables como nervios y músculos, y en su mayoría no se encuentran en células no excitables. En algunas condiciones, el Ca^{2+} también entra en las células a través de los intercambiadores de $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ que operan de modo inverso.

10 La endocitosis proporciona otro proceso mediante el cual las células toman calcio del medio extracelular a través de los endosomas. Además, algunas células, por ejemplo, células exocrinas, liberan calcio por exocitosis.

La concentración de calcio citosólico está estrechamente regulada con niveles de reposo generalmente estimados en aproximadamente $0,1 \mu\text{M}$ en células de mamífero, mientras que la concentración de calcio extracelular es típicamente de aproximadamente 2 mM . Esta regulación estricta facilita la transducción de señales hacia y dentro de las células a través del flujo transitorio de calcio a través de la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos intracelulares. Hay una multiplicidad de sistemas de tampón y transporte de calcio intracelular en las células que sirven para dar forma a las señales de calcio intracelular y mantener la baja concentración de calcio citoplásmico en reposo. En las células en reposo, los principales componentes implicados en el mantenimiento de los niveles iniciales de calcio son las bombas de calcio y las fugas en el retículo endoplásmico y la membrana plasmática. La alteración de los niveles de calcio citosólico en reposo realiza la transmisión de dichas señales y da lugar a defectos en una serie de procesos celulares. Por ejemplo, la proliferación celular implica una secuencia de señalización de calcio prolongada. Otros procesos celulares incluyen, pero sin limitación, secreción, señalización y fertilización, implican la señalización de calcio.

25 Los receptores de superficie celular que activan la fosfolipasa C (PLC) crean señales citosólicas de Ca^{2+} a partir de fuentes intracelulares y extracelulares. Un aumento transitorio inicial de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (concentración de calcio intracelular) es resultado de la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (RE), que se desencadena por el producto de PLC, inositol-1,4,5-trisfosfato (P_3), abriendo los receptores IP_3 en el RE (Streb et al. *Nature*, 306, 67-69, 1983). A continuación, se produce una fase posterior de entrada sostenida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, a través de canales de calcio dependientes de depósito (SOC) (en el caso de las células inmunes, los canales SOC son canales de calcio activados por la liberación de calcio) en la membrana plasmática. La entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito (SOCE) es el proceso en el que el vaciado de los propios depósitos de Ca^{2+} activa los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática para ayudar a rellenar los depósitos (Putney, *Cell Calcium*, 7, 1-12, 1986; Parekh et al, *Physiol. Rev.* 757-810; 2005). SOCE hace más que simplemente proporcionar Ca^{2+} para rellenar depósitos, pero a su vez genera señales sostenidas de Ca^{2+} que controlan dichas funciones esenciales como la expresión génica, el metabolismo celular y la exocitosis (Parekh y Putney, *Physiol. Rev.* 85, 757-810 (2005).

En los linfocitos y los mastocitos, la activación del antígeno o de los receptores de Fc provoca la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, lo que a su vez conduce al influjo de Ca^{2+} a través de los canales CRAC en la membrana plasmática. El aumento posterior del Ca^{2+} intracelular activa la calcineurina, una fosfatasa que regula el factor de transcripción NFAT. En las células en reposo, NFAT se fosforila y reside en el citoplasma, pero cuando se desfosforila por la calcineurina, NFAT se transloca al núcleo y activa diferentes programas genéticos dependiendo de las condiciones de estimulación y el tipo de célula. En respuesta a infecciones y durante el rechazo de trasplantes, NFAT se asocia con el factor de transcripción AP-1 (Fos-Jun) en el núcleo de los linfocitos T "efectores", transactivando de este modo los genes de citocinas, genes que regulan la proliferación de linfocitos T y otros genes que orquestan una respuesta inmune activa (Rao et al., *Annu Rev Immunol*, 1997; 15:707-47). Por el contrario, en los linfocitos T que reconocen autoantígenos, NFAT se activa en ausencia de AP-1, y activa un programa de transcripción conocido como "anergia" que suprime las respuestas autoinmunes (Macian et al., *Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. Cell.* 2002 Jun. 14; 109(6):719-31). En una subclase de linfocitos T, conocida como linfocitos T reguladores que suprimen la autoinmunidad mediada por linfocitos T efectores autorreactivos, NFAT se asocia con el factor de transcripción FOXP3 para activar genes responsables de la función supresora (Wu et al., *Cell*, 2006 Jul. 28; 126(2):375-87; Rudensky A Y, Gavin M, Zheng Y. *Cell.* 2006 Jul. 28; 126(2):253-256).

55 El retículo endoplásmico (RE) lleva a cabo una diversidad de procesos. El RE desempeña un papel tanto como el depósito de Ca^{2+} sensible al agonista como sumidero, el plegamiento/procesamiento de proteínas tiene lugar dentro de su lumen. Aquí, numerosas proteínas chaperonas dependientes de Ca^{2+} aseguran que las proteínas recién sintetizadas se plieguen correctamente y se envíen al destino apropiado. El RE también está involucrado en el

tráfico de vesículas, la liberación de señales de estrés, la regulación del metabolismo del colesterol, y la apoptosis. Muchos de estos procesos requieren Ca^{2+} intraluminal, y el plegamiento incorrecto de proteínas, las respuestas de estrés del RE, y la apoptosis probablemente se inducen al agotar el RE de Ca^{2+} durante períodos de tiempo prolongados. Debido a su papel como fuente de Ca^{2+} , está claro que el contenido de Ca^{2+} del RE debe descender 5 después de la estimulación. Sin embargo, para preservar la integridad funcional del RE, es vital que el contenido de Ca^{2+} no descienda demasiado o se mantenga en un nivel bajo. La reposición del RE con Ca^{2+} es, por lo tanto, un proceso central para todas las células eucariotas. Debido a que un descenso del contenido Ca^{2+} del RE activa los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito en la membrana plasmática, se cree que una función principal de esta ruta de entrada de Ca^{2+} es el mantenimiento de los niveles Ca^{2+} del RE que son necesarios para la apropiada 10 síntesis y plegamiento de proteínas. Sin embargo, los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito tienen otras funciones importantes.

La comprensión de la entrada de calcio dependiente de depósito se proporcionó por estudios electrofisiológicos que establecieron que el proceso de vaciado de los depósitos activaba una corriente de Ca^{2+} en mastocitos denominada 15 corriente de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+} o I_{CRAC} . I_{CRAC} no está activada por voltaje, rectificando hacia dentro, y notablemente selectiva para Ca^{2+} . Se encuentra en varios tipos de células principalmente de origen hemopoyético. I_{CRAC} no es la única corriente dependiente de depósito, y ahora es evidente que la afluencia dependiente de depósito incluye una familia de canales permeables a Ca^{2+} , con diferentes propiedades en diferentes tipos de células. I_{CRAC} fue la primera corriente de Ca^{2+} dependiente de depósito en describirse y sigue siendo un modelo popular para 20 estudiar la afluencia dependiente de depósito.

Los efectos de los compuestos o agentes sobre el calcio intracelular se pueden controlar usando diversos métodos de selección/identificación que proporcionan una evaluación o medición directa o indirecta del calcio celular (incluyendo el orgánulo o compartimento citosólico e intracelulares) y/o el movimiento de iones en, dentro o fuera de 25 una célula, orgánulo, depósito de calcio o porciones del mismo (por ejemplo, una membrana). Se pueden usar una diversidad de métodos para evaluar los niveles de calcio y los movimientos o flujos de iones. El método particular utilizado y las condiciones empleadas dependerán de si se está controlando o evaluando un aspecto particular del calcio intracelular. Por ejemplo, en algunos aspectos, los reactivos y las condiciones se pueden usar para evaluar específicamente la entrada de calcio dependiente de depósito, los niveles de calcio citosólico en reposo, el tampón 30 de calcio, y los niveles de calcio y la absorción o liberación de los orgánulos intracelulares y los depósitos de calcio. Como alternativa, el efecto de un compuesto o agente sobre el calcio intracelular puede controlarse o evaluarse usando, por ejemplo, una célula, un compartimento de depósito de calcio u orgánulo intracelular, una membrana (incluyendo, por ejemplo, un parche de membrana desprendido o una bicapa lipídica) o un sistema de ensayo libre de células (por ejemplo, vesícula de membrana exterior). Generalmente, se controla o se evalúa algún aspecto del 35 calcio intracelular en presencia del agente de ensayo y se compara con un control, por ejemplo, calcio intracelular en ausencia de agente de ensayo.

Enfermedades, trastornos o afecciones

40 Los estudios clínicos demuestran que el canal CRAC es absolutamente necesario para la activación de los genes que subyacen a la respuesta de los linfocitos T al antígeno. La entrada sostenida de calcio es necesaria para la activación de linfocitos y la respuesta inmune adaptativa. La entrada de calcio en los linfocitos se produce principalmente a través de los canales CRAC. El aumento de calcio conduce a la activación de NFAT y a la expresión de citocinas necesarias para la respuesta inmune. La inhibición de la entrada de calcio dependiente de 45 depósito es una forma eficiente de prevenir la activación de los linfocitos T.

La inhibición de la actividad del canal CRAC con los compuestos que modulan los niveles de calcio intracelular proporciona un medio para proporcionar terapia inmunosupresora como se demuestra por la eliminación de la entrada de calcio dependiente de depósito observada en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). 50 Los linfocitos T, los fibroblastos y, en algunos casos, los linfocitos B de pacientes con inmunodeficiencia de linfocitos T o SCID que tienen un defecto principal en la activación de los linfocitos T muestran un fuerte defecto en la entrada de calcio dependiente de depósito. Los pacientes con SCID carecen de respuesta inmune adaptativa, pero sin ninguna alteración o toxicidad en los órganos principales. El fenotipo del paciente con SCID indica que la inhibición de los canales CRAC es una estrategia eficaz para la inmunosupresión. 55

Enfermedades/trastornos que implican inflamación y enfermedades/trastornos relacionados con el sistema inmune

En algunas realizaciones, enfermedades, trastornos o afecciones que se tratan o se previenen usando compuestos

descritos en el presente documento que son capaces de modular los niveles de calcio intracelular, composiciones de los mismos, y métodos proporcionados en el presente documento para identificar compuestos capaces de modular los niveles de calcio intracelular, incluyen enfermedades, afecciones o trastornos que implican inflamación y/o que están relacionados con el sistema inmune. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, glomerulonefritis, enfermedades neuroinflamatorias tales como esclerosis múltiple y trastornos del sistema inmune.

La activación de neutrófilos (PMN) por mediadores inflamatorios se logra parcialmente al aumentar la concentración de calcio citosólico. La afluencia de calcio dependiente de depósito en particular se cree que desempeña un papel importante en la activación de PMN. Se ha demostrado que el trauma aumenta la afluencia de calcio dependiente de depósito de PMN y que las elevaciones prolongadas de la concentración de calcio citosólico debido a la afluencia de calcio dependiente de depósito potenciada probablemente alteran el acoplamiento estímulo-respuesta a las quimiotaxinas y contribuyen a la disfunción de PMN después de la lesión. La modulación de la concentración de calcio citosólico de PMN a través de los canales de calcio dependientes de depósito podría, por lo tanto, ser útil para regular la inflamación mediada por PMN y la función cardiovascular adicional después de una lesión, choque o sepsis.

El calcio desempeña un papel crítico en la activación de linfocitos. La activación de linfocitos, por ejemplo, mediante estimulación antigénica, da como resultado aumentos rápidos en las concentraciones de calcio libre intracelular y la activación de factores de transcripción, incluyendo factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT), NF-kappaB, JNK1, MEF2 y CREB. NFAT es un regulador transcripcional clave de los genes IL-2 (y otras citocinas). Se requiere una elevación sostenida del nivel de calcio intracelular para mantener NFAT en un estado transcripcionalmente activo, y depende de la entrada de calcio dependiente de depósito. La reducción o el bloqueo de la entrada de calcio dependiente de depósito en los linfocitos bloquea la activación de los linfocitos dependientes del calcio. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la modulación de una proteína STIM y/o una proteína Orai, y particularmente la entrada de calcio dependiente de depósito (por ejemplo, reducción en, eliminación de la entrada de calcio dependiente de depósito) en linfocitos es un método para tratar trastornos inmunes y inmune-relacionados, incluyendo, por ejemplo, enfermedades/trastornos inmunes crónicos, enfermedades/trastornos inmunes agudos, enfermedades/trastornos autoinmunes y de inmunodeficiencia, enfermedades/trastornos que implican inflamación, rechazos de injertos de trasplantes de órganos y enfermedad de injerto contra huésped y respuestas inmunes alteradas (por ejemplo, respuestas, hiperactivas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento de una enfermedad/trastorno autoinmune implica reducir, bloquear o eliminar la entrada de calcio dependiente de depósito en linfocitos.

Los ejemplos de trastornos inmunes incluyen, por ejemplo, psoriasis, artritis reumatoide, vasculitis, enfermedad inflamatoria del intestino, dermatitis, osteoartritis, asma, enfermedad muscular inflamatoria, rinitis alérgica, vaginitis, cistitis intersticial, esclerodermia, osteoporosis, eccema, rechazo de injertos de trasplante alógeno o xenógeno (órgano, médula ósea, células madre y otras células y tejidos), enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria, diabetes tipo I, fibrosis pulmonar, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, tiroiditis (por ejemplo, Hashimoto y autoinmune tiroiditis), miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, esclerosis múltiple, fibrosis quística, hepatitis recurrente crónica, cirrosis biliar primaria, conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica.

En otras realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento que son capaces de modular niveles de calcio intracelulares, composiciones de los mismos, y métodos proporcionados en el presente documento para identificar compuestos capaces de modular niveles de calcio intracelular, se usan en relación con el tratamiento de neoplasias, incluyendo, pero sin limitación, neoplasias de origen linforreticular, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de recto. Se cree que la entrada de calcio dependiente de depósito desempeña un papel importante en la proliferación celular en las células cancerosas.

La inhibición de SOCE es suficiente para prevenir la proliferación de células tumorales. El derivado de pirazol BTP-2, un bloqueador directo de I_{CRAC} , inhibe SOCE y la proliferación en células Jurkat y en células de cáncer de colon. Además, la SOCE sostenida requiere la captación mitocondrial de Ca^{2+} y la prevención de la captación mitocondrial de Ca^{2+} conduce a la inhibición de SOCE. La estimulación de células Jurkat induce SOCE sostenido y la activación de la fosfatasa calcineurina dependiente de Ca^{2+} que desfosforila NFAT, promoviendo la expresión de interleucina-2 y la proliferación. En otras realizaciones, los compuestos capaces de modular los niveles de calcio intracelular inhiben SOCE y se usan en el tratamiento de cáncer u otras enfermedades o afecciones proliferativas.

En algunas realizaciones, enfermedades, trastornos o afecciones que se tratan o se previenen usando compuestos

descritos en el presente documento que son capaces de modular los niveles de calcio intracelular, composiciones de los mismos, y métodos proporcionados en el presente documento para identificar compuestos capaces de modular los niveles de calcio intracelular, incluyen, por ejemplo, enfermedades y trastornos hepáticos o del hígado. Estas enfermedades, afecciones o trastornos incluyen, pero sin limitación, lesión hepática, por ejemplo, debido a un trasplante, hepatitis y cirrosis.

La entrada de calcio dependiente de depósito se ha implicado en la enfermedad hepática crónica, así como en la lesión por trasplante después de la conservación en frío-desoxigenación caliente.

- 10 En algunas realizaciones, las enfermedades, afecciones o trastornos que se tratan o se previenen usando los compuestos descritos en el presente documento que son capaces de modular los niveles de calcio intracelular, las composiciones de los mismos, y los métodos proporcionados en el presente documento para identificar compuestos capaces de modular los niveles de calcio intracelular, incluyen enfermedades y trastornos del riñón o renales. La hiperplasia de células mesangiales suele ser una característica clave de dichas enfermedades y trastornos. En otras realizaciones, dichas enfermedades y trastornos son causados por mecanismos inmunológicos u otros mecanismos de lesión, incluyendo IgAN, glomerulonefritis membranoproliferativa o nefritis lúpica. Los desequilibrios en el control de la replicación de células mesangiales también parecen desempeñar un papel clave en la patogénesis de la insuficiencia renal progresiva. El recambio de células mesangiales en el riñón adulto normal es muy bajo con una tasa de renovación de menos del 1 %. Una característica destacada de las enfermedades glomerulares/renales es la hiperplasia mesangial debido a la tasa de proliferación elevada o la pérdida celular reducida de las células mesangiales. Cuando la proliferación de células mesangiales se induce sin pérdida celular, por ejemplo, debido a la estimulación mitogénica, se produce glomerulonefritis mesangioproliferativa. Los datos han indicado que se piensa que los reguladores del crecimiento celular mesangial, en particular los factores de crecimiento, actúan regulando los canales de calcio dependientes de depósito. En aún otras realizaciones, los moduladores del flujo de calcio dependiente de depósito ayudan en el tratamiento de enfermedades glomerulares inhibiendo la proliferación de células mesangiales.

En un aspecto, los compuestos descritos en el presente documento modulan el calcio intracelular, tal como, pero sin limitación, modulación (por ejemplo, reducción o inhibición) de la actividad del canal SOC, tal como inhibición de la actividad del canal CRAC (por ejemplo, inhibición de I_{CRAC}, inhibición de SOCE), en una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, un linfocito, glóbulo blanco, linfocito T, linfocito B), un fibroblasto (o una célula derivada de un fibroblasto), o una célula epidérmica, dérmica o cutánea (por ejemplo, un queratinocito). En algunas realizaciones, la etapa de modular una o más proteínas implicadas en la modulación del calcio intracelular (por ejemplo, una proteína STIM y/o proteína Orai) implica, por ejemplo, reducir el nivel, expresión de, una actividad de, función de y/o interacciones moleculares de una proteína. Por ejemplo, si una célula presenta un aumento en los niveles de calcio o falta de regulación de un aspecto de la modulación de calcio intracelular, por ejemplo, la entrada de calcio dependiente de depósito, entonces en otras realizaciones, la modulación implica reducir el nivel de, la expresión de, una actividad o función de, o una interacción molecular de una proteína, por ejemplo, una proteína STIM y/o proteína Orai.

40 **Métodos de identificación de agentes terapéuticos para NSCLC**

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar *in vitro* un agente terapéutico para tratar NSCLC en el que el agente inhibe una o más rutas de transporte de calcio en la membrana plasmática. El método incluye determinar si un agente candidato puede modular toda o parte de la ruta de CRAC/STIM en una célula de NSCLC que, a su vez, modifica una o más propiedades relacionadas con el cáncer de la célula epitelial.

Por "propiedades relacionadas con el cáncer" se entiende cualquier manifestación fisiológica y/o patológica de una célula que es resultado del cáncer de la célula. Dentro del alcance está la promoción de la transcripción, la proliferación de la célula, la muerte de la célula (tal como la apoptosis y la necrosis) y la invasividad, en donde la invasividad incluye metástasis, migración y pérdida de adhesión.

Se apreciará que en formas generales, un agente candidato puede modular directamente un canal CRAC. En una forma alternativa, un agente candidato puede modular una proteína STIM para alterar de este modo el flujo de calcio en una célula cancerosa.

En el contexto de la presente invención, "alterar" o "alteración" incluye dentro de su alcance una disminución, reducción o de otro modo regulación descendente del flujo de calcio a través de una membrana de plasma. Se prevé que la alteración del flujo de calcio en una célula cancerosa incluye la alteración selectiva del flujo de calcio.

Se apreciará fácilmente que el mecanismo de "modulación", "modulador" o "que modula" incluye dentro de su alcance cualquier interacción que interfiera, inhiba, bloquee o entorpezca o active o aumente la actividad relacionada con el flujo de calcio del canal CRAC y/o la proteína STIM. En ciertas realizaciones, el modulador es un inhibidor. En 5 otras realizaciones, el modulador es un antagonista. En otras realizaciones más, el modulador es un agonista. En realizaciones adicionales, el modulador es un activador.

El agente candidato modula selectivamente un canal CRAC y/o la proteína STIM. En otra realización, el agente candidato inhibe selectivamente un canal CRAC y/o una proteína STIM. En otra realización más, el agente candidato 10 altera el flujo de calcio por inhibición de un canal CRAC y/o proteína STIM.

Por consiguiente, los moduladores pueden ser péptidos, proteínas tales como anticuerpos u otras moléculas orgánicas (tales como moléculas orgánicas pequeñas), con una actividad biológica y semivida deseadas. Se prevé que los anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos a la proteína completa o a un fragmento biológicamente 15 activo de la misma son moduladores adecuados.

Por "fragmento biológicamente activo" se entiende un fragmento, porción, región o segmento de una proteína que presenta al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 25 %, más preferiblemente al menos un 50 % e incluso más preferiblemente al menos un 70 %, 80 % o un 90 % de la actividad biológica de la proteína entera o de longitud 20 completa.

En relación con un canal CRAC, la actividad biológica es la actividad de transporte de calcio. Con respecto a una proteína STIM, la actividad biológica es la capacidad de activar el transporte de calcio en una célula mediante una interacción directa o indirecta con un canal CRAC. 25

Se apreciará por un experto en la técnica que los anticuerpos empleados para aplicaciones terapéuticas en seres humanos deben tener propiedades específicas que hagan que estos anticuerpos sean adecuados para su uso en seres humanos. Generalmente, los anticuerpos terapéuticos se "humanizan", en los que el anticuerpo típicamente comprende más del 90 % de la secuencia humana y las regiones determinantes complementarias de los anticuerpos 30 murinos. Los anticuerpos humanizados son particularmente ventajosos para aplicaciones médicas debido a la menor probabilidad de provocar una reacción inmune del cuerpo extraño.

Se prevé que los anticuerpos humanizados pueden dirigirse a cualquier STIM tal como, pero sin limitación, STIM1 y STIM2. En una realización, el anticuerpo humanizado se dirige a STIM1. 35

En otras realizaciones particulares, el agente modulador es un anticuerpo dirigido a un canal CRAC. En una realización particular alternativa, el anticuerpo dirigido a un canal de CRAC se dirige a CRACM1.

Se contempla fácilmente que los agentes moduladores eficaces incluyen otros inhibidores potenciales del canal 40 CRAC que pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos adecuados incluyen, pero sin limitación, SKF-96365, T182, YM-58483, BTP-2, lantánidos tal como gadolinio, y otros compuestos moduladores del canal CRAC como se describe, por ejemplo, en las solicitudes PCT o de patente de EE. UU. asignadas a Synta Pharmaceuticals viz. WO 2005/009954, WO 2005/009539, WO 2005/009954, WO 200/6034402, A1, WO 2006/081389, WO 2006/081391, WO 2007/087429, WO 2007/087427, WO 2007/087441, WO 2007/087442, WO 45 2007/087443, WO 2007/089904, WO 2007/109362, WO 2007/112093, WO 2008/039520, WO 2008/063504, WO 2008/103310, WO 2009/017818, WO 2009/017819, WO 2009/017831, US 2006/0173006 US 2007/0249051 A1, WO 2010/039238, WO 2010/039237, WO 2010/039236, WO 2009/089305 y WO 2009/038775; patentes y/o solicitudes de patente de Astellas, Queens Medical Center, Calcimedica y otros, incluyendo, viz., WO 2007/121186, WO 2006/0502 14, WO 2007/139926, WO 2008/148108, US 7,452,675, US 2009/023177, WO 2007/139926, US 50 6.696.267, US 6.348.480, WO 2008/106731, US 2008/0293092, WO 2010/048559, WO 2010/027875, WO 2010/025295, WO 2010/034011, WO 2010/034003, WO 2009/076454, WO 2009/035818, US 2010/0152241, US 2010/0087415, US 2009/0311720 y WO 2004/078995.

Otros moduladores de canales CRAC adecuados incluyen los descritos en Isabella Derler et al. Expert opinion in 55 Drug Discovery 3(7) (2008) pg. 787-800; Yousang G et al., Cell Calcium 42 (2007) 145-156; Yasurio Yonetoky et al., Bio. & Med Chem. 14 (2006) 4750-4760 y Yasurio Yonetoky et al., Bio. & Med Chem. 14 (2006) 5370-5383. Todas estas patentes y/o publicaciones de patente y descripciones bibliográficas se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Se contempla además que se puede emplear un enfoque de biología molecular para la modulación de la ruta CRAC/STIM. La interferencia de ARN, tal como ARNsi, proporciona un método atractivo para silenciar dianas génicas terapéuticas potenciales mediante escisión específica de secuencia de ARNm afin. Takeshita y Ochiya (Cancer Sci, 2006, 97: 689-696) proporcionan numerosos ejemplos del potencial terapéutico de la interferencia de ARN contra el cáncer y se incorpora en el presente documento por referencia.

El término "gen" se usa en el presente documento para describir un locus, unidad o región de ácido nucleico discreta dentro de un genoma que puede comprender uno o más de intrones, exones, sitios de corte y empalme, marcos de lectura abiertos y secuencias reguladoras no codificantes 5' y/o 3' tales como un promotor y/o una secuencia de poliadenilación.

Por lo tanto, un experto en la materia apreciará fácilmente que la invención contempla una construcción genética que comprende una o más secuencias de nucleótidos capaces de dirigir la síntesis de una molécula de ARN, donde la secuencia de nucleótidos se selecciona de:

- (i) una secuencia de nucleótidos transcribible a una molécula de ARN que comprende una secuencia de ARN que es sustancialmente homóloga a una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos de interés;
- (ii) un complemento inverso de la secuencia de nucleótidos de (i);
- (iii) una combinación de las secuencias de nucleótidos de (i) y (ii),
- (iv) copias múltiples de las secuencias de nucleótidos de (i), (ii) o (iii), opcionalmente separadas por una secuencia espaciadora;
- (v) una combinación de las secuencias de nucleótidos de (i) y (ii), en donde la secuencia de nucleótidos de (ii) representa una repetición invertida de la secuencia de nucleótidos de (i), separada por una secuencia espaciadora; y
- (vi) una combinación como se describe en (v), en la que la secuencia espaciadora comprende una secuencia de intrón que puede cortarse y empalmarse a partir de dicha combinación;

Cuando la secuencia de nucleótidos comprende una repetición invertida separada por una secuencia espaciadora no intrónica, tras la transcripción, la presencia de la secuencia espaciadora no intrónica facilita la formación de una estructura de tallo-bucle en virtud de la unión de las secuencias de repetición invertida entre sí. La presencia de la secuencia espaciadora no intrónica hace que la secuencia de ARN transcrita (también denominada en el presente documento "transcrito") formada de este modo permanezca sustancialmente en una sola pieza, en una forma que se puede denominar en el presente documento "horquilla". Como alternativa, cuando la secuencia de nucleótidos comprende una repetición invertida donde la secuencia espaciadora comprende una secuencia de intrones, tras la transcripción, la presencia de secuencias de unión de corte y empalme de intrón/exón en cualquier lado de la secuencia de intrón facilita la eliminación de lo que de otro modo formaría una estructura de bucle. El transcrito resultante comprende una molécula de ARN bicatenario (ARNds), opcionalmente con secuencias 3' sobresalientes en uno o ambos extremos. Tal transcrito ARNds se denomina en el presente documento "horquilla perfecta". Las moléculas de ARN pueden comprender una sola horquilla o múltiples horquillas que incluyen "protuberancias" de ADN monocatenario que se producen en regiones de secuencias de ADN bicatenario.

Dependiendo de la aplicación, la molécula de ARN puede dirigirse a una única diana, o como alternativa, a una pluralidad de dianas.

En ciertas realizaciones, la molécula de ARN codifica CRACM1/Orai1, CRACM2/Orai1 o CRACM3/Orai1 y/o STIM1 o STIM2.

Los expertos en la técnica sabrán que los agentes terapéuticos de la invención para el tratamiento del cáncer se pueden identificar por cualquier número de métodos. Por consiguiente, el método de identificación de agentes terapéuticos implica la determinación de si un agente candidato puede modular directamente un canal CRAC y/o modular las proteínas STIM. En una realización, el método implica determinar si el agente candidato puede alterar un flujo de calcio en una célula modulando un canal CRAC y/o proteína STIM.

En una realización, los agentes terapéuticos de la invención para el tratamiento de NSCLC pueden identificarse mediante el cribado de bibliotecas de moléculas tales como bibliotecas químicas sintéticas, incluyendo bibliotecas combinatorias, por métodos tales como las descritas en Nestler & Liu, 1998, Comb. Chem. High Throughput Screen, 1, 113 y Kirkpatrick et al., 1999, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2, 211.

También se contempla que las bibliotecas de moléculas de origen natural pueden cribarse por métodos conocidos, tales como los descritos en Kolb, 1998, Prog. Drug. Res. 51, 185. De manera similar, las moléculas también pueden identificarse a partir de un programa de bibliotecas moleculares (MLP) tal como el ofrecido por el National Institute of Health (NIH), Estados Unidos.

5

Los enfoques más racionales para diseñar agentes terapéuticos para el tratamiento de NSCLC pueden emplear cristalografía de rayos X, espectroscopía de RMN, cribado asistido por ordenador de bases de datos estructurales, modelado asistido por ordenador, o técnicas biofísicas más tradicionales que detectan interacciones de unión molecular, como se conocen en la técnica.

10

La bioinformática estructural también puede usarse para identificar agentes candidatos para tratar NSCLC. Una revisión de los enfoques bioinformáticos estructurales para el descubrimiento de fármacos se proporciona en Fauman et al., 2003, Meth. Biochem. Anal. 44:477, y Nature Reviews Drug Discovery 7, 783 (septiembre de 2008), ambos de los cuales se incorporan por referencia.

15

La búsqueda de bases de datos estructurales asistidas por ordenador y los enfoques bioinformáticos se utilizan cada vez más como un procedimiento para identificar y/o diseñar moléculas agonistas y antagonistas. Los ejemplos de métodos de búsqueda de bases de datos se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos N.º 5.752.019 y la Publicación Internacional N.º WO 97/41526 (dirigida a identificar miméticos de EPO) y las Patentes de Estados Unidos N.º 7.158.891 y 5.680.331 que se dirigen a enfoques computacionales más generales para el modelado de proteínas y mimetismo estructural de la actividad proteica.

20

Generalmente, otros métodos aplicables incluyen cualquiera de una diversidad de técnicas biofísicas que identifican interacciones moleculares. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos competitivos de unión a radioligando, electrofisiología, ultracentrifugación analítica, microcalorimetría, resonancia de plasmón superficial y métodos basados en biosensores ópticos, tales como los provistos en el Capítulo 20 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, 1997), que se incorpora en el presente documento por referencia.

25

Un experto en la técnica apreciará que los agentes de modulación pueden estar en forma de un compañero de unión y, como tal, identificarse mediante ensayos de interacción tales como los enfoques de dos híbridos de levadura. Los métodos de cribado de dos híbridos se proporcionan en el Capítulo 20 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, 1997).

30

35 **Composición farmacéutica y método de tratamiento de NSCLC**

También se contempla que en un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un agente terapéutico eficaz para el tratamiento del cáncer identificado mediante un método descrito anteriormente, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40

Como terapia adyuvante, se puede usar un inhibidor de CRAC junto con una quimioterapia estándar para cáncer de pulmón, que típicamente consiste en combinaciones de dos o más de, por ejemplo, cisplatino (Platinol®), etopósido (VP-16; VePesid®), carboplatino (Paraplatin®), paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), tartrato de vinorelbina (Novelbine®), doxorubicina (Adriamycin®), sulfato de vincristina (Oncovin®), ifosfamida (Ifex®) y clorhidrato de gemcitabina (Gemzar®). Dicha terapia combinada de quimioterapia estándar ha demostrado mejorar la respuesta general al tratamiento. Las combinaciones de fármacos bien conocidas en la terapia de combinación de quimioterapia estándar incluyen paclitaxel más carboplatino, cisplatino más tartrato de vinorelbina, cisplatino más etopósido y carboplatino más etopósido. La radioterapia simultánea se usa muy a menudo con las combinaciones de quimioterapia estándar de cisplatino más etopósido o carboplatino más etopósido.

45

50

Otros agentes quimioterapéuticos que pueden usarse para tratar el cáncer de pulmón incluyen, por ejemplo, ciclofosfamida (Neosar®), metotrexato, lomustina (CCNU) y clorhidrato de topotecán (Hycamtin®).

Para el carcinoma pulmonar de células no pequeñas como terapia adyuvante, se puede usar un inhibidor de CRAC junto con clorhidrato de gemcitabina (Gemzar®), un fármaco quimioterapéutico que tiene actividad única contra muchos tumores sólidos, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se ha encontrado que la terapia de combinación con gemcitabina, cisplatino y tartrato de vinorelbina es segura y muy activa en personas con NSCLC avanzado. Otra opción de tratamiento para pacientes con NSCLC con enfermedad avanzada es la quimio-radioterapia alternante (por ejemplo, cisplatino y etopósido, seguido de radioterapia).

55

El término "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye una carga, diluyente o sustancia encapsulante sólida o líquida que se puede usar de forma segura en la administración sistémica. Dependiendo de la ruta particular de administración, se puede usar una diversidad de vehículos conocidos en la técnica. Estos 5 vehículos pueden seleccionarse de azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato cálcico, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y sales tales como sales de ácidos minerales incluyendo clorhidratos, bromhidratos y sulfatos, ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos y malonatos y agua libre de pirógenos.

10 Una referencia útil que describe vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991), que se incorpora en el presente documento por referencia.

Se puede emplear cualquier ruta segura de administración para proporcionar a un paciente el agente terapéutico o la 15 composición farmacéutica de la invención. Por ejemplo, se pueden emplear administración oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalatoria, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular y transdérmica.

Las formas de dosificación adecuadas incluyen, pero sin limitación, comprimidos, dispersiones, suspensiones, 20 inyecciones, soluciones, jarabes, trociscos, cápsulas, supositorios, aerosoles y parches transdérmicos. Estas formas de dosificación también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este propósito u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico se puede realizar recubriendo el mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y 25 poliglicólicos y ciertos derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetil celulosa. Además, la liberación controlada puede realizarse usando otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración oral o parenteral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sobres o comprimidos que contienen cada uno una 30 cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos de la invención, como un polvo o gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia, tal como poniendo en asociación uno o más agentes como se ha descrito anteriormente con el vehículo que constituye uno o más ingredientes. Las composiciones se pueden preparar mezclando uniforme e íntimamente 35 los agentes de la invención con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, opcionalmente, dando forma al producto en la presentación deseada.

Las composiciones anteriores se pueden administrar de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea farmacéuticamente eficaz. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la 40 presente invención, debería ser suficiente para realizar una respuesta beneficiosa en un paciente durante un período de tiempo apropiado. La cantidad de agente o agentes a administrar puede depender del sujeto que se va a tratar incluyendo la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud del mismo, factores que dependerán del criterio del facultativo.

45 **Métodos de diagnóstico**

En otra realización más, la presente invención se refiere a métodos de diagnóstico para NSCLC que utilizan canales CRAC y proteínas STIM como marcadores de diagnóstico.

50 En otro aspecto particular, el método de diagnóstico de la presente invención incluye la medición de la relación de una forma particular de STIM con respecto a otra forma particular de STIM.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un método de diagnóstico para detectar la activación de la expresión del canal CRAC en células de pulmón. Se prevé que la expresión del canal CRAC pueda analizarse 55 mediante técnicas basadas en proteínas o basadas en ácidos nucleicos.

Por lo tanto, "predispuesto" y "predisposición" se usan en el contexto de una probabilidad de que un individuo pueda presentar síntomas clínicos de NSCLC, o que cualquier síntoma clínico manifiesto existente de NSCLC sea el resultado de una causa bioquímica subyacente.

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que se pueden utilizar varios métodos para medir los niveles de expresión de STIM en la membrana plasmática de una célula cancerosa. A modo de ejemplo solamente, el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos marcados es fácilmente susceptible de medición cuantitativa de la expresión de proteínas en la superficie celular. Por ejemplo, la inmunofluorescencia y otros métodos de microscopía de fluorescencia también se pueden usar para teñir el tejido para detectar niveles de STIM. También se pueden usar otras técnicas de inmunohistoquímica convencionales.

Como alternativa, los niveles relativos de expresión de proteína pueden determinarse mediante otros métodos basados en proteínas que incluyen inmunoensayos, por ejemplo, ELISA e inmunotransferencia para detectar los niveles de expresión relativa de una o más de las proteínas.

El análisis de patrones proteómicos proporciona un método de diagnóstico alternativo que es particularmente útil para el análisis de patrones de expresión global de proteínas. Los métodos de diagnóstico del cáncer usando patrones proteómicos se proporcionan en Conrads et al., Expert Rev Mol Diagn. 2003 July; 3(4):411-20 y se incorpora en el presente documento por referencia.

En realizaciones particulares, se puede usar una pluralidad de las proteínas en una biblioteca de proteínas mostrada de varias maneras, por ejemplo, en sistemas de presentación en fagos o presentación de células o mediante electroforesis en gel bidimensional, o más específicamente, electroforesis en gel bidimensional diferencial (2D-DIGE). Estas realizaciones particulares pueden denominarse generalmente métodos "proteómicos" o de "perfil de proteínas", tales como los descritos, por ejemplo, en los Capítulos 3.9.1 y 22 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., John Wiley & Sons NY USA (1996-2002).

En ciertas realizaciones relacionadas con las matrices de proteínas, una proteína asociada a cáncer de la invención (tal como una proteína asociada a NSCLC) se localiza en una dirección identificable en la matriz.

En realizaciones ejemplares, la matriz de proteínas incluye un sustrato que está inmovilizado, impregnado, unido o acoplado de otro modo a una proteína asociada al cáncer (tal como una proteína asociada a NSCLC), o un fragmento de la misma.

El sustrato puede ser un chip de aluminio químicamente derivatizado, una membrana sintética tal como PVDF o nitrocelulosa, un portaobjetos de vidrio o placas de microtitulación.

La detección de proteínas unidas a sustrato se puede realizar usando espectrometría de masas, ELISA, inmunohistoquímica, microscopía de fluorescencia o mediante detección colorimétrica.

Los métodos de diagnóstico de la invención pueden implicar la medición de los niveles de expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína STIM y/o un canal CRAC. A este respecto, las variaciones de secuencia de nucleótidos en un promotor, por ejemplo, pueden afectar a los niveles de estado estable de un transcrito de gen de canal CRAC en una o más células de un individuo afectado o predispuesto.

También se contempla que los niveles relativos de ácidos nucleicos se pueden medir y/o comparar en los métodos de diagnóstico de la presente invención. A modo de ejemplo, se puede medir un nivel de ARNm de CRAC y/o STIM.

La medición de los niveles relativos de un nivel de ácido nucleico en comparación con un nivel expresado de un ácido nucleico de referencia se puede realizar convenientemente usando una matriz de ácidos nucleicos.

La tecnología de matriz de ácido nucleico se ha vuelto muy conocida en la técnica y se proporcionan ejemplos de métodos aplicables a la tecnología de matriz, por ejemplo, en el Capítulo 22 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons NY USA 1995-2001).

Se puede generar una matriz mediante diversos métodos, por ejemplo, mediante métodos fotolitográficos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.143.854; 5.510.270; y 5.527.681), métodos mecánicos (por ejemplo, métodos de flujo dirigido como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.384.261), métodos basados en pines (por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.288.514), y técnicas basadas en perlas (por ejemplo, como se describe en la Solicitud Internacional N.º PCT/US93/04145).

También se hace referencia a sistemas de matriz de ácidos nucleicos Affymetrix tales como los descritos en las

Patentes de Estados Unidos N.º 5.858.659 y 6.300.063, que proporcionan una enseñanza específica en relación con la detección basada en matrices de ácidos nucleicos de polimorfismos relacionados con enfermedades.

En otra forma particular de esta realización, la PCR cuantitativa o semicuantitativa que utiliza cebadores correspondientes a ácidos nucleicos que codifican el canal CRAC o ácidos nucleicos que codifican STIM puede usarse para cuantificar los niveles de expresión relativa de un ácido nucleico del canal CRAC o ácido nucleico STIM para determinar de este modo si un individuo está predispuesto o padece NSCLC.

La amplificación por PCR no es lineal y, por lo tanto, el análisis del criterio de valoración no siempre permite la determinación precisa de los niveles de expresión de ácido nucleico

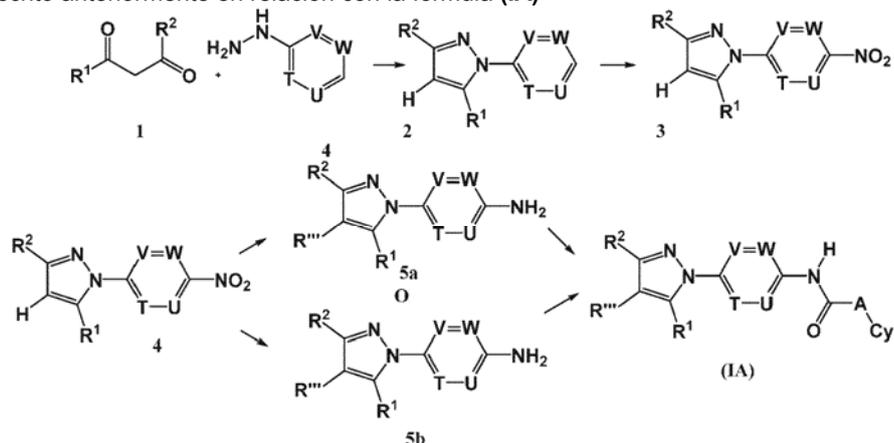
El análisis de PCR en tiempo real proporciona un medio de alto rendimiento para medir niveles de expresión génica. Usa cebadores específicos y detección de fluorescencia para medir la cantidad de producto después de cada ciclo. Las sondas de hidruración utilizan colorantes inactivadores o fluorescencia directamente para generar una señal. Este método puede usarse para validar y cuantificar las diferencias de expresión de ácido nucleico en células o tejidos obtenidos de pacientes con cáncer en comparación con células o tejidos obtenidos de personas que no lo padecen.

La siguiente metodología general descrita en el presente documento proporciona la manera y el proceso de fabricar y usar el compuesto de la presente invención y son ilustrativos en lugar de limitantes. También se pueden prever modificaciones adicionales de la metodología proporcionada y adicionalmente nuevos métodos para lograr y servir al propósito de la invención. Por consiguiente, debe entenderse que puede haber otras realizaciones que estén dentro del espíritu y alcance de la invención como se define en la memoria descriptiva de las mismas.

25 Método general de preparación del compuesto de Fórmula (I)

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por los siguientes procesos. A menos que se indique otra cosa, todas las variables, cuando se usan en las fórmulas a continuación, presentan los grupos descritos anteriormente en relación con la fórmula (IA). Estos métodos pueden aplicarse de forma similar a otros compuestos de fórmula (I) (por ejemplo, (IA-I), (IA-II), (IA-III) y (IA-IV).

El Esquema 1 proporciona un proceso general para la síntesis de un compuesto de fórmula (IA) en la que L₁ y L₂ juntos son -NH-CO-, R^{'''} es hidrógeno o halógeno, y todas las demás variables R, R¹, R², T, U, V, W, A y Cy son como se han descrito anteriormente en relación con la fórmula (IA)



35

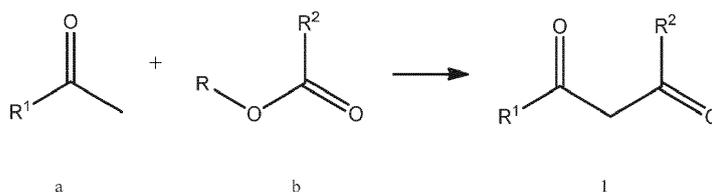
Un compuesto de fórmula 1 puede hacerse reaccionar con un compuesto de fórmula 2 (por ejemplo, fenil hidrazina) para formar un compuesto de fórmula 3. Después, el compuesto de fórmula 3 puede nitrarse, por ejemplo, usando una mezcla de H₂SO₄ concentrado y HNO₃ concentrado para formar un compuesto de fórmula 4. La reducción del compuesto de fórmula 4, tal como con FeCl₃ e hidrazina en presencia de carbón activo, produce el compuesto amina correspondiente de fórmula 5a en la que R^{'''} es hidrógeno. Como alternativa, la halogenación seguida de la reducción del compuesto de fórmula 4, produce el correspondiente compuesto de amina de fórmula 5b en la que R^{'''} es halógeno. El compuesto de fórmula 5a o 5b se puede acoplar con diversos intermedios diferentes en presencia de un reactivo de acoplamiento adecuado para proporcionar un compuesto de fórmula (IA). El compuesto de fórmula

5a o 5b puede acoplarse con i. Cy-A-COOH usando uno o más reactivos de acoplamiento de amida tales como hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino) fosfonio (reactivo BOP) o clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC); ii. con cloruros de ácido de fórmula Cy-A-COCl; o iii. isocianatos de fórmula Cy-NCO donde A es NH.

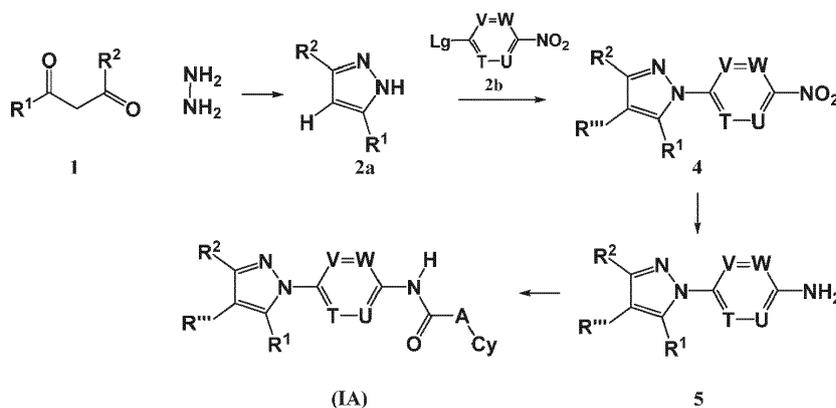
5

El **Esquema 2** proporciona un proceso general para la síntesis de un compuesto de fórmula **(IA)** en la que L₁ y L₂ juntos es -NH-CO-, R^{'''} es hidrógeno o halógeno, y todas las demás variables R, R¹, R², T, U, V, W, A y Cy son las descritas anteriormente en relación con la fórmula **(IA)**.

10 **Etapa-1**



Etapa-2



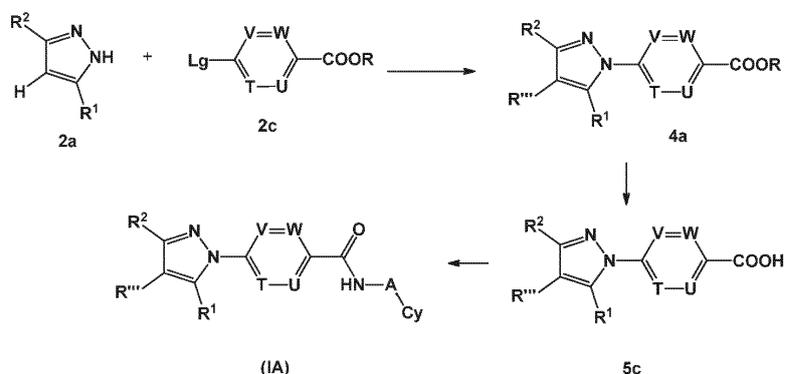
15

Etapa-1: Una cetona de fórmula **a** puede condensarse con un éster de fórmula **b** en presencia de una base tal como un alcóxido de metal, por ejemplo, etóxido sódico, para dar una dicetona de fórmula **1**.

Etapa-2: El compuesto de fórmula **1** puede convertirse en un compuesto pirazol de fórmula **2a** haciéndolo reaccionar con hidrazina. El compuesto de fórmula **2a** puede hacerse reaccionar con un compuesto de fórmula **2b** en la que Lg es un grupo saliente (tal como un halógeno) en presencia de una base adecuada, tal como carbonato de metal alcalino, por ejemplo, Cs₂CO₃, para dar un compuesto de fórmula **4**, que puede someterse a una secuencia similar de transformaciones como se ha descrito anteriormente en el esquema 1 para proporcionar un compuesto de

25 fórmula **IA**.

El **Esquema 2A** proporciona un proceso general para la síntesis de un compuesto de fórmula **(IA)** en la que L₁ y L₂ juntos es -CO-NH-, R^{'''} es hidrógeno o halógeno, y todas las demás variables R, R¹, R², T, U, V, W, A y Cy son las descritas anteriormente en relación con la fórmula **(IA)**.



El compuesto de fórmula **2a** puede hacerse reaccionar con un compuesto de fórmula **2c** en la que Lg es un grupo saliente (tal como un halógeno) en presencia de una base adecuada, tal como carbonato de metal alcalino, por ejemplo, Cs₂CO₃, para dar un compuesto de fórmula **4a**, que puede entonces hidrolizarse para dar un compuesto de fórmula **5c**. El compuesto de fórmula **5c** puede acoplarse con Cy-A-NH₂ usando uno o más reactivos de acoplamiento amida tales como hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino) fosfonio (reactivo BOP) o clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC).

10 Se pueden usar metodologías similares con ciertas modificaciones conocidas por los expertos en la técnica para sintetizar compuestos de fórmula **(I)**, **(IA-I)** o **(IA-II)** en las que se entenderá que las variables presentan los grupos descritos anteriormente en relación con la fórmula **(I)**, **(IA-I)**, **(IA-II)**, **(IA-III)** o **(IA-IV)** usando los intermedios y reactivos adecuados.

15 Ejemplos

Se usan las siguientes abreviaturas a lo largo de toda esta descripción: EDC.HCl [clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida], HOBt [Hidroxi-benzotriazol], TEA (tri-etilamina), DMF (dimetil formamida), AcOEt (acetato de etilo), DCM (diclorometano), DMSO (dimetil sulfóxido, THF (tetrahidrofurano). Salvo que se indique otra cosa, el tratamiento implica la distribución de la mezcla de reacción entre las fases acuosa y orgánica indicadas entre paréntesis, la separación y el secado sobre Na₂SO₄ de la capa orgánica, y la evaporación del disolvente para proporcionar un residuo. Salvo que se indique otra cosa, la purificación implica cromatografía en columna usando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de éter de petróleo (ebullición a 60-80 °C) y acetato de etilo o diclorometano y metanol de la polaridad adecuada como las fases móviles. TA (o ta) implica temperatura ambiente (~25-28 °C).

Intermedio 1: 1,3-diciclopropilpropano-1,3-diona: Se añadió etóxido sódico (8 g, 117,64 mmol) a una solución de ciclopropil metil cetona (5 g, 59,4 mmol) y ciclopropanocarboxilato de metilo (12 ml, 118,9 mmol) en DMSO (30 ml). La mezcla resultante se calentó a 60 °C durante una noche y después se enfrió a 0 °C. Después de interrumpir la reacción con HCl 6 N, el tratamiento (H₂O/AcOEt) dio el compuesto del título en forma de un líquido de color pardo que se usó sin ninguna purificación. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 16,05 (s a, 0,6H), 5,72 (s, 0,6H) 3,78 (s, 0,8H), 2,08-2,0 (m, 0,8H), 1,62-1,53 (m, 1,2H), 1,12-1,05 (m, 4H), 0,97-0,83 (m, 4H). MS (m/z): 153,2 [M+H]⁺.

Intermedio 2: 1-ciclopropil-4,4,4-trifluorobutano-1,3-diona: Se siguió un procedimiento similar al descrito para el intermedio 1. A partir de ciclopropil metil cetona (10 g, 119 mmol), 2,2,2-trifluoroacetato de etilo (29 ml, 237 mmol), DMSO (60 ml) y etóxido sódico (16,1 g, 237 mmol), el compuesto del título (15 g) se obtuvo en forma de un líquido de color pardo y se usó en la siguiente etapa sin purificación. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 5,65 (s, 2H), 2,16-2,04 (m, 1H), 1,18-1,12 (m, 2H), 0,98-0,94 (m, 2H).

Intermedio 3: 3,5-diciclopropil-1H-pirazol: El intermedio 1 (5,3 g, 35 mmol) e hidrazina hidrato (1,8 ml, 38,3 mmol) en etanol (20 ml) se calentaron a reflujo durante una noche. El tratamiento (H₂O/AcOEt) después del enfriamiento de la mezcla a temperatura ambiente dio el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo. P.F.: 161-164 °C. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 15,2 (s a, 1H), 5,65 (s, 1H), 2,16-2,09 (m, 2H), 1,18-1,14 (m, 4H), 0,98-0,94 (m, 4H). MS (m/z): 149,04 [M+H]⁺.

Intermedio 4: 5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol: El intermedio 2 (0,120 g, 0,66 mmol) e hidrazina hidrato (0,04 ml, 0,72 mmol) se disolvieron en etanol (6 ml) y se calentaron a reflujo durante una noche. El tratamiento

(H₂O/AcOEt) después del enfriamiento a TA dio el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (0,114 g).

Intermedio 5: 3,5-diciclopropil-1-(4-nitrofenil)-1H-pirazol: Una solución del intermedio **3** (2,0 g, 13,5 mmol) y Cs₂CO₃ (5,51 g, 40,5 mmol) en DMSO (15 ml) se calentó a 160 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 0,5 h. A la mezcla se le añadió 4-cloro-1-nitro benceno (6,38 g, 40,5 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 4 h. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación proporcionaron el compuesto del título (0,8 g). ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,32 (d, *J* 9,0, 2H), 7,92 (d, *J* 9,0, 2H), 5,76 (s, 1H), 1,97-1,91 (m, 1H), 1,86-1,80 (m, 1H), 1,09-1,04 (m, 2H), 0,98-0,94 (m, 2H), 0,83-0,75 (m, 4H).

Intermedio 6: 3,5-diciclopropil-1-(2-fluoro-4-nitrofenil)-1H-pirazol: Una solución del intermedio **3** (2,0 g, 13,5 mmol) y K₂CO₃ (5,5 g, 40,6 mmol) en DMSO (20 ml) se calentaron a 120 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 0,5 h. A esta mezcla se le añadió 3,4-difluoro-1-nitrobenceno (2,15 g, 13,5 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación proporcionaron el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (3,16 g). ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,19-8,12 (m, 2H), 7,78 (t, *J* 7,9, 1H), 5,70 (s, 1H), 2,10-2,00 (m, 1H), 1,68-1,58 (m, 1H), 1,08-0,92 (m, 4H), 0,82-0,74 (m, 2H), 0,72-0,65 (m, 2H).

Intermedio 7: 2-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)-5-nitropiridina: Una solución del intermedio **3** (8,0 g, 54,05 mmol) y K₂CO₃ (27,96 g, 202,6 mmol) en DMSO (60 ml) se calentó a 110 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 0,5 h. A la mezcla se le añadió 2-cloro-5-nitro piridina (12,8 g, 80,75 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación proporcionaron el compuesto del título (3,03 g). ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 9,24 (d, *J* 2,6, 1H), 8,51 (dd, *J* 2,6, 9,9, 1H), 8,10 (d, *J* 9,2, 1H), 5,72 (s, 1H), 2,90-2,75 (m, 1H), 1,99-1,90 (m, 1H), 1,06-0,93 (m, 4H), 0,82-0,64 (m, 4H).

Intermedio 8: 5-ciclopropil-1-(4-nitrofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol: Se empleó un procedimiento similar al seguido para el intermedio **5**. A partir del intermedio **4** (1,0 g, 5,67 mmol), Cs₂CO₃ (5,5 g, 16,9 mmol), DMSO (4 ml) y 4-cloro-1-nitro benceno (1,93 g, 14,1 mmol) se obtuvo el compuesto del título (0,7 g). ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,38 (d, *J* 7,08, 2H), 7,92 (d, *J* 7,08, 2H), 6,32 (s, 1H), 1,89-1,82 (m, 1H), 1,19-1,11 (m, 2H), 0,89-0,85 (m, 2H), MS (m/s): 298,15 [M+H]⁺.

Intermedio 9: 5-ciclopropil-1-(2-fluoro-4-nitrofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol: Una solución del intermedio **4** (6,3 g, 35 mmol) y K₂CO₃ (14,6 g, 105 mmol) en DMSO (20 ml) se calentó a 120 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 30 min. A esta mezcla se le añadió 1,2-difluoro nitrobenceno (5,68 g, 35 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación proporcionaron el compuesto del título (0,30 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8,49 (dd, *J* 2,4, 9,9, 1H), 8,47-8,27 (m, 1H), 8,04-8,02 (m, 1H), 6,73 (s, 1H), 1,76-1,68 (m, 1H), 0,99-0,90 (m, 2H), 0,84-0,74 (m, 2H).

Intermedio 10: 2-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-5-nitropiridina: Una solución del intermedio **4** (1,0 g, 5,67 mmol) y K₂CO₃ (2,35 g, 17,03 mmol) en DMSO (10 ml) se calentó a 90 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 30 min. A la mezcla se le añadió 2-cloro-5-nitro piridina (1,35 g, 8,5 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación proporcionaron el compuesto del título (0,30 g). ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 9,33 (d, *J* 2,5, 1H), 8,62 (dd, *J* 2,8, 9,0, 1H), 8,19 (d, *J* 9,0, 1H), 6,29 (s, 1H), 2,92-2,83 (m, 1H), 1,60-1,50 (m, 2H), 0,79-0,70 (m, 2H).

Intermedio 11: 2-[4-cloro-5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-5-nitropiridina: El intermedio **10** (1,5 g, 5,0 mmol) se disolvió en DMF y a éste se le añadió N-clorosuccinimida (0,8 g, 6 mmol) a 0 °C. Después, la reacción se dejó agitar a ta durante 2 h. Después de la finalización de la reacción, el tratamiento (EtOAc) y la purificación proporcionaron el compuesto del título (0,802 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 9,34 (d, *J* 2,5, 1H), 8,65 (dd, *J* 2,5, 9, 1H), 8,09 (d, *J* 9, 1H), 2,48-2,38 (m, 1H), 1,13-1,03 (m, 2H), 0,90-0,82 (m, 2H).

Intermedio 12: 4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)anilina: Se añadieron polvo de hierro (0,88 g, 15,8 mmol) y cloruro de amonio (17 mg, 0,3 mmol) a una solución del intermedio **5** (0,85 g, 3,15 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 15 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante media hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) después de la concentración de las capas combinadas proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,68 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 7,11 (d, *J* 8,6, 2H), 6,61 (d, *J* 8,6, 2H), 5,65 (s, 1H), 5,24 (s, 2H), 1,81-1,74 (m, 1H), 1,67-1,60 (m, 1H), 0,86-0,77 (m, 4H), 0,61-0,56 (m, 4H). MS (m/z): 240,3 [M+H]⁺.

Intermedio 13: 4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)-3-fluoroanilina: Se añadieron polvo de hierro (1,86 g, 34,8

mmol) y cloruro de amonio (30 mg, 0,7 mmol) a una solución del intermedio **6** (2 g, 7,0 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 30 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la concentración de las capas combinadas proporcionaron el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,34 g).

5

Intermedio 14: 6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-amina: Se añadieron polvo de hierro (0,79 g, 14,17 mmol) y cloruro de amonio (15 mg, 0,28 mmol) a una solución del intermedio **7** (0,77 g, 2,86 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 15 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) después de la concentración de las capas combinadas proporcionó el intermedio **14** en forma de un sólido de color amarillo (0,570 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 7,75 (d, *J* 2,5, 1H), 7,27 (d, *J* 8,6, 1H), 7,06 (dd, *J* 2,7, 8,6, 1H), 5,67 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 2,39-2,27 (m, 1H), 1,88-1,74 (m, 1H), 0,90-0,72 (m, 4H), 0,69-0,50 (m, 4H).

Intermedio 15: 4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]anilina: Se empleó un procedimiento similar al empleado para el intermedio **12**. A partir del intermedio **8** (0,69 g, 2,32 mmol), EtOH-H₂O (2:1, 12 ml), Fe (0,64 g, 15,8 mmol) y NH₄Cl (0,012 mg, 0,22 mmol), el compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo (0,49 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 7,19 (d, *J* 8,64, 2H), 6,65 (d, *J* 8,64, 2H), 6,47 (s, 1H), 5,46 (s, 2H), 1,75-1,69 (m, 1H), 0,94-0,89 (m, 2H), 0,77-0,73 (m, 2H). MS (m/z): 268,1 [*M*+H]⁺.

Intermedio 16: 4-[3-ciclopropil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluoroanilina: Se añadieron polvo de hierro (4,75 g, 85,1 mmol) y cloruro de amonio (90 mg, 1,7 mmol) a una solución del intermedio **9** (5 g, 17,00 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 45 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) después de la concentración de las capas combinadas proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (4,3 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 7,16 (t, *J* 8,5, 1H), 6,50-6,45 (m, 3H), 5,86 (s, 2H), 1,60-1,51 (m, 1H), 0,91-0,82 (m, 2H), 0,76-0,69 (m, 2H).

Intermedio 17: 6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-amina: Se añadieron polvo de hierro (0,279 g, 5,00 mmol) y cloruro de amonio (5 mg, 0,09 mmol) a una solución del intermedio **10** (0,77 g, 2,86 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 9 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) después de la concentración de las capas combinadas proporcionó el intermedio **17** en forma de un sólido de color amarillo (0,239 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 7,84 (d, *J* 2,6, 1H), 7,33 (d, *J* 8,6, 1H), 7,12 (dd, *J* 2,6, 8,6, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,69 (s, 2H), 2,45-2,36 (m, 1H), 0,90-0,81 (m, 2H), 0,74-0,65 (m, 2H). MS (m/z): 269,2 [*M*+H]⁺.

Intermedio 18: 6-[4-cloro-5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-amina: Se añadieron polvo de hierro (1,56 g, 28,0 mmol) y cloruro de amonio (600 mg, 11,2 mmol) a una solución del intermedio **11** (1,7 g, 5,60 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 15 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la concentración de las capas combinadas proporcionaron el intermedio **18** en forma de un sólido de color amarillo (1,1 g). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8,04 (s, 1H), 7,39 (d, *J* 8,2, 1H), 7,20 (d, *J* 8, 1H), 4,26 (s, 2H), 2,10-1,99 (m, 1H), 1,96-1,85 (m, 2H), 1,84-1,70 (m, 2H).

Intermedio 19: 2-cloro-N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]acetamida: Se añadió cloruro de cloroacetilo (0,2 ml, 2,39 mmol) a una solución del intermedio **12** (600 mg, 2,24 mmol) en diclorometano (DCM) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 15 min. El tratamiento (H₂O/DCM) dio el intermedio **19** que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Intermedio 20: 2-cloro-N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil] acetamida: Se añadió cloruro de cloroacetilo (0,05 ml, 0,62 mmol) a una solución del intermedio **15** (150 mg, 0,561 mmol) en diclorometano (DCM) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 15 min. El tratamiento (H₂O/DCM) dio el compuesto del título, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Intermedio 21: 2-cloro-N-[6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il]acetamida: Se añadió cloruro de cloroacetilo (0,16 ml, 2,00 mmol) a una solución del intermedio **17** (500 mg, 1,86 mmol) en diclorometano (DCM) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 15 min. El tratamiento (H₂O/DCM) dio el intermedio **21** que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Intermedio 22: 5-ciclopropil-1-(2-fluoro-4-yodofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol: Al intermedio **16** (1,9 g, 7,20 mmol) en 5 ml de agua se le añadió HCl conc. (5 ml) y se enfrió a 0 °C. A esta solución se nitrito sódico (1 g, 15

mmol) se le añadió lentamente y se agitó durante 15 min a 0 °C. A esta mezcla se le añadió una solución de yoduro potásico (2,5 g, 15 mmol) a la misma temperatura y se agitó la mezcla de reacción a ta. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación dieron el producto deseado en forma de un líquido de color amarillo. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8,01 (dd, *J* 1,7, 9,5, 1H), 7,79 (dd, *J* 1,7, 8,4, 1H), 7,45 (t, *J* 8,1, 1H), 6,63 (s, 1H), 1,64-1,56 (m, 1H), 0,92 - 0,84 (m, 2H), 0,79-0,71 (m, 2H).

Intermedio 23: Ácido 4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluorobenzoico: Se suspendieron magnesio (143 mg, 6 mmol) y una pizca de yodo en éter en una atmósfera inerte. A esta pequeña cantidad de yoduro de metilo se le añadió y se calentó a reflujo la mezcla de reacción para comenzar la formación de Grignard. En esta fase se añadió el intermedio **22** (790 mg, 2 mmol) y continuó la reacción en condiciones de reflujo. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se enfrió a ta y se le añadieron trozos de hielo seco seguido de HCl 2 N. El sólido que se formó se filtró y se secó a alto vacío para obtener el compuesto del título (160 mg) en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 13,6 (s a, 1H), 7,97-7,92 (m, 2H), 7,84-7,78 (m, 1H), 6,68 (s, 1H), 1,69-1,61 (m, 1H), 0,94-0,87 (m, 2H), 0,80-0,74 (m, 2H).

Intermedio 24: Ácido 1H-benzo[d]imidazol-6-carboxílico: Se mezclaron ácido 3,4-diaminobenzoico (5 g, 32 mmol) y ácido fórmico (20 ml) y se calentaron a reflujo durante una noche. El ácido fórmico se eliminó en un evaporador rotatorio y se añadió agua al residuo para obtener el sólido. El sólido se filtró y se secó para obtener el compuesto del título cuantitativamente.

Intermedio 25: Ácido 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-carboxílico: Se disolvió ácido 3,4-diaminobenzoico (5 g, 32,8 mmol) en AcOH (30 ml) y esta mezcla se enfrió a 5 °C. A esta mezcla se le añadió una solución de NaNO₂ (2,7 g en 8 ml de agua) seguido de 2 ml de ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 90 min. Después de esto, la mezcla de reacción se inactivó con hielo y el sólido que se obtuvo se filtró y se lavó con agua para obtener el compuesto del título (4,5 g) en forma de un sólido de color pardo.

Intermedio 26: Ácido quinolin-6-carboxílico: Se añadió gota a gota ácido sulfúrico (67,5 ml) a ácido 4-aminofenilacético (45 g, 297 mmol), glicerol (61,7 g, 67 mmol), y yodo (1,14 g, 4 mmol) a ta. La mezcla se calentó a 140 °C durante 5 h. Después de esto, la mezcla de reacción se inactivó con hielo y el sólido que se formó se filtró. El sólido se disolvió en MeOH y se le añadió carbón y se calentó a reflujo durante 1 h. Esta mezcla se filtró a través de celite y el metanol se eliminó para obtener el compuesto del título (7 g) en forma de un sólido de color pardo.

Intermedio 27: Ácido Quinoxalin-6-carboxílico: Se añadió lentamente ácido 3,4 diamino benzoico (500 mg, 3,29 mmol) a carbonato potásico acuoso (7 ml, 1,82 g de K₂CO₃). Después, se añadió lentamente aducto de glioxal bis(sulfito sódico) hidrato (963 mg, 3,62 mmol). Esta mezcla se calentó a 80 °C durante 5 h para obtener una solución transparente. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se añadió a HCl dil lentamente y el sólido que se formó se filtró y se secó para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (300 mg).

Intermedio 28: 2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetato de etilo: Se disolvieron 2-aminopiridina (500 mg, 5,31 mmol) y cloroacetoacetato de etilo (870 mg, 5,31 mmol) en DMSO y se calentó a 100 °C durante 1 h en una atmósfera inerte. Después de 1 h, se añadió agua a la mezcla de reacción seguido del tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación sobre gel de sílice de 60-120 de malla usando AcOEt y éter de petróleo (30:70) dio el compuesto del título (110 mg) en forma de un líquido de color pardo. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,06 (d, *J* 6,7, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,55 (d, *J* 9,4, 1H), 7,14 (t, *J* 7,9, 1H), 6,75 (t, *J* 6,7, 1H), 4,12 (c, *J* 7,1, 2H), 3,87 (s, 2H), 1,3 (t, *J* 7,1, 3H).

Intermedio 29: Ácido 2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acético: El intermedio **28** (7,5 g, 39,22 mmol) se disolvió en agua (30 ml) y se añadió NaOH (2,35 g, 58,8 mmol). Esta mezcla se calentó a 90 °C durante 1 h. Después de esto, se eliminó el agua por destilación y se acidificó la mezcla de reacción con HCl dil a pH 7 para obtener el sólido. El sólido se filtró y se secó al vacío para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo cuantitativamente. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,50 (d, *J* 6,7, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,46 (d, *J* 9, 1H), 7,20 (t, *J* 7,5, 1H), 6,85 (t, *J* 6,7, 1H), 3,69 (s, 2H).

Intermedio 30: Ácido 2-(quinolin-6-il) acético: Se añadió gota a gota ácido sulfúrico (67,5 ml) a ácido 4-aminofenilacético (45 g, 297 mmol), glicerol (61,7 g, 67 mmol), y yodo (1,14 g, 4 mmol) a ta. La mezcla se calentó a 140 °C durante 24 h. Después de esto, la mezcla de reacción se enfrió a ta y el pH se ajustó a 5 usando una solución al 10 % de hidróxido sódico. A ésta, se le añadieron metanol (350 ml) y ácido sulfúrico (3 ml) y se calentaron a 100 °C durante 24 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el filtrado se evaporó en un evaporador rotatorio para obtener el residuo. El pH del residuo se ajustó a 5 usando una solución al 4 % de NaOH y

se extrajo con EtOAc. La capa de EtOAc se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el EtOAc se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por columna usando EtOAc y éter de pet. como eluyente para obtener 2-(quinolin-6-il)acetato de metilo (11,2 g). Se disolvió 2-(quinolin-6-il)acetato de metilo (11,2 g) en metanol (8 ml) y agua (8 ml) y se añadió hidróxido sódico (3,3 g, 82 mmol). Esta mezcla se agitó durante 5 30 min y el metanol se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener el residuo. El residuo se acidificó a pH 5 usando HCl 0,8 N para obtener el sólido. El sólido se filtró y se secó para obtener el compuesto del título (8,2 g).

Intermedio 31: Ácido 2-(3-nitropiridin-2-ilamino)acético: Se disolvió 2-cloro-3-nitropiridina (5 g, 31,5 mmol) en EtOH (125 ml), se añadió carbonato potásico (4,35 g, 31,5 mmol) y a esta mezcla se le añadió glicina (4,73 g, 6,3 10 mmol) en 25 ml de agua y se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C para obtener el sólido. Después, el EtOH se eliminó en un evaporador rotatorio y se acidificó con HCl 2 N y el sólido se filtró y se secó al vacío para obtener el compuesto del título cuantitativamente en forma de un sólido de color amarillo.

Intermedio 32: Ácido 2-(3-aminopiridin-2-ilamino)acético: Se añadieron polvo de hierro (14,15 g, 0,25 mol) y cloruro de amonio (5,41 g, 101,47 mmol) a una solución del intermedio **31** (10 g, 50,74 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 225 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la concentración de las capas combinadas proporcionaron el compuesto del título (10 g) en forma de un sólido de color pardo.

Intermedio 33: Ácido 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)acético: El intermedio **32** (10,92 g, 65,35 mmol) se disolvió en 30 ml de agua y se añadieron 13 ml de AcOH. A esta mezcla se le añadió una solución de nitrito sódico (4,96 g, 71,88 mmol) a ta y la mezcla se enfrió a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se filtró la mezcla de reacción. El sólido que se obtuvo se secó al vacío para obtener el compuesto del título (7,5 g) en forma 25 de un sólido de color rojo.

Intermedio 34: Ácido (R)-2-(3-nitropiridin-2-ilamino)propanoico: Se disolvió 2-cloro-3-nitropiridina (500 mg, 3,15 mmol) en EtOH (12,5 ml), se añadió carbonato potásico (435 mg, 3,15 mmol) y a esta mezcla se le añadió ácido (S)-2-aminopropanoico (561 mg, 6,3 mmol) en 2,5 ml de agua y se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla de 30 reacción se enfrió a 0 °C para obtener el sólido. Después, el EtOH se eliminó en un evaporador rotatorio y se acidificó con HCl 2 N y el sólido se filtró y se secó al vacío para obtener el compuesto del título (460 mg) en forma de un sólido de color amarillo.

Intermedio 35: Ácido (R)-2-(3-aminopiridin-2-ilamino)propanoico: Se añadieron polvo de hierro (657 mg, 11,78 35 mmol) y cloruro de amonio (251 mg, 53,4 mmol) a una solución del intermedio **34** (500 mg, 2,35 mmol) en EtOH/H₂O (2:1, 12 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla se filtró a través de celite y el celite se lavó con etanol. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la concentración de las capas combinadas proporcionaron el compuesto del título (600 mg) en forma de un sólido de color negro.

Intermedio 36: Ácido (R)-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il) propanoico: El intermedio **35** (600 mg, 3,3 mmol) se disolvió en 1,5 ml de agua y se añadieron 0,5 ml de AcOH. A esta mezcla se le añadió una solución de nitrito sódico ((190 mg, 2,76 mmol) a ta y la mezcla se enfrió a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y después se filtró. El sólido resultante se secó al vacío para obtener el compuesto del título (160 mg) en forma de un 40 sólido de color rojo. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,04 (s, 1H), 8,18-8,17 (m, 1H), 7,51-7,40 (m, 2H), 5,30 45 (c, J 7,12, 1H), 1,18 (d, J 7,12, 3H).

Intermedio 37: 2-(quinolin-6-il) propanoato de metilo: Se recogió THF (5 ml) en un MFR, se añadió diisopropil amina (0,19 ml, 1,29 mmol) y se enfrió a -78 °C en una atmósfera de nitrógeno. Después, se añadió n-BuLi (0,8 ml, 1,29 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 30 min. En esta fase, se añadió 2-(quinolin-6-il)acetato de 50 metilo (0,2 g, 0,99 mmol) y se agitó a -78 °C durante 30 min. Después, se añadió yoduro de metilo (0,17 g, 1,2 mmol) y se agitó a -78 °C durante 30 min y después se llevó lentamente a ta. A ta, la mezcla de reacción se dejó agitar durante una noche. La mezcla de reacción se inactivó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el EtOAc se eliminó usando un evaporador rotatorio para obtener el producto en bruto, que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice de 60-120 de malla y AE y éter de pet. (25:75) 55 como eluyente. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,89-8,86 (m, 1H), 8,13 (d, J 7,8, 1H), 8,07 (d, J 8,7, 1H), 7,76-7,64 (m, 2H), 7,42-7,37 (m, 1H), 3,92 (c, J 7,2, 1H), 3,68 (s, 3H), 1,60 (d, J 7,2, 3H).

Intermedio 38: Ácido 2-(quinolin-6-il)propanoico: El intermedio **37** (440 mg, 2,04 mmol) se disolvió en MeOH (5 ml), se añadieron agua (2 ml) e hidróxido de litio (427 mg, 10,2 mmol). Esta mezcla se calentó a reflujo durante 2 h y

se enfrió la mezcla de reacción. El metanol se eliminó en un evaporador rotatorio y al residuo se le añadió HCl 6 N para ajustar el pH a 7. El sólido que se obtuvo se filtró y se secó para obtener el compuesto del título en forma de un sólido.

- 5 **Intermedio 39: quinolin-6-ilmetanamina:** Se mezclaron 6-ciano quinolina (14 g) [sintetizado según Srivastava, Rajiv et al, Synthetic Communications 37 (3), 431-438, 2007], metanol amónico (250 ml), níquel raney (20 g) y se mantuvieron en una atmósfera de hidrógeno (50-60 Psi) durante 4 h a 40-45 °C. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de celite, y el lecho de celite se lavó con MeOH. El filtrado se concentró para dar el compuesto del título (13,5 g) en forma de un líquido en jarabe de color negro.

10

Procedimiento general para la formación de amida:

- 15 **Procedimiento-1:** Una solución de una anilina apropiada (1 equiv.), el ácido requerido (1,1 equiv.), EDC.HCl (1,2 equiv.), HOBt (0,5 equiv.) y TEA (3 equiv.) en DMF se agitó a TA durante una noche. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación dieron el producto deseado.

- 20 **Procedimiento-2:** El ácido (1 equiv.) se disolvió en DCM, se enfrió a 0 °C, se añadieron cloruro de oxalilo (3 equiv.) y tres gotas de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y el DCM se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener el cloruro de ácido. La amina se disolvió en DCM en una atmósfera de N₂ y se añadió piridina (1,3 equiv.). A esta mezcla se le añadió cloruro de ácido en DCM y se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que la amina se consumió totalmente. El tratamiento (H₂O/AcOEt) y la purificación dieron el producto deseado.

Los siguientes compuestos se prepararon usando estos procedimientos:

25

Ejemplo 1

***N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamida:**

- 30 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (160 mg) se preparó a partir del intermedio **24** (97 mg, 0,60 mmol) y el intermedio **12** (120 mg, 0,50 mmol) en forma de un sólido de color blanquecino. P.F.: 170-176 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 12,74 (s a, 1H), 10,37 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,93 (d, *J* 8,84, 2H), 7,87-7,84 (m, 1H), 7,69 (d, *J* 8,48, 1H), 7,55 (d, *J* 8,84, 2H), 5,79 (s, 1H), 1,86-1,76 (m, 2H), 0,94-0,90 (m, 2H), 0,89-0,82 (m, 2H), 0,69-0,62 (m, 4H). MS (m/z): 382,17. [*M*-H]⁻.

35

Ejemplo 2

***N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-6-carboxamida:**

- 40 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (30 mg) se preparó a partir del intermedio **25** (97 mg, 0,59 mmol) y el intermedio **12** (120 mg, 0,50 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 240-246 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 16,02 (s a, 1H), 10,55 (s, 1H), 8,6 (s a, 1H), 8,06-7,98 (m, 2H), 7,92 (d, *J* 8,8, 2H), 7,57 (d, *J* 8,8, 2H), 5,80 (s, 1H), 1,84-1,78 (m, 2H), 0,93-0,82 (m, 4H), 0,69-0,62 (m, 4H). MS (m/z): 383,21 [*M*-H]⁻.

45 Ejemplo 3

Clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]quinolin-6-carboxamida:

- 50 Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]quinolin-6-carboxamida (60 mg) se preparó a partir del intermedio **26** (95 mg, 0,55 mmol) y el intermedio **12** (120 mg, 0,5 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a 0 °C a esta solución y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (46 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 114-119 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,00 (s, 1H), 9,34 (d, *J* 3,8, 1H), 9,18 (d, *J* 8,2, 1H), 9,00 (s, 1H), 8,59 (d, *J* 8,8, 1H), 8,48 (d, *J* 8,8, 1H), 8,15-8,05 (m, 1H), 7,61 (d, *J* 8,9, 2H), 7,61 (d, *J* 8,9, 2H), 5,84 (s, 1H), 1,89-1,77 (m, 2H), 0,95-0,84 (m, 4H), 0,70-0,64 (m, 4H). MS (m/z): 393,05 [*M*-HCl]⁻.

55

Ejemplo 4

N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]quinoxalin-6-carboxamida

5 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (48 mg) se preparó a partir del intermedio **27** (104 mg, 0,574 mmol) y el intermedio **12** (120 mg, 0,50 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 162-167 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,77 (s, 1H), 9,08-9,06 (br. d, *J* 4,7, 2H), 8,77 (d, *J* 1,7, 1H), 8,36 (d, *J* 1,9, 1H), 8,24 (d, *J* 8,76, 1H), 7,96 (d, *J* 8,84, 2H), 7,59 (d, *J* 8,84, 2H), 5,81 (s, 1H), 1,88-1,77 (m, 2H), 0,95-0,90 (m, 2H), 0,87-0,82 (m, 2H), 0,69-0,62 (m, 4H). MS (m/z): 394. [*M*-H].

Ejemplo 5

10

2-(1H-benzo[*d*]imidazol-1-il)-N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil] acetamida

15 El intermedio **19** (130 mg, 0,41 mmol) y bencimidazol (53 mg, 0,45 mmol) se disolvieron en DMF (5 ml) a 0 °C y se añadió hidruro sódico (28,35 mg, 1,23 mmol) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento (H₂O:AcOEt) seguido de purificación sobre columna proporcionó el compuesto del título (40 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 230-235 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,61 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,70-7,65 (m, 3H), 7,54-7,51 (m, 3H), 7,26-7,18 (m, 2H), 5,78 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 1,86-1,71 (m, 2H), 0,92-0,80 (m, 4H), 0,68-0,59 (m, 4H). MS (m/z): 396,07 [*M*-H].

Ejemplo 6**2-(1H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]acetamida:**

25 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (100 mg) se preparó a partir de ácido 2-(1H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acético (177 mg, 0,60 mmol) y el intermedio **12** (120 mg, 0,50 mmol) en forma de un sólido de color blanquecino. P.F.: 216-220 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,75 (s, 1H), 8,07 (d, *J* 8,4, 1H), 7,85 (d, *J* 8,4, 1H), 7,69 (d, *J* 8,84, 2H), 7,58-7,52 (m, 3H), 7,44-7,40 (m, 1H), 5,78 (s, 1H), 5,71 (s, 2H), 1,85-1,80 (m, 2H), 0,90-0,80 (m, 4H), 0,66-0,60 (m, 4H). MS (m/z): 396,93 [*M*-H].

Ejemplo 7**N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(1H-indol-3-il)acetamida:**

35 El compuesto del título (160 mg) se preparó a partir de ácido 2-(1H-indol-3-il)acético (104 mg, 0,6 mmol) y el intermedio **12** (120 mg, 0,500 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 158-164 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,90 (s, 1H), 10,23 (s, 1H), 7,70 (d, *J* 8,8, 2H), 7,60 (d, *J* 7,8, 1H), 7,47 (d, *J* 8,8, 2H), 7,34 (d, *J* 8,0, 1H), 7,26-7,25 (d, *J* 1,9, 1H), 7,06 (t, *J* 7,4, 1H), 6,97 (t, *J* 7,3, 1H), 5,76 (s, 1H), 3,74 (s, 2H), 1,84-1,80 (m, 1H), 1,79-1,71 (m, 1H), 0,89-0,79 (m, 4H), 0,65-0,59 (m, 4H). MS (m/z): 395,25 [*M*-H].

Ejemplo 8**Clorhidrato de N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)acetamida:**

45 Siguiendo el procedimiento general-1, N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)acetamida (56 mg) se preparó a partir del intermedio **29** (79 mg, 0,45 mmol) y el intermedio **12** (90 mg, 0,38 mmol) en forma de un sólido de color pardo y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (54 mg) en forma de un sólido de color pardo pálido. P.F. 92-97 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,82 (s, 1H), 8,92 (d, *J* 6,7, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,97-7,92 (m, 2H), 7,75 (d, *J* 8,7, 2H), 7,53 (d, *J* 8,7, 2H), 7,52-7,47 (m, 1H), 5,79 (s, 1H), 3,80 (s, 2H), 1,87-1,71 (m, 2H), 0,93-0,79 (m, 4H), 0,69-0,58 (m, 4H). MS (m/z): 398,24 [*M*+H-HCl]⁺.

Ejemplo 9**55 N-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida:**

Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (45 mg) se obtuvo a partir del intermedio **30** (93 mg, 0,49 mmol) y el intermedio **12** (100 mg, 0,42 mmol) en forma de un sólido de color pardo. P.F.: 171-177 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,41 (s, 1H), 8,86-8,85 (m, 1H), 8,34 (d, *J* 8,26, 1H), 7,98 (d, *J* 8,64, 1H), 7,89 (s, 1H),

7,76-7,70 (m, 3H), 7,52-7,48 (m, 3H), 5,77 (s, 1H), 3,88 (s, 2H), 1,84-1,78 (m, 1H), 1,77-1,70 (m, 1H), 0,90-0,80 (m, 4H), 0,65-0,59 (m, 4H). MS (m/z): 409,38 [M+H]⁺.

Ejemplo 10

5

Clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida:

El ejemplo 9 (200 mg, 0,48 mmol) se disolvió en HCl saturado en éter dietílico a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (140 mg, rendimiento del 65 % en forma de un sólido de color pardo. P.F.: 152-158 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,78 (s, 1H), 9,26 (m, 1H), 9,16 (d, *J* 8,3, 1H), 8,36 (d, *J* 8,8, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,17-8,15 (m, 1H), 8,08-8,04 (m, 1H), 7,75 (d, *J* 8,9, 2H), 7,50 (d, *J* 8,9, 2H), 5,79 (s, 1H), 4,04 (s, 2H), 1,85-1,70 (m, 2H), 0,89-0,81 (m, 4H), 0,66-0,60 (m, 4H). MS (m/z): 443,01 [M-H]⁻.

15 Ejemplo 11

2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-(4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)-3-fluorofenil)acetamida:

Seguendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (29 mg) se preparó a partir de ácido 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acético (133 mg, 0,75 mmol) y el intermedio 13 (120 mg, 0,47 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido. P.F.: 201-203 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,0 (s, 1H), 8,07 (d, *J* 8,4, 1H), 7,85 (d, *J* 8,4, 1H), 7,74 (dd, *J* 2, 12,5, 1H), 7,56 (t, *J* 7,4, 1H), 7,47 (t, *J* 8,4, 1H), 7,43-7,40 (m, 2H), 5,74 (s, 2H), 1,86-1,80 (m, 1H), 1,55-1,44 (m, 2H), 0,90-0,74 (m, 4H), 0,62-0,54 (m, 4H). MS (m/z): 417,28[M+H]⁺.

25 Ejemplo 12

Clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)-3-fluorofenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida:

Seguendo el procedimiento general-1, *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)-3-fluorofenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida (95 mg) se preparó a partir del intermedio 13 (200 mg, 0,78 mmol) y el intermedio 30 (232 mg, 1,2 mmol) en forma de un sólido de color amarillo y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (50 mg) en forma de un sólido de color amarillo. P.F.: 106,8-108,2 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,99 (s, 1H), 9,24 (d, *J* 4,5, 1H), 9,09 (d, *J* 8,0, 1H), 8,32-8,25 (m, 2H), 8,12 (d, *J* 8,6, 1H), 8,05-8,01 (m, 1H), 7,83 (d, *J* 11,3, 1H), 7,50-7,41 (m, 2H), 5,73 (s, 1H), 4,07 (s, 2H), 1,84-1,76 (m, 1H), 1,52-1,42 (m, 1H), 0,82-0,74 (m, 4H), 0,62-0,52 (m, 4H). MS (m/z): 427,10 [M+H]⁺.

Ejemplo 13

40 Diclorhidrato de *N*-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinolin-6-carboxamida:

Seguendo el procedimiento general-1, *N*-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinolin-6-carboxamida (71 mg) se preparó a partir del intermedio 26 (103 mg, 0,59 mmol) y el intermedio 14 (120 mg, 0,49 mmol) en forma de un sólido de color naranja y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (62 mg) en forma de un sólido de color amarillo. P.F. 232-238 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,09 (s, 1H), 9,25 (d, *J* 4,0, 1H), 9,02 (d, *J* 7,3, 1H), 8,93 (d, *J* 8,4, 2H), 8,53 (d, *J* 9,0, 1H), 8,43-8,36 (m, 2H), 8,02-7,95 (m, 1H), 7,78 (d, *J* 8,8, 1H), 5,83 (s, 1H), 2,74-2,65 (m, 1H), 1,93-1,84 (m, 1H), 1,00-0,80 (m, 4H), 0,74-0,58 (m, 4H). MS (m/z): 393,94 [M-H-2HCl]⁻.

50

Ejemplo 14

N-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinoxalin-6-carboxamida:

Seguendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (117 mg) se preparó a partir del intermedio 27 (104 mg, 0,59 mmol) y el intermedio 14 (120 mg, 0,49 mmol) en forma de un sólido de color pardo. P.F. 193-198 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,98 (s, 1H), 9,08 (dd, *J* 1,6, 5,8, 2H), 8,91 (d, *J* 2,4, 1H), 8,81 (d, *J* 1,6, 1H), 8,40-8,36 (m, 2H), 8,25 (d, *J* 8,7, 1H), 7,77 (d, *J* 8,7, 1H), 5,83 (s, 1H), 2,75-2,61 (m, 1H), 1,94-1,81 (m, 1H), 0,98-0,82 (m, 4H), 0,70-0,55 (m, 4H). MS (m/z): 397,22 [M+H-HCl]⁺.

Ejemplo 15**2-(1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]acetamida:**

5 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (250 mg) se preparó a partir del intermedio **14** (200 mg, 0,84 mmol) y ácido 2-(1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)acético (237 mg, 1,34 mmol) en forma de un sólido de color naranja. P.F.: 130,1-132,8 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,92 (s, 1H), 8,64 (d, *J* 2,6, 1H), 8,13 (dd, *J* 2,6, 8,9, 1H), 8,07 (d, *J* 8,4, 1H), 7,86 (d, *J* 8,4, 1H), 7,70 (d, *J* 8,9, 1H), 7,56 (t, *J* 7,6, 1H), 7,44 (t, *J* 7,6, 1H), 5,81 (s, 10 1H), 5,74 (s, 2H), 2,70-2,60 (m, 1H), 1,90-1,80 (m, 1H), 0,93-0,83 (m, 4H), 0,70-0,58 (m, 4H). MS (m/z): 400,28 [M+H-HCl]⁺.

Ejemplo 16**15 Diclorhidrato de *N*-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il) acetamida:**

Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il)acetamida (138 mg) se preparó a partir del intermedio **30** (112 mg, 0,59 mmol) y el intermedio **14** (120 mg, 0,49 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 20 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (34 mg) en forma de un sólido de color blanquecino. P.F. 62-67 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,86 (s, 1H), 9,21 (d, *J* 4,4, 1H), 9,04 (d, *J* 8,1, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,30-8,22 (m, 2H), 8,18 (d, *J* 8,1, 1H), 8,09 (d, *J* 8,4, 1H), 8,00-7,97 (m, 1H), 7,68 (d, *J* 8,8, 1H), 5,80 (s, 1H), 4,05 (s, 2H), 2,69-2,55 (m, 1H), 1,89-1,75 (m, 1H), 0,97-0,78 (m, 4H), 0,70-0,50 (m, 4H). MS (m/z): 410,26 [M+H-2HCl]⁺.

25

Ejemplo 17**Clorhidrato de *N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}quinolin-6-carboxamida:**

30 Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}quinolin-6-carboxamida (35 mg) se preparó a partir del intermedio **26** (85 mg, 0,49 mmol) y el intermedio **15** (120 mg, 0,45 mmol) en forma de un sólido de color pardo (35 mg) y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a la solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (30 mg) en forma de un sólido de color amarillo. P.F. 188-192 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,86 35 (s, 1H), 9,15 (d, *J* 4, 1H), 8,80-8,78 (m, 2H), 8,39 (d, *J* 8,8, 1H), 8,26 (d, *J* 8,8, 1H), 8,04 (d, *J* 8,8, 2H), 7,83-7,80 (m, 1H), 7,67 (d, *J* 8,8, 2H), 6,62 (s, 1H), 1,89-1,84 (m, 1H), 1,00-0,96 (m, 2H), 0,84-0,80 (m, 2H). MS (m/z): 457,16 [M-H]⁻.

Ejemplo 18

40

***N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}quinoxalin-6-carboxamida:**

Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (60 mg) se preparó a partir del intermedio **27** (78 mg, 0,44 mmol) y el intermedio **15** (110 mg, 0,411 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido. P.F. 205-209 °C. 45 ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,87 (s, 1H), 9,08-9,05 (m, 2H), 8,79 (d, *J* 1,6, 1H), 8,36 (dd, *J* 1,8, 8,7, 1H), 8,25 (d, *J* 8,72, 1H), 8,05 (d, *J* 8,84, 2H), 7,67 (d, *J* 8,8, 2H), 6,62 (s, 1H), 1,88-1,84 (m, 1H), 0,99-0,96 (m, 2H), 0,84-0,81 (m, 2H). MS (m/z): 422,03 [M-H]⁻.

Ejemplo 19

50

2-(1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}acetamida:

El intermedio **20** (180 mg, 0,523 mmol) y bencimidazol se disolvieron en DMF (3 ml) a 0 °C y se añadió hidruro sódico (37,7 mg, 1,57 mmol) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente 55 durante una noche. El tratamiento (H₂O:AcOEt) seguido de purificación sobre columna proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. P.F. 178-184 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,72 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,77 (d, *J* 8,8, 2H), 7,66 (d, *J* 7,72, 1H), 7,59 (d, *J* 8,8, 2H), 7,54 (d, *J* 7,72, 1H), 7,26-7,18 (m, 2H), 6,59 (s, 1H), 5,21 (s, 2H), 1,82-1,78 (m, 1H), 0,96-0,92 (m, 2H), 0,81-0,77 (m, 2H). MS (m/z): 424,04 [M-H]⁻.

Ejemplo 20**2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida:**

- 5 El intermedio **20** (150 mg, 0,44 mmol) y benzotriazol (52 mg, 0,44 mmol) se disolvieron en DMF (3 ml) a 0 °C y se añadió hidruro sódico (31,5 mg, 1,30 mmol) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento (H₂O:AcOEt) seguido de purificación sobre columna proporcionó el compuesto del título (60 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 200-204 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,86 (s, 1H), 8,07 (d, *J* 8,4, 2H), 7,86 (d, *J* 8,4, 2H), 7,77 (d, *J* 8,8, 1H), 7,60 (d, *J* 8,8, 1H), 10 7,59-7,54 (m, 1H), 7,44-7,40 (m, 1H), 6,60 (s, 1H), 5,73 (s, 2H), 1,83-1,77 (m, 1H), 0,97-0,92 (m, 2H), 0,79-0,75 (m, 2H). MS (m/z): 425,02 [*M-H*].

Ejemplo 21

- 15 **2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida:**

- El intermedio **20** (500 mg, 1,45 mmol) y benzotriazol (173 mg, 1,45 mmol) se disolvieron en DMF (10 ml) a 0 °C y se añadieron hidruro sódico (31,5 mg, 1,30 mmol) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento (H₂O:AcOEt) seguido de purificación sobre columna proporcionó el compuesto del título (60 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 188-192 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,85 (s, 1H), 7,95 (dd, *J* 2,8, 6,4, 2H), 7,77 (d, *J* 8,7, 2H), 7,61 (d, *J* 8,7, 2H), 7,45 (dd, *J* 2,8, 6,4, 2H), 6,60 (s, 1H), 5,74 (s, 2H), 1,86-1,78 (m, 1H), 0,99-0,91 (m, 2H), 0,83-0,76 (m, 2H). MS (m/z): 425,14. [*M-H*].

25 Ejemplo 22**2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida:**

- Siguiendo el procedimiento general-2, el compuesto del título (20 mg) se preparó a partir del intermedio **15** (500 mg, 1,9 mmol) y el intermedio **33** (442 mg, 2,2 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 206-209 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,98 (s, 1H), 7,83 (dd, *J* 1,4, 4,8, 1H), 7,71 (d, *J* 8,9, 2H), 7,60 (d, *J* 8,9, 2H), 7,35 (dd, *J* 1,4, 8, 1H), 7,20-7,15 (m, 1H), 6,61 (s, 1H), 4,50 (s, 2H), 1,85-1,76 (m, 1H), 1,00-0,92 (m, 2H), 0,82-0,76 (m, 2H). MS (m/z): 468,71 [*M+CH₃CN*]⁺.

35 Ejemplo 23**(S)-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}propanamida:**

- 40 Siguiendo el procedimiento general-2, el compuesto del título (20 mg) se preparó a partir del intermedio **15** (180 mg, 0,67 mmol) y el intermedio **36** (170 mg, 0,81 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido. P.F.: 186-191 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,02 (s, 1H), 7,86 (dd, *J* 1,3, 4,8, 1H), 7,72 (d, *J* 8,8, 2H), 7,60 (d, *J* 8,8, 2H), 7,38 (dd, *J* 1,3, 8, 1H), 7,22-7,14 (m, 1H), 6,60 (s, 1H), 4,94 (c, *J* 7,2, 1H), 1,89-1,79 (m, 1H), 1,29 (d, *J* 7,2, 3H), 1,00-0,92 (m, 2H), 0,82-0,74 (m, 2H). MS (m/z): 482,78 [*M+CH₃CN*]⁺.

45

Ejemplo 24**2-(6-amino-9H-purin-9-il)-N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}acetamida:**

- 50 Se disolvió adenina (233 mg, 1,76 mmol) en DMF (10 ml), y se añadió carbonato potásico (298 mg, 2,2 mmol) y se agitó a ta durante 30 min. El intermedio **15** (233 mg, 1,8 mmol) se añadió a esta mezcla de reacción y se agitó a ta durante 2 h. Después de la finalización de la reacción, se añadió agua a la mezcla de reacción y se extrajo con AcOEt. La capa de AcOEt se secó sobre sulfato sódico anhidro y el AcOEt se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por columna usando DCM:MeOH (98:2) como eluyente para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 249,3-251,7 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,73 (s, 1H), 8,12 (d, *J* 8,12, 2H), 7,76 (d, *J* 8,8, 2H), 7,59 (d, *J* 8,8, 2H), 7,23 (s, 2H), 6,60 (s, 1H), 5,10 (s, 2H), 1,85-1,76 (m, 1H), 1,00-0,90 (m, 2H), 0,82-0,74 (m, 2H). MS (m/z): 440,71 [*M-H*].

Ejemplo 25

N-(4-(5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)fenil)-2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-2,3-dihidro-1H-purin-7(6H)-il)acetamida:

5 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (77 mg) se preparó a partir de ácido teofilin-7-acético (117 mg, 0,49 mmol) y el intermedio **15** (120 mg, 0,45 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido. P.F. 178-184 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,66 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,75 (d, *J* 8,9, 2H), 7,59 (d, *J* 8,9, 2H), 6,59 (s, 1H), 5,23 (s, 2H), 3,45 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 1,83-1,77 (m, 1H), 0,98-0,91 (m, 2H), 0,85-0,76 (m, 2H). MS (m/z): 486,20 [*M*-H].

10

Ejemplo 26**Clorhidrato de N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}-2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida:**

15

Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-{4-[5(3)-ciclopropil-3(5)-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}-2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida se preparó a partir del intermedio **29** (71 mg, 0,40 mmol) y el intermedio **15** (90 mg, 0,34 mmol) en forma de un sólido de color pardo y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (79 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 294-299 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,85 (s, 1H), 8,90 (d, *J* 6,5, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,97-7,88 (m, 2H), 7,82 (d, *J* 8,7, 2H), 7,61 (d, *J* 8,7, 2H), 7,47 (t, *J* 5,6, 1H), 6,61 (s, 1H), 4,16 (s, 2H), 1,84-1,79 (m, 1H), 0,98-0,90 (m, 2H), 0,64-0,49 (m, 2H). MS (m/z): 426,27 [*M*+H-HCl]⁺.

25 **Ejemplo 27****Clorhidrato de N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)acetamida:**

Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-{4-[3-ciclopropil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)acetamida (95 mg) se preparó a partir del intermedio **30** (92 mg, 0,49 mmol) y el intermedio **15** (120 mg, 0,45 mmol) en forma de un sólido de color blanquecino. Esta amida se disolvió en HCl saturado en éter dietílico a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (80 mg) en forma de un sólido de color blanquecino. P.F. 248-254 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,75 (s, 1H), 9,17 (d, *J* 4,4, 1H), 8,95 (d, *J* 8,2, 1H), 8,24-8,19 (m, 2H), 8,05 (d, *J* 8,6, 1H), 7,94-7,91 (m, 1H), 7,82 (d, *J* 8,7, 2H), 7,57 (d, *J* 8,7, 2H), 6,59 (s, 1H), 4,03 (s, 2H), 1,79-1,75 (m, 1H), 0,96-0,91 (m, 2H), 0,80-0,77 (m, 2H). MS (m/z): 435 [*M*-H-HCl].

35

Ejemplo 2840 **Clorhidrato de N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)propanamida:**

Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)propanamida (74 mg) se preparó a partir del intermedio **15** (150 mg, 0,56 mmol) y el intermedio **38** (180 mg, 0,89 mmol) en forma de un sólido de color pardo y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (45 mg) en forma de un sólido de color pardo. P.F.: 168-170 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,61 (s, 1H), 9,11 (d, *J* 3,7, 1H), 8,87 (d, *J* 8, 1H), 8,18 (d, *J* 9, 2H), 8,07 (dd, *J* 1,6, 8,8, 1H), 7,85 (dd, *J* 4,9, 8,3, 1H), 7,79 (d, *J* 8,9, 2H), 7,55 (d, *J* 8,9, 2H), 6,59 (s, 1H), 4,20 (c, *J* 6,8, 1H), 1,80-1,70 (m, 1H), 1,57 (d, *J* 6,8, 3H), 1,00-0,90 (m, 2H), 0,80-0,70 (m, 2H). MS (m/z): 451,11 [*M*+H-HCl].

50

Ejemplo 29**N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluorofenil}-1H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-6-carboxamida:**

55 Siguiendo el procedimiento general-2, el compuesto del título (30 mg) se preparó a partir del intermedio **16** (150 mg, 0,53 mmol) y el intermedio **25** (114 mg, 0,63 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 235-237 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,84 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,07 (dd, *J* 2,2, 12,7, 1H), 8,02 (s, 2H), 7,79 (dd, *J* 1,8, 8,7, 1H), 7,66 (t, *J* 8,6, 1H), 6,62 (s, 1H), 1,68-1,60 (m, 1H), 0,96-0,88 (m, 2H), 0,81-0,75 (m, 2H). MS (m/z): 428,84 [*M*-H].

Ejemplo 30**2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]-3-fluorofenil}acetamida:**

5 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (145 mg) se preparó a partir de ácido 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acético (112 mg, 0,80 mmol) y el intermedio **16** (300 mg, 1,14 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 197-202 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,09 (s, 1H), 8,07 (d, *J* 8,4, 1H), 7,86 (d, *J* 8,4, 1H), 7,81 (dd, *J* 2,12,4, 1H), 7,63 (t, *J* 8,6, 1H), 7,57 (t, *J* 7,7, 1H), 7,50-7,48 (m, 1H), 7,42 (t, *J* 7,8, 1H), 6,60 (s, 10 1H), 5,75 (s, 2H), 1,64-1,52 (m, 1H), 0,92-0,84 (m, 2H), 0,78-0,69 (m, 2H). MS (m/z): 442,69 [*M*-H]⁻.

Ejemplo 31***N*-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-5-carboxamida:**

15 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (43 mg) se preparó a partir del intermedio **17** (200 mg, 0,75 mmol) y el intermedio **25** (194 mg, 1,2 mmol) en forma de un sólido de color blanco. P.F.: 235,6-238,4 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 10,86 (s, 1H), 8,99 (d, *J* 2,5, 1H), 8,68 (s a, 1H), 8,48 (dd, *J* 2,6, 8,8, 1H), 8,08-8,01 (m, 2H), 7,82 (d, *J* 8,8, 1H), 6,65 (s, 1H), 2,58-2,50 (m, 1H), 1,04-0,98 (m, 2H), 0,82 -0,74 (m, 2H). MS (m/z): 20 413,89 [*M*+H]⁺.

Ejemplo 32**2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}acetamida:**

25 El intermedio **21** (200 mg, 0,58 mmol) y benzotriazol (69 mg, 0,58 mmol) se disolvieron en DMF (10 ml) a 0 °C y se añadieron hidruro sódico (41,0 mg, 1,74 mmol) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento (H₂O:AcOEt) seguido de purificación sobre columna proporcionó el compuesto del título (60 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 189-192 °C. ¹H RMN (δ ppm, 30 DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,07 (s, 1H), 8,76 (d, *J* 2,1, 1H), 8,25 (dd, *J* 2,3, 8,8 1H), 8,07 (d, *J* 8,3, 1H), 7,87 (d, *J* 8,3, 1H), 7,78 (d, *J* 8,8, 1H), 7,57 (t, *J* 7,6, 1H), 7,42 (t, *J* 7,6, 1H), 6,62 (s, 1H), 5,77 (s, 2H), 2,40-2,30 (m, 1H), 1,00-0,90 (m, 2H), 0,80-0,70 (m, 2H). MS (m/z): 426,13 [*M*-H]⁻.

Ejemplo 33**2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}acetamida**

35 El intermedio **21** (200 mg, 0,58 mmol) y benzotriazol (69 mg, 0,58 mmol) se disolvieron en DMF (10 ml) a °C y se añadió hidruro sódico (41,0 mg, 1,74 mmol) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se dejó agitar a 40 temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento (H₂O:AcOEt) seguido de purificación sobre columna proporcionó el compuesto del título (60 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 193-198 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,06 (s, 1H), 8,75 (d, *J* 2,4, 1H), 8,25 (dd, *J* 2,5, 8,8, 1H), 7,98-7,92 (m, 2H), 7,78 (d, *J* 8,8, 1H), 7,50-7,44 (m, 2H), 6,62 (s, 1H), 5,78 (s, 2H), 2,58-2,40 (m, 1H), 1,00-0,90 (m, 2H), 0,80-0,71 (m, 2H). MS (m/z): 425,99 [*M*-H]⁻.

45

Ejemplo 34**Clorhidrato de *N*-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}-2-(quinolin-6-il)acetamida**

50 Siguiendo el procedimiento general-1, *N*-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}-2-(quinolin-6-il)acetamida (67 mg) se preparó a partir del intermedio **30** (133 mg, 0,71 mmol) y el intermedio **17** (120 mg, 0,45 mmol) en forma de un sólido de color amarillo pálido y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (63 mg) en forma de un sólido de color blanco. P.F. 225-230 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 55 400 MHz): 10,96 (s, 1H), 9,15 (d, *J* 4,4, 1H), 8,90 (d, *J* 8,0, 1H), 8,80 (d, *J* 2,3, 1H), 8,30 (dd, *J* 2,4, 8,8, 1H), 8,21 (d, *J* 8,7, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,03 (d, *J* 8,3, 1H), 7,90 (dd, *J* 5, 8,2, 1H), 7,75 (d, *J* 8,8, 1H), 6,61 (s, 1H), 4,06 (s, 2H), 2,51-2,40 (m, 1H), 1,01-0,90 (m, 2H), 0,81-0,70 (m, 2H). MS (m/z): 436,02 [*M*-H-2HCl]⁻.

Ejemplo 35

2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-{6-[4-cloro-5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}acetamida:

5 Siguiendo el procedimiento general-1, el compuesto del título (97 mg) se preparó a partir de ácido 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acético (123 mg, 0,68 mmol) y el intermedio **18** (120 mg, 0,43 mmol) en forma de un sólido de color pardo. P.F.: 182,5-189,3 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11,13 (s, 1H), 8,78 (d, *J* 2,4, 1H), 8,27 (dd, *J* 2,6, 8, 1H), 8,07 (d, *J* 8,4, 1H), 7,87 (d, *J* 8,4, 1H), 7,75 (d, *J* 8,7, 1H), 7,6 (t, *J* 7,3, 1H), 7,4 (t, *J* 7,5, 1H), 5,78 (s, 2H), 2,20-2,08 (m, 1H), 0,92-0,84 (m, 2H), 0,70-0,59 (m, 2H). MS (m/z): 459,8[M-H].

10

Ejemplo 36**Clorhidrato de 4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]-3-fluoro-*N*-(quinolin-6-ilmetil)benzamida:**

15 Siguiendo el procedimiento general-2, 4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]-3-fluoro-*N*-(quinolin-6-ilmetil)benzamida (83 mg) se preparó a partir del intermedio **23** (200 mg, 0,67 mmol) y el intermedio **39** (188 mg, 0,60 mmol) en forma de un sólido de color blanco y se disolvió en THF. Se añadió HCl saturado en éter dietílico a esta solución a 0 °C y se agitó durante 15 min. El sólido que se eliminó por separación se filtró y se secó para dar el compuesto del título (70 mg) en forma de un sólido de color blanquecino. P.F.: 156-159 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 9,61 (t, *J* 5,7, 1H), 9,15 (d, *J* 4,2, 1H), 8,95 (d, *J* 8,4, 1H), 8,25 (d, *J* 8,8, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,07-8,03 (m, 2H), 7,98 (d, *J* 8,3, 1H), 7,93-7,90 (m, 1H), 7,84 (t, *J* 7,8, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,75 (d, *J* 5,7, 2H), 1,72-1,61 (m, 1H), 0,97-0,88 (m, 2H), 0,81-0,74 (m, 2H). MS (m/z): 455,03 [M+H-HCl]⁺.

20

Ejemplo 37**1-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-3-(quinolin-6-il)urea:**

Se disolvieron 6-amino quinolina (200 mg, 0,88 mmol), trifosgeno (156 mg, 0,53 mmol) y trietil amina (0,4 ml, 3,5 mmol) en DCM y se agitó a ta durante 30 min en una atmósfera de nitrógeno. Después de esto, el intermedio **12** (200 mg, 0,88 mmol) se añadió y la mezcla se calentó a 40 °C durante 40 h. Después de esto, se añadieron CHCl₃ (10 ml) y ácido cítrico 0,2 M (2,5 ml) a la mezcla de reacción y la fase acuosa se eliminó. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La capa orgánica se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice de 60-120 de malla y DCM y MeOH (98:2) como eluyente para obtener el compuesto del título (25 mg) en forma de un sólido de color pardo. P.F.: 102-104 °C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-*d*₆, 400 MHz): 9,07 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,73 (dd, *J* 1,6, 4,2, 1H), 8,23 (d, *J* 7,9, 1H), 8,17 (d, *J* 2,2, 1H), 7,94 (d, *J* 9,0, 1H), 7,71 (dd, *J* 2,4, 9,1, 1H), 7,59 (d, *J* 8,9, 2H), 7,48 (d, *J* 8,9, 2H), 7,47-7,43 (m, 1H), 5,77 (s, 1H), 1,88-1,71 (m, 2H), 0,90-0,82 (m, 4H), 0,70-0,58 (m, 4H). MS (m/z): 410,44 [M+H]⁺

35

40 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Las propiedades de los compuestos de esta invención se pueden confirmar mediante varios ensayos biológicos/farmacológicos. El ensayo biológico/farmacológico que se puede realizar con los compuestos de acuerdo con la invención y/o sus sales farmacéuticamente aceptables se ilustran a continuación. De forma similar, los compuestos de la presente invención también pueden ensayarse usando otros ensayos, tales como estimación de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TNF alfa, interferón gamma, etc.) en Jurkat, así como PBMC humanas. Los compuestos de la invención también se pueden ensayar en diversos modelos animales para establecer los diversos potenciales terapéuticos de los compuestos de esta invención.

45

50 1. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LOS CANALES CRAC *IN VITRO***1A. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LOS CANALES CRAC *IN VITRO* EN CÉLULAS Jurkat**

Se determinó la inhibición de los canales CRAC después de la liberación de calcio endoplasmático inducida por tapsigargina (Sigma, Cat. N.º T9033) en células Jurkat (véase Yasurio Yonetoky et.al Bio. & Med Chem. 14 (2006) 4750-4760). Las células se centrifugaron y se suspendieron de nuevo en volúmenes equivalentes de tampón de Hank libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ y solución de carga de colorante Fluo-8 NW (ABD Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA) a 2 x 10⁵ células/100 µl/pocillo en una placa de color negro de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C/CO₂ al 5 % durante 30 minutos seguido de 15 minutos más de incubación a temperatura ambiente. Se añadieron compuestos de ensayo

55

(soluciones madre de DMSO diluidas en tampón de Hank libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}) a concentraciones deseadas a los pocillos y se incubaron durante 15 min. Se añadió tapsigargina (concentración final de 1 μM) a los pocillos y se incubó durante 15 min para inhibir la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarco-endoplasmático, agotando de este modo el calcio endoplasmático y elevando las concentraciones de calcio citosólico. La entrada de calcio dependiente de depósito se inició mediante la adición de Ca^{2+} extracelular a una concentración final de 1,8 mM. La fluorescencia se controló durante 5 min en un lector de placas (BMG Labtech., Alemania) con excitación a 485 nm y una longitud de onda de emisión a 520 nm. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. La CI_{50} para cada compuesto se determinó basándose en el porcentaje de inhibición del influjo de calcio inducido por tapsigargina en las células. Los resultados son como se proporciona en la Tabla 1A.

10

Tabla 1A

Compuesto	% de inhibición (1 μM)	CI_{50} (nM)	Compuesto	% de inhibición (1 μM)	CI_{50} (nM)
Ejemplo 1	57,6	-	Ejemplo 20	100	39,17
Ejemplo 2	78	182,5	Ejemplo 21	83,03	139,0
Ejemplo 3	100	-	Ejemplo 22	30,86	-
Ejemplo 4	85	-	Ejemplo 23	69,87	-
Ejemplo 5	88,51	383,1	Ejemplo 24	14,77	-
Ejemplo 6	94,6	51,31	Ejemplo 25	39,07	-
Ejemplo 7	36,83	-	Ejemplo 26	30,86	-
Ejemplo 8	17,90	-	Ejemplo 27	100	-
Ejemplo 9	100	-	Ejemplo 28	0	-
Ejemplo 10	100	146,7	Ejemplo 29	81,1	-
Ejemplo 11	78,56	-	Ejemplo 30	100	160,5
Ejemplo 12	100	263,2	Ejemplo 31	50,62	-
Ejemplo 13	22,37	-	Ejemplo 32	41,23	-
Ejemplo 14	17,80	-	Ejemplo 33	49,54	-
Ejemplo 15	3,93	-	Ejemplo 34	51,21	-
Ejemplo 16	30,81	-	Ejemplo 35	15	-
Ejemplo 17	94,03	86,12	Ejemplo 36	51,04	-
Ejemplo 18	96,64	53,36	Ejemplo 37	57,28	-
Ejemplo 19	69,53	-			

1B. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LOS CANALES CRAC *IN VITRO* EN LA LÍNEA DE CÉLULAS DE CÁNCER NCI-H460

15

Se determinó la inhibición de los canales CRAC después de la liberación de calcio endoplasmático inducida por tapsigargina (Sigma, Cat. n.º T9033) en células NCI-H460 (National Centre For Cell Science (NCCS), Pune).

Las células (30.000 por pocillo) se colocaron en placas durante una noche en medio RPMI completo. El medio se sustituyó con tampón de Hank libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y solución de carga de colorante Fluo-8 NW (ABD Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA) en una placa de color negro de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C/ CO_2 al 5 % durante 30 minutos seguido de 15 minutos más de incubación a temperatura ambiente. Se añadieron a los pocillos compuestos de ensayo (soluciones madre de DMSO diluidas en tampón de Hank libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}) a las concentraciones deseadas y se incubaron durante 15 min. Se añadió tapsigargina (concentración final de 1 μM) a los pocillos y se incubó durante 15 min para inhibir la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarco-endoplasmático, agotando de este modo el calcio endoplasmático y elevando las concentraciones de calcio citosólico. La entrada de calcio dependiente de depósito se inició mediante la adición de Ca^{2+} extracelular a una concentración final de 2,5 mM. La fluorescencia se controló durante 30 minutos en un lector de placas (BMG Labtech., Alemania) con excitación a 485 nm y una longitud de onda de emisión a 520 nm. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. La CI_{50} para cada compuesto se determinó basándose en el porcentaje de inhibición del influjo de calcio inducido por tapsigargina en las células. Los resultados son como se proporciona en la Tabla 2.

30

1C. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO* EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER NCI-H460 (Actividad anticancerosa)

35

Los ensayos de inhibición del crecimiento se realizaron usando medio complementado con FBS al 10 %. Las células se sembraron a una concentración de 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. El compuesto de ensayo a un intervalo de concentración de 0,01 a 10000 nM se añadió después de 24 h. El crecimiento se evaluó usando la

prueba de reducción con colorante de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a 0 h (antes de la adición del compuesto de ensayo) y 48 h después de la adición del compuesto de ensayo. Se leyó la absorbancia en un Fluostar Optima (BMG Labtech, Alemania) a una longitud de onda de 450 nm. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. La CI-50 para cada compuesto se determinó basándose en el % de inhibición debido al compuesto de ensayo en comparación con el control. Los resultados son como se proporciona en la Tabla 2.

Para los métodos de ensayo de proliferación celular, véase, por ejemplo, Mosmann. T., Journal of Immunological Methods, 65(1-2), 55-63, (1983).

10

Tabla 2

Compuesto	Ensayo de Ca de células NCI-H460		Ensayo de la línea celular NCI-H460	
	% de inhibición a 1 μ M	CI 50 nM	% de inhibición a 10 μ M	CI 50 nM
Ejemplo 2	91,14	-	34	-
Ejemplo 3	100	-	-	261,1
Ejemplo 4	80,66	-	41	-
Ejemplo 5	-	79,87	-	177,2
Ejemplo 9	-	-	-	270,3
Ejemplo 10	-	72,65	-	-
Ejemplo 12	-	-	90	100,3
Ejemplo 17	100	-	-	710,2
Ejemplo 19	-	-	83,6	148,4
Ejemplo 24	-	-	84,4	-
Ejemplo 27	98,10	-	-	358,3
Ejemplo 29	-	-	100	1524
Ejemplo 34	-	-	82,72	627,8

2. Inhibición *in vitro* de la liberación de citocinas en células Jurkat, sangre entera humana y células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

15 La inhibición de citocinas IL-2, IL-4, IL-5 y TNF α se determinó como se describe a continuación.

20 **a. Inhibición de IL-2 en células Jurkat:** Las células se incubaron con las concentraciones deseadas del inhibidor durante 15 minutos. La liberación de citocina se indujo mediante la adición de Concanavalina A (25 μ g/ml) + acetato de miristato de forbol (50 ng/ml) para IL-2 y TNF α o con fitohemaglutinina (5 μ g/ml) para IL-4 e IL-5 y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 95 %. El sobrenadante se recogió después de 20 h (IL-2 y TNF α) o 48 h (IL-4 e IL-5) para la estimación de citocinas mediante ELISA. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. Los valores de CI₅₀ para cada compuesto se determinaron en base al porcentaje de inhibición debido al compuesto de ensayo en comparación con el control.

25 **b. Inhibición de la liberación de citocinas en sangre entera humana (HWB):** Se diluyó HWB recién recogida con medio RPMI (1:4,5) y se añadió a una placa de 96 pocillos. Los pocillos se incubaron con las concentraciones deseadas del inhibidor durante 15 minutos. La liberación de citocina se indujo mediante la adición de Concanavalina A (25 μ g/ml) + acetato de miristato de forbol (50 ng/ml) para IL-2 y TNF α o con fitohemaglutinina (5 μ g/ml) para IL-4 e IL-5 y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 95 %. El sobrenadante se recogió después de 20 h (IL-2 y TNF α) o 48 h (IL-4 e IL-5) para la estimación de citocinas mediante ELISA. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. Los valores de CI₅₀ para cada compuesto se determinaron en base al porcentaje de inhibición debido al compuesto de ensayo en comparación con el control.

30 **c. Inhibición de la liberación de citocinas en PBMC :** Se aislaron PBMC de HWB recién recogida mediante gradiente de densidad usando Histopaque y se sembraron en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron con las concentraciones deseadas del inhibidor durante 15 minutos. La liberación de citocina se indujo mediante la adición de Concanavalina A (25 μ g/ml) + acetato de miristato de forbol (50 ng/ml) para IL-2 y TNF α o con fitohemaglutinina (5 μ g/ml) para IL-4 e IL-5 y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 95 %. El sobrenadante se recogió después de 20 h (IL-2 y TNF α) o 48 h (IL-4 e IL-5) para la estimación de citocinas mediante ELISA. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism. Los valores de CI₅₀ para cada compuesto se determinaron en base al porcentaje de inhibición debido al compuesto de ensayo en comparación con el control. Los resultados son como se proporciona en la Tabla 3.

Tabla -3

Compuesto	Valores de CI 50 en nM								
	Jurkat	Sangre entera humana				PBMC			
	IL-2	IL-2	TNF α	IL-5	IL-4	IL-2	TNF α	IL-5	IL-4
Prednisolona	35,48	77,25	-	-	-	3,72	-	-	-
Ejemplo 2	-	102,1	147,6	-	-	-	-	-	-
Ejemplo 6	-	52,24	164,7	-	-	-	-	-	-
Ejemplo 20	-	40,74	35,58	163,5	1227	383,4	138,0	149,2	539,6
Ejemplo 27	-	125,2	117,5	-	-	-	-	-	-

ACTIVIDAD ANTI-CANCEROSA

5 La correlación de la proteína CRAC y STIM y su uso para esta invención se puede confirmar mediante una serie de ensayos biológicos/farmacológicos. Los ensayos biológicos/farmacológicos que se pueden realizar de acuerdo con la invención se ejemplifican a continuación.

Se usaron el Compuesto A, 2-(1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-(4-(5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)fenil)acetamida, y el Compuesto B, N-(4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil)-2-(quinolin-6-il)acetamida como inhibidores de los canales CRAC para el ensayo biológico.

Ejemplo I: Expresión de *Orai1* y *Stim1* en células A549 y NCI-H460

15 La expresión de *Orai1* y *Stim1* en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas se confirmó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Brevemente, se recogieron 5×10^6 células tratadas con las concentraciones deseadas del artículo de ensayo, se sedimentaron y se suspendieron de nuevo en 1 ml del reactivo TRI (Sigma, St. Louis, MO) y el ARN total se extrajo según las instrucciones del fabricante. El ADNc se preparó usando la síntesis de ADNc de primera hebra y se amplificó usando los siguientes pares de cebadores:

20

Orai1: Directo 5' CATGGTGGCAATGGTGGAGGTG 3'

Inverso 5' AGGCACTGAAGGCGATGAGCA 3'

Orai2: Directo 5'ATGGTGCCATGGTGGAGGT 3'

Inverso 5'TGCAGGCGCTGAAGGCAAT 3'

25

Orai3: Directo 5'AAGCTCAAAGCTTCCAGCCGC 3'

Inverso 5'GGTGGTACTCGTGGTCACTCT 3'

Stim1: Directo 5'AAGGCTCTGGATACAGTGCTCTT 3'

Inverso 5'AGCATGAAGTCCTTGAGGTGATTAT 3'

Stim2: Directo 5' ACGACACTTCCCAGGATAGCA 3'

30

Inverso 5' GACTCCGGTCACTGATTTTCAAC 3'

Véase, por ejemplo, Peel et.al., Respiratory Research, 7,119, 2006; Gwack et.al., J. Biol. Chem., 282,16232-16243, 2006.

35 Las bandas se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron usando tinción en gel de ADN SYBR safe. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo-II : Ensayo de inhibición de los canales CRAC *in vitro* en la línea celular de cáncer NCI-H460

40 Se determinó la inhibición de los canales CRAC después de la liberación de calcio endoplasmático inducida por taspigargina (Sigma, Cat. n.º T9033) en células NCI-H460 (National Centre For Cell Science (NCCS), Pune).

Para la metodología: Consultar 1B.

45 El compuesto A mostró una inhibición del 100 % a 1 μ M con un valor de CI_{50} de menos de 200 nM. Véase la Figura 2.

Ejemplo III: Ensayo de proliferación celular *in vitro* en línea celular de cáncer NCI-H460 (actividad anticancerosa)

50

El efecto de la proteína CRAC y/o STIM sobre la proliferación y la viabilidad de las células de cáncer de pulmón se

determinó como se indica a continuación.

Para la metodología: Consultar 1C.

- 5 El compuesto A mostró una inhibición del 100 % a 1 μ M con un valor de GI₅₀ de menos de 200 nM (véase la Figura 3).

Ejemplo IV: Efecto del compuesto B sobre la expresión de *Orai* y *Stim* en células NCI-H460

- 10 Las expresiones de *Orai* y *Stim* se midieron usando la metodología descrita en el Ejemplo 1 anterior en células NCI-H460 pero con 1 y 10 μ M del compuesto B.

Los datos mostraron que las células NCI-H460 expresaban *Orai*1, *Orai*3, *Stim*1 y *Stim*2. La expresión de ARNm de *Orai*1, *Stim*1 y *Stim*2 se redujo significativamente después de tratar las células con el Compuesto B como era
15 evidente por PCR cualitativa. Véase la Figura 4.

Ejemplo V: Determinación de citotoxicidad en células NCI-H460

- Se determinó la citotoxicidad de un compuesto de ensayo (Compuesto B) usando un kit de ensayo de lactato
20 deshidrogenasa (Cayman Chemicals, MI) según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones menores. Brevemente, se sembraron 20.000 células/pocillo en medio RPMI-1640 completo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5 %. El compuesto de ensayo se añadió a los pocillos por triplicado a las concentraciones deseadas. La doxorubicina y/o el Triton-X al 1 % se usaron como control positivo. Después de 48 h, los medios se eliminaron y se ensayaron en busca de lactato deshidrogenasa en
25 un ensayo colorimétrico. La densidad óptica se midió en un lector de microplacas (BMG Labtech., Alemania) a 490 nM. Los datos se analizaron usando Graphpad Prism (software Graphpad, San Diego CA).

Los datos indicaron que el Compuesto B no era citotóxico en la línea celular NCI-H460, como se evidencia por niveles indetectables de lactato deshidrogenasa en los medios.

30

Ejemplo VI: Evaluación de la eficacia antitumoral en ratones hembra desnudos Balb/c que portan xenoinjertos de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas NCI-H460

- Se usó un modelo de carcinoma de pulmón de xenoinjerto subcutáneo para evaluar la eficacia antitumoral de los
35 compuestos de ensayo. Se usó taxol como control positivo. El modelo se estableció mediante el trasplante de células NCI-H460 (5×10^6) por vía subcutánea en el costado derecho de cada animal (0,1 ml/ratón). Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente 170 mm³, se seleccionaron 30 ratones desnudos en basándose en el volumen tumoral y se asignaron aleatoriamente a seis animales por grupo de tratamiento. A los animales se les administró por vía oral 30 mg/kg del compuesto de ensayo (Compuesto A) BID durante 15 días.
40 Durante el período de tratamiento, los tumores implantados se midieron con un calibrador tres veces por semana de forma ciega. Los tumores se midieron para determinar el ancho máximo (X) y la longitud (Y) y los volúmenes tumorales (V) se calcularon usando la fórmula: $V = (X^2Y)/2$. Los pesos corporales de los animales también se midieron al mismo tiempo. Los datos se analizaron usando Graphpad Prism (software Graphpad, San Diego CA).

- 45 La administración del compuesto de ensayo dio como resultado una reducción del 32 % en el crecimiento tumoral sin ningún cambio significativo en el peso corporal. Se observó una reducción del 36 % en el crecimiento tumoral con una reducción significativa del peso corporal en animales tratados por administración intravenosa de taxol. Véase la Figura 5.

- 50 **Ejemplo VII: Evaluación de la utilidad de moduladores de canales CRAC en diversos trastornos antiinflamatorios y autoinmunes usando modelos animales *in vivo***

- i. **Hepatitis inducida por Concanavalina (Con) A en ratones hembra Balb/C:** La Con A se usa a menudo
55 para preparar animales experimentales con altos niveles de linfocitos T citotóxicos, debido a que estas células están involucradas en el desarrollo de infecciones virales en serse humanos. En este modelo, a los animales se les administran compuestos de ensayo por vía oral 1 hora antes de la administración intravenosa de Con A. Se recogen muestras de sangre después de 24 horas para determinar la transaminasa glutámico oxaloacética sérica (SGOT) y la transaminasa glutámico pirúvica sérica (SGPT). Se puede estudiar el % de reducción en SGOT y SGPT en suero tras la administración del compuesto de

ensayo.

5 **ii. Hipersensibilidad de contacto inducida por TNCB en ratones hembra Balb/c:** La hipersensibilidad de contacto es un simple ensayo *in vivo* de la función inmune mediada por células. En este procedimiento, la exposición de las células epidérmicas a haptenos exógenos da como resultado una reacción hipersensible de tipo retardado que puede medirse y cuantificarse. Brevemente, se aplica una solución al 7 % de TNCB a la región abdominal de ratones Balb/c de 8 semanas de edad. El grosor de la oreja se mide 7 días después de la sensibilización con TNCB. Los compuestos se administran por vía oral seguido de una aplicación de TNCB al 1 % en el interior y exterior del pabellón auditivo. El espesor de la oreja se mide 24 h después de la exposición a TNCB.

10 Se puede estudiar el % de reducción en la inflamación de la oreja tras la administración del compuesto de ensayo.

15 **iii. Hipersensibilidad de tipo retardado de la almohadilla en ratones macho Balb/c:** Las respuestas de hinchazón a DTH se pueden usar para seguir la actividad de las moléculas inmunosupresoras y/o los linfocitos T supresores *in vivo*. Se administran inyecciones de antígeno intradérmico (BSA metilada) a ratones (en la base de la cola) el día 0 y el día 7. Se administran compuestos una vez al día desde el día 0 al día 10. Se inyecta BSA metilada en la almohadilla de la pata derecha posterior de los animales el día 10. La diferencia de peso inducida por el antígeno se determina pesando las patas traseras derecha e izquierda 24 h después de la inyección de BSA metilada (día 11). Se puede estudiar el % de reducción en la inflamación de la pata inducida por antígeno en ratones.

20 **iv. Asma inducido por OVA en cobayas:** La eosinofilia pulmonar y la remodelación de las vías respiratorias junto con el control neural alterado del tono de las vías respiratorias y la descamación epitelial de las vías respiratorias contribuyen a la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) en el asma. Para la determinación de la reducción de eosinófilos, los animales se sensibilizan con OVA en d0, d7 y d14, seguido de otra ronda (0,1 % p/v) mediante inhalación en d19 y d20. Los compuestos se administran por vía oral 1 h antes de la prueba con OVA (0,3 %). Se recoge BAL líquido en d22 para el recuento diferencial y la estimación de citocinas. Para la determinación del cambio en los parámetros respiratorios, los animales se someten a pletismografía de cuerpo entero inmediatamente después de la exposición a ova. Se puede estudiar el % de reducción en eosinófilos sanguíneos junto con una mejora concurrente en la respiración tras la administración del compuesto de ensayo.

30 **v. Artritis inducida por colágeno en ratones macho DBA/1 Ola HSD:** La artritis inducida por colágeno en modelos de roedores se ha utilizado ampliamente para ilustrar y comprender el desarrollo de la enfermedad además de servir como un sustituto para la validación de dianas terapéuticas para la artritis reumatoide humana. Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se les administraron 150 µl de colágeno bovino de tipo II en inyecciones de adyuvante completo de Freund (día 0 y día 21). El tratamiento se inicia el día 0 del estudio y se continuó una vez al día, todos los días (po, qd). A partir del día 18, las puntuaciones clínicas se dan diariamente para cada una de las patas (delantera derecha, delantera izquierda, trasera derecha, trasera izquierda) y se continúan hasta el día del sacrificio (día 34). Se puede estudiar la administración diaria del compuesto de ensayo para aliviar los síntomas artríticos, la progresión de la enfermedad, y la incidencia en % en comparación con los animales de control.

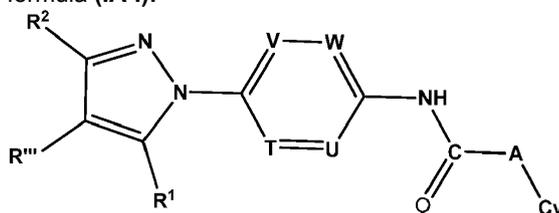
40 Otros modelos *in vivo* en los que se puede analizar el efecto de moduladores de los canales CRAC en diversos trastornos antiinflamatorios y autoinmunes incluyen la **encefalomielitis autoinmune experimental crónica en ratones C57B16J**: La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central y ampliamente utilizada como modelo animal de esclerosis múltiple. A los animales se les administra toxina pertussis por vía intravenosa y glucoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) por vía subcutánea el día 0. El tratamiento se inicia el día 0 y se continúa hasta el sacrificio. El desarrollo de EAE se observa entre el día 9 al día 42. Al final del período de tratamiento, los animales se sacrifican para el análisis histopatológico, así como la estimación de citocinas en plasma.

50 Aunque la invención en el presente documento se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que se pueden realizar numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que se pueden idear otras disposiciones sin apartarse del alcance de la presente invención como se describe en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

55

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (IA-I):



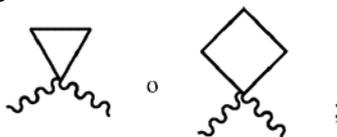
(IA-I)

- 5 o un tautómero, N-óxido, éster farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

R¹ y R² son ambos ciclopropilo o uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo;

- 10 R³ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^a, -COOR^a, -S(=O)_q-R^a, -NR^aR^b, -C(=X)-R^a, grupo alquilo C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, alqueno C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, alquino C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, y cicloalquilo C₍₃₋₅₎ sustituido o sin sustituir; T, U, V y W son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CR^a y N; -CH₂-, -CHMe-,

A está ausente o se selecciona de



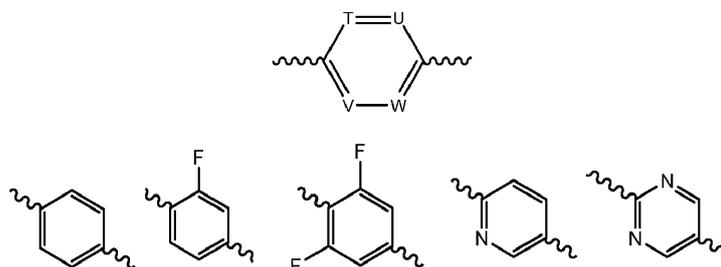
- 15 Cy es un anillo bicíclico seleccionado de un grupo cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir; cada aparición de R^a y R^b es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^c, -S(=O)_q-R^c, -NR^cR^d, -C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-Y-CR^cR^d-, -C(=Y)-NR^cR^d-, -NRR^d-C(=Y)-NR^cR^d-, -S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-NR^cR^d-, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, heterocicilo sustituido o sin sustituir, heterocicilalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando R^a y R^b están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^c y S;
- 20 cada aparición de R^c y R^d puede ser igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicilalquilo sustituido o sin sustituir, o cuando dos sustituyentes R^c y/o R^d están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que son iguales o diferentes y se seleccionan de O, NH y S;
- 30 cada aparición de Y se selecciona de O, S y -NR^a; y cada aparición de q representa independientemente 0, 1 o 2;

con la condición (e) de que el compuesto de fórmula (IA-I) no sea:

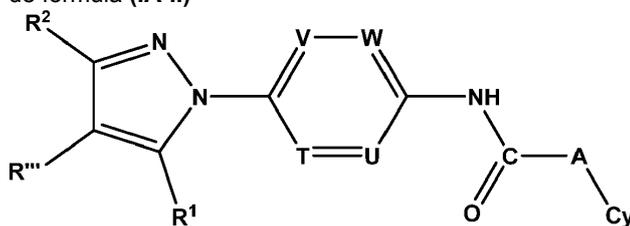
- 40 N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-1-metil-3-(trifluorometil)-1H-tieno[2,3-c]pirazol-5-carboxamida o N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-Pirazolo[1,5-a]pirimidin-2-carboxamida.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

es



- 5 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹ y R² son ambos ciclopropilo.
 4. Un compuesto de fórmula (IA-II)



(IA-II)

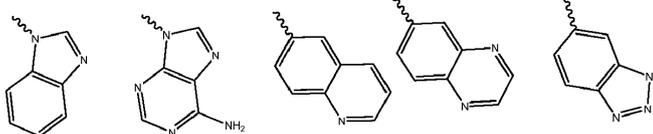
o un tautómero, N-óxido, éster farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la
 10 que

R¹ y R² son ambos ciclopropilo o uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es ciclopropilo;
 R³ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^a, -COOR^a, -S(=O)_q-R^a, -NR^aR^b, -C(=X)-R^a,
 15 grupo alquilo C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, alqueno C₍₁₋₆₎ sustituido o sin sustituir, alquino C₍₁₋₆₎ sustituido
 o sin sustituir, y cicloalquilo C₍₃₋₅₎ sustituido o sin sustituir;
 T, U, V y W son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de CR^a y N;
 A está ausente, es -NH-, o -CH₂-;
 Cy es un heteroarilo C₍₈₋₁₃₎ bicíclico sustituido o sin sustituir;
 cada aparición de R^a y R^b es igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno, nitro,
 20 hidroxilo, ciano, halógeno, -OR^c, -S(=O)_q-R^c, -NR^cR^d, -C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-C(=Y)-R^c, -CR^cR^d-Y-CR^cR^d-, -C(=Y)-
 NR^cR^d-, -NRR^d-C(=Y)-NR^cR^d-, -S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-S(=O)_q-NR^cR^d-, -NR^cR^d-NR^cR^d-, alquilo sustituido o
 sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin
 sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir, heterociclo
 25 sustituido o sin sustituir, heterociclalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo
 sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, o
 cuando R^a y R^b están unidos directamente al mismo átomo, pueden estar unidos para formar un anillo
 saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente uno o
 más heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NR^c y S;
 cada aparición de R^c y R^d puede ser igual o diferente y se selecciona independientemente de hidrógeno,
 30 nitro, hidroxilo, ciano, halógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino
 sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir,
 cicloalqueno sustituido o sin sustituir, grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterociclalquilo
 sustituido o sin sustituir, o cuando dos sustituyentes R^c y/o R^d están unidos directamente al mismo átomo,
 pueden estar unidos para formar un anillo saturado o insaturado sustituido o sin sustituir de 3-10 miembros,
 35 que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos que son iguales o diferentes y se seleccionan de
 O, NH y S;
 Y se selecciona de O, S y -NR^a; y
 cada aparición de q representa independientemente 0, 1 o 2;
 con la condición de que el compuesto de fórmula (IA-II) no incluya

40

N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-1-metil-3-(trifluorometil)-1H-tieno[2,3-
 c]pirazol-5-carboxamida o N-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-Pirazolo[1,5-
 a]pirimidin-2-carboxamida.

5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que tanto R¹ como R² representan ciclopropilo.
6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que uno de R¹ y R² es CF₃ y el otro es independientemente ciclopropilo.
7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que T, U, V, y W son independientemente CH, CF o N.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que A está ausente o es CH₂.
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que A es -CH₂-.
10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que Cy se selecciona de



11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, seleccionado de:
- 20 *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamida
N-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-6-carboxamida
N-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]quinolin-6-carboxamida
N-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]quinoxalin-6-carboxamida
25 2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]acetamida
N-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-2-(1*H*-indol-3-il)acetamida
N-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-2-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)acetamida
N-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)-3-fluorofenil]acetamida
30 *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)-3-fluorofenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida
N-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinolin-6-carboxamida
N-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinoxalin-6-carboxamida
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]acetamida
N-[6-(3,5-diciclopropil-1*H*-pirazol-1-il)piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il)acetamida
35 *N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}quinolin-6-carboxamida
N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}quinoxalin-6-carboxamida
2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}acetamida
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}acetamida
40 2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}acetamida
2-(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}acetamida
(S)-2-(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}propanamida
2-(6-amino-9*H*-purin-9-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}acetamida
45 *N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}-2-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)acetamida
N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)acetamida
N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]fenil}-2-(quinolin-6-il)propanamida
N-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]-3-fluorofenil}-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-6-carboxamida
50 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-{4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]-3-fluorofenil}acetamida
N-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-5-carboxamida
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-16-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il]acetamida
2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}acetamida
N-{6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-il}-2-(quinolin-6-il)acetamida
55 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-{6-[4-cloro-5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]piridin-3-

il)acetamida

4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluoro-*N*-(quinolin-6-ilmetil) benzamida
1-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-3-(quinolin-6-il)urea, o un tautómero, N-óxido, éster
farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5

12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, seleccionado de:

10

clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]quinolin-6-carboxamida;
clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida;
clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)-3-fluorofenil]-2-(quinolin-6-il) acetamida;
Diclorhidrato de *N*-[6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-il]quinolin-6-carboxamida;
clorhidrato de *N*-[4-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)fenil]-2-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il) acetamida;
diclorhidrato de *N*-[6-(3,5-diciclopropil-1H-pirazol-1-il)piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il)acetamida;
clorhidrato de *N*-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-2-(imidazo[1,2-a] piridin-2-
15 il)acetamida;
clorhidrato de *N*-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]quinolin-6-carboxamida;
clorhidrato de *N*-[6-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]piridin-3-il]-2-(quinolin-6-il)acetamida;
clorhidrato de 4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-3-fluoro-*N*-(quinolin-6-ilmetil) benzamida; y
clorhidrato de *N*-[4-[5-ciclopropil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil]-2-(quinolin-6-il)acetamida.

20

13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso para la
modulación de la actividad del canal de calcio dependiente de depósito (SOC) que comprende poner en contacto el
complejo de canal de SOC, o una porción del mismo, con el compuesto.

25

14. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento
de una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiará de la modulación del canal de calcio activado por la
liberación de calcio (CRAC).

15.

15. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento
30 de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, en el que las células de cáncer de pulmón de
células no pequeñas expresan *Orai1*, *Orai3*, *Stim1*, o *Stim2*.

35

17. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en el que dicho compuesto
inhibe CRACM1/*Orai1*, CRACM2/*Orai2*, CRACM3/*Orai3*, o cualquier combinación de los mismos.

18. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el compuesto
inhibe *Stim1*, o *Stim2*, o cualquier combinación de los mismos.

40

19. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no
pequeñas que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, junto con un
vehículo farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1: Expresión de ARNm de *Orai1* y *Stim1* en líneas celulares A549 y NCI-H460. Se usó ARNm Jurkat como control.

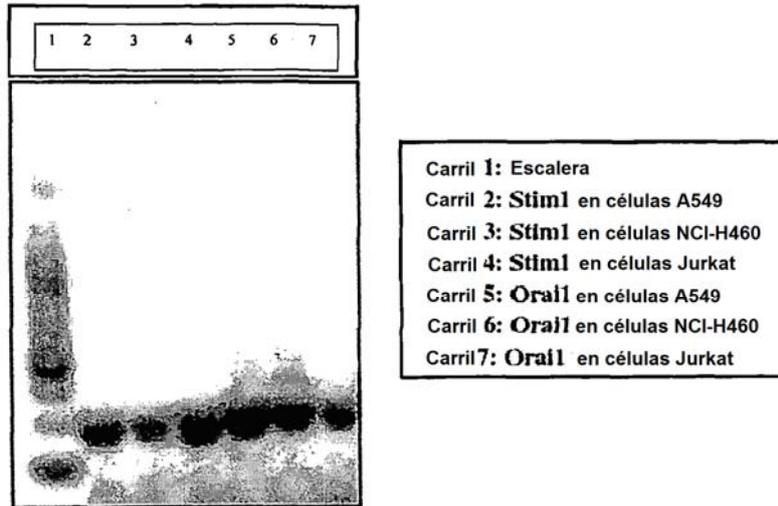


FIG. 2: Inhibición de influxo de calcio inducido por tapsigargina (TG) en células NCI-H460

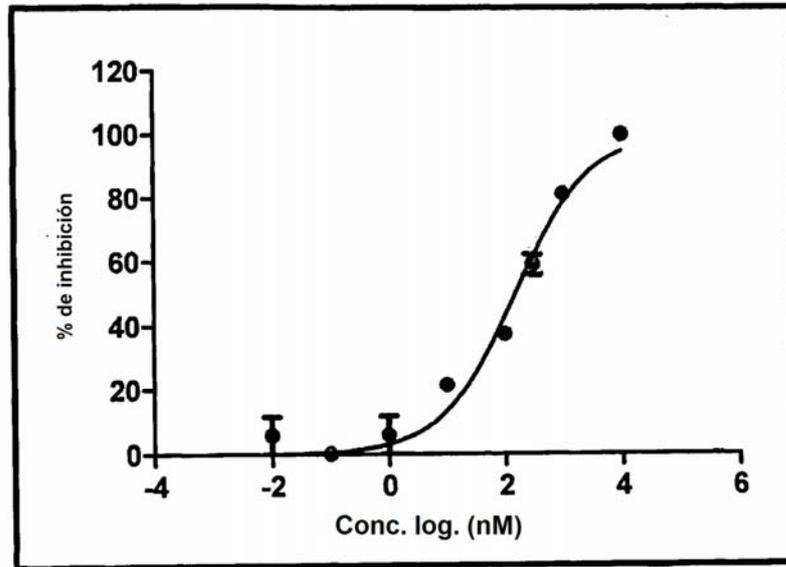


FIG. 3: Inhibición de la proliferación de células NCI-H460 para el Compuesto A

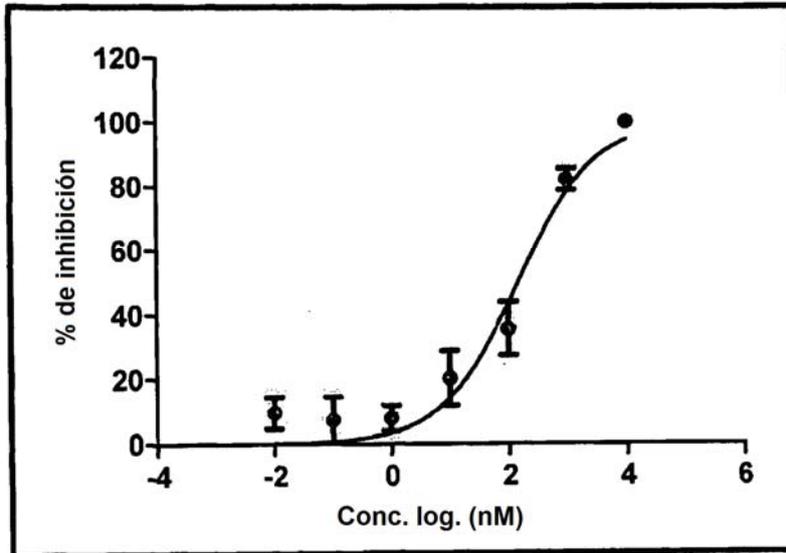


Fig. 4: Efecto del compuesto B sobre la expresión de Orai y STIM en la línea celular NCI-H460

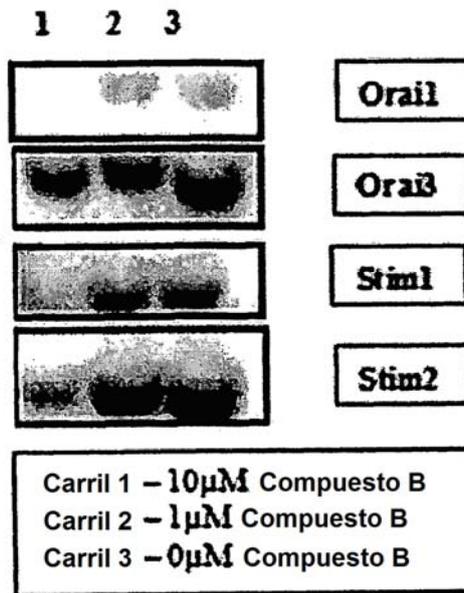


Fig. 5: Inhibición del crecimiento tumoral en ratones desnudos hembra Balb/c portadores de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas NCI-H460.

