

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 691**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2009 E 09781073 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2346864**

54 Título: **Nuevos compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades degenerativas e inflamatorias**

30 Prioridad:

25.07.2008 US 135920

26.06.2009 US 220685

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

07.06.2013

73 Titular/es:

**GALAPAGOS N.V. (100.0%)
Industriepark Mechelen Noord Generaal De
Wittelaan L11 A 3
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**MENET, CHRISTEL JEANNE MARIE y
BLANC, JAVIER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 406 691 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

Nuevos compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades degenerativas e inflamatorias.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos que son inhibidores de JAK, una familia de tirosina quinasas que están involucradas en la modulación de la degradación del cartílago, degeneración de las articulaciones y enfermedades que implican dicha degradación y/o inflamación. La presente invención proporciona también procedimientos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos, procedimientos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas, enfermedades que implican un deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas de cartílago, enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6, enfermedades proliferativas y rechazo de trasplante (por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos), y/o procedimientos para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que implican la degradación del cartílago, la degradación y/o la inflamación de las articulaciones mediante la administración de un compuesto de la invención.

10 Las quinasas Janus (JAK) son tirosina quinasas citoplasmáticas que transducen la señalización de las citoquinas desde los receptores de membrana a factores de transcripción STAT. Se describen cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Tras la unión de la citoquina a su receptor, los miembros de la familia JAK se auto-transfosforilan y/o se fosforilan entre sí, seguido por la fosforilación de STAT que, a continuación, migran al núcleo para modular la transcripción. La transducción de la señal intracelular JAK-STAT sirve a los interferones, la mayoría interleucinas, así como a una diversidad de citoquinas y factores endocrinos, tales como EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTF, GM-CSF, PRL Vainchenker W. et al (2008).

15 La combinación de modelos genéticos y la investigación de inhibidores de JAK de molécula pequeña revelaron el potencial terapéutico de diversas JAKs. La JAK3 es validada por la genética del ratón y del ser humano como un objetivo de inmunosupresión (O'Shea J. et al. (2004)). Los inhibidores de JAK3 fueron incluidos con éxito en el desarrollo clínico, inicialmente para el rechazo de trasplante de órganos, pero más tarde también en otras afecciones inmuno-inflamatorias, tales como la artritis reumatoide (RA), psoriasis y enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

20 TYK2 es un objetivo potencial para las enfermedades inmuno-inflamatorias, siendo validado por la genética humana y estudios knock-out de ratones (Levy D. y C. Loomis (2007)).

25 JAK1 es un nuevo objetivo en el área de las enfermedades inmuno-inflamatorias. JAK1 heterodimeriza con las otras JAKs para transducir la señalización pro-inflamatoria impulsada por citoquinas. Por lo tanto, se espera que la inhibición de JAK1 y/o otras JAKs tenga un beneficio terapéutico para un rango de afecciones inflamatorias, así como para otras enfermedades impulsadas por la transducción de señales mediada por JAK.

Antecedentes de la invención

30 El cartílago es un tejido avascular en el que los condrocitos son el principal componente celular. Los condrocitos en el cartílago articular normal ocupan aproximadamente el 5% del volumen de tejido, mientras que la matriz extra-celular representa el 95% restante del tejido. Los condrocitos secretan los componentes de la matriz, principalmente, proteoglicanos y colágenos, que a su vez suministran a los condrocitos un entorno adecuado para su supervivencia bajo estrés mecánico. En el cartílago, el colágeno de tipo II, junto con la proteína de colágeno de tipo IX, está dispuesto en estructuras sólidas similares a fibrillas que proporcionan al cartílago una gran resistencia mecánica. Los proteoglicanos pueden absorber agua y son responsables de las propiedades elásticas y de absorción de choques del cartílago.

35 Uno de los papeles funcionales de un cartílago en la articulación es permitir que los huesos se articulen suavemente entre sí. La pérdida del cartílago articular, por lo tanto, hace que los huesos se rocen entre sí dando lugar a dolor y pérdida de movilidad. La degradación del cartílago puede tener diversas causas. En las artritis inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, por ejemplo, la degradación del cartílago es causada por la secreción de proteasas (por ejemplo, colagenasas) por los tejidos inflamados (por ejemplo, sinovio inflamado). La degradación del cartílago puede ser también el resultado de una lesión del cartílago, debido a un accidente o cirugía, o una carga o 'desgaste' exagerados. La capacidad del tejido cartilaginoso para regenerarse después de dichas lesiones es limitada. Los condrocitos en un cartílago lesionado muestran, frecuentemente, una menor actividad (anabólica) de síntesis de cartílago y/o una mayor actividad de degradación (catabólica) de cartílago.

40 La degeneración del cartílago es la marca distintiva de diversas enfermedades, entre las cuales la artritis reumatoide y la osteoartritis son las más destacadas. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad degenerativa crónica de las articulaciones, caracterizada por inflamación y destrucción de las estructuras articulares. Cuando la enfermedad no está

- controlada, conduce a una discapacidad y dolor considerables debido a la pérdida de funcionalidad de las articulaciones e incluso a la muerte prematura. El objetivo de una terapia de AR, por lo tanto, no solo es retrasar la enfermedad, sino conseguir la remisión para detener la destrucción de las articulaciones. Además de la gravedad de la evolución de la enfermedad, la alta prevalencia de la AR (~ 0,8% de los adultos están afectados en todo el mundo) significa un alto impacto socio-económico (para revisiones acerca de AR, se hace referencia a Smolen y Steiner (2003), Lee y Weinblatt (2001); Choy y Panayi (2001); O'Dell (2004) y Firestein (2003)).
- La osteoartritis (conocida también como OA o artritis de desgaste y desgarró), es la forma más común de artritis y se caracteriza por la pérdida del cartílago articular, asociada frecuentemente con la hipertrofia del hueso y dolor. La enfermedad afecta principalmente a las manos y a las articulaciones que soportan peso, tales como las rodillas, las caderas y la columna vertebral. Este proceso adelgaza el cartílago. Cuando el área de la superficie ha desaparecido debido al adelgazamiento, se alcanza una osteoartritis de grado I; cuando el área de la superficie tangencial ha desaparecido, se alcanza una osteoartritis de grado II. Hay niveles adicionales de degeneración y destrucción, que afectan a las capas profundas y calcificadas del cartílago que limitan con el hueso subcondral. Para una extensa revisión sobre la osteoartritis, se hace referencia a Wieland et al., 2005.
- Las manifestaciones clínicas del desarrollo de la afección de osteoartritis son: aumento del volumen de la articulación, dolor, crepitación y discapacidad funcional que conducen al dolor y a una movilidad reducida de las articulaciones. Cuando la enfermedad se desarrolla adicionalmente, hace aparición el dolor en reposo. Si la afección persiste sin corrección y/o terapia, la articulación se destruye, conduciendo a la discapacidad. Entonces, se requiere cirugía de reemplazo con prótesis total.
- Se han desarrollado procedimientos terapéuticos para la corrección de las lesiones del cartílago articular que aparecen durante la enfermedad artrósica, pero hasta ahora ninguno de los mismos ha sido capaz de mediar en la regeneración del cartílago articular *in situ* e *in vivo*.
- La osteoartritis es difícil de tratar. En la actualidad, no hay disponible ninguna cura y el tratamiento se centra en aliviar el dolor y prevenir que la articulación afectada se deforme. Los tratamientos comunes incluyen el uso de fármacos anti-inflamatorios, no-esteroides (NSAIDs). Aunque se han recomendado suplementos dietéticos, tales como la condroitina y sulfato de glucosamina, como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la osteoartritis, un ensayo clínico reciente reveló que ninguno de los dos tratamientos redujo el dolor asociado a la osteoartritis. (Clegg et al., 2006). En conjunto, no hay disponibles fármacos para osteoartritis modificadores de la enfermedad.
- En casos graves, puede necesitarse un reemplazo de la articulación. Esto es especialmente cierto para las caderas y las rodillas. Si una articulación es extremadamente dolorosa y no puede ser reemplazada, puede ser fusionada. Este procedimiento detiene el dolor, pero resulta en la pérdida permanente de la función articular, lo que hace difícil caminar e inclinarse.
- Otro posible tratamiento es el trasplante de condrocitos autólogos cultivados. Aquí, el material celular condral se toma del paciente, se envía a un laboratorio, donde es expandido. A continuación, el material es implantado en los tejidos dañados para cubrir defectos del tejido.
- Otro tratamiento incluye la instilación intra-articular de Hylan GF 20 (por ejemplo, Synvisc®, Hyalgan®, Artz®), una sustancia que mejora temporalmente la reología del fluido sinovial, produciendo una sensación casi inmediata de movimiento libre y una marcada reducción del dolor.
- Otros procedimientos indicados incluyen la aplicación de injertos tendinosos, de periostio, fasciales, musculares o pericondrales; implantación de fibrina o condrocitos cultivados; implantación de matrices sintéticas, tales como colágeno, fibra de carbono; administración de campos electromagnéticos. Se ha informado de que todos estos tienen efectos mínimos e incompletos, lo que resulta en un tejido de baja calidad que no puede soportar la carga ponderada ni permite la restauración de una función articular con un movimiento normal.
- La estimulación de los procesos anabólicos, el bloqueo de los procesos catabólicos, o una combinación de ambos, puede resultar en la estabilización del cartílago, y tal vez incluso en la reversión del daño y, por lo tanto, puede prevenir la progresión adicional de la enfermedad. Diversos desencadenantes pueden estimular la estimulación anabólica de condrocitos. El factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I) es el factor de crecimiento anabólico predominante en el fluido sinovial y estimula la síntesis de proteoglicanos y colágeno. También se ha demostrado que los miembros de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), particularmente, BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7, y los miembros de la familia de factor de crecimiento transformante humano β (TGF- β) pueden inducir la estimulación anabólica de condrocitos (Chubinskaya y Kuettnner, 2003). Recientemente, se ha identificado un compuesto que induce la estimulación anabólica de condrocitos (US 6.500.854, EP 1 391 211). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos exhiben efectos secundarios graves y, en consecuencia, hay una fuerte necesidad de compuestos que estimulen la diferenciación de los condrocitos sin estos efectos secundarios.

Vandeghinste et al. (WO 2005/124342) descubrió JAK1 como un objetivo cuya inhibición podría tener relevancia terapéutica para diversas enfermedades, incluyendo OA. JAK1 pertenece a la familia de quinasas Janus (JAK) de las tirosina quinasas citoplasmáticas, implicadas en la transducción de señal intracelular mediada por receptores de citoquinas. La familia JAK comprende 4 miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Las JAKs son reclutadas a los receptores de citoquinas, tras la unión de la citoquina, seguido por heterodimerización del receptor de citoquina y una subunidad de receptor compartida (cadena gamma-c común, gp130). A continuación, las JAKs se activan mediante auto- y/o transfosforilación por otra JAK, resultando en la fosforilación de los receptores y el reclutamiento y la fosforilación de miembros del transductor de señal y activador de transcripción (STATs). Los STATs fosforilados dimerizan y se translocan al núcleo donde se unen a regiones potenciadoras de genes sensibles a citoquinas. El Knockout del gen JAK1 en ratones demostró que JAK1 desempeña papeles esenciales y no redundantes durante el desarrollo: los ratones -/- JAK1 murieron dentro de las 24 horas después del nacimiento y el desarrollo de linfocitos se vio gravemente afectado. Además, las células -/- JAK1 no eran reactivas, o eran menos reactivas, a las citoquinas que usan receptores de citoquinas de clase II, receptores de citoquinas que usan la subunidad gamma-c para la señalización y la familia de receptores de citoquinas que usan la subunidad gp130 para la señalización (Rodig et al., 1998).

Diversos grupos han relacionado la señalización JAK-STAT con la biología de los condrocitos. Li et al (2001) demostraron que la oncostatina M induce la expresión de los genes MMP y TIMP3 en condrocitos primarios mediante la activación de las vías de señalización JAK/STAT y MAPK. Osaki et al. (2003) mostraron que la inhibición de colágeno II mediada por interferón-gamma en los condrocitos implica la señalización JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo del cartílago reduciendo la expresión de componentes de la matriz, e induciendo la expresión de las colagenasas y óxido nítrico sintasa inducible (NOS2), que media la producción de óxido nítrico (NO). Otero et al., (2005) mostraron que la leptina e IL1-beta indujeron sinérgicamente la producción o la expresión de mRNA NOS2 en condrocitos, y que las mismas eran bloqueadas por un inhibidor de JAK. Legendre et al. (2003) mostraron que IL6/receptor IL6 indujo una regulación a la baja de genes específicos de matriz de cartílago colágeno II, , núcleo de aggrecan y proteína de unión en condrocitos articulares bovinos, y que esto estaba mediado por la señalización JAK/STAT. Por lo tanto, estas observaciones sugieren un papel para la actividad de la quinasa JAK en la homeostasis del cartílago y oportunidades terapéuticas para los inhibidores de la quinasa JAK.

Los miembros de la familia JAK se han relacionado con afecciones adicionales, incluyendo trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan et al, 2007, Mol Immunol. 44 (10): 2497-506), donde se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, particularmente JAK2, pueden ser útiles también en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Además, la familia JAK, particularmente JAK1, JAK2 y JAK3, se ha relacionado con cánceres, particularmente leucemias, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (O'Sullivan et al, 2007, Mol Immunol. 44 (10) :2497-506; Xiang et al, 2008, "Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia" Blood First Edition Paper, prepublicado en línea el 26 de Diciembre de 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) y leucemia aguda linfoblástica (Mullighan et al, 2009) o tumores sólidos, por ejemplo, leiomioma uterino (Constantinescu et al, 2007, Trends in Biochemical Sciences 33 (3): 122-131), cáncer de próstata (Tam et al, 2007, British Journal of Cancer, 97, 378-383). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, particularmente de JAK1 y/o JAK2, pueden tener utilidad también en el tratamiento de cánceres (leucemias y tumores sólidos, por ejemplo, leiomioma uterino, cáncer de próstata).

Además, la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, glomerulonefritis proliferativa mesangial, psoriasis y sarcoma de Kaposi son probablemente debidos a una hipersecreción de la citoquina IL-6, cuyos efectos biológicos están mediados por la señalización JAK-STAT intracelular (Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto y Tadimitsu Kishimoto, Arthritis Res. 2002, 4 (Suppl 3): S233-S242). Este resultado muestra que el inhibidor de JAK, puede encontrar también utilidad en el tratamiento de dichas enfermedades

Se ha establecido una relación con enfermedades autoinmunes para JAK3 y Tyk2. Las mutaciones en JAK3 pero también en los componentes de señalización aguas arriba de la cadena gamma-c del receptor y el receptor IL7 representan, en conjunto, ~70% de los casos de inmunodeficiencia grave humana combinada (O'Shea et al, 2004). Obsérvese que JAK1 coopera con JAK3 en la transducción de señales desde la cadena gamma-c del receptor. Se observan polimorfismos TYK2 en el lupus eritematoso sistémico (SLE) (O'Sullivan et al, 2007, Mol Immunol. 44 (10): 2497-506). Por lo tanto, la fijación de la familia JAK como objetivo puede proporcionar una oportunidad terapéutica en el área de la inmunoinflamación.

Las terapias actuales no son satisfactorias y, por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de identificar compuestos adicionales que puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo, osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a una insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican un deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplante (por ejemplo rechazo del

trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar también aplicación en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomiocarcinoma uterino, cáncer de próstata). Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos, procedimientos para su fabricación y una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención junto con un vehículo farmacéutico adecuado. La presente invención permite también el uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades articulares degenerativas.

El documento WO 2008/025821 divulga [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridinas sustituidas como inhibidores de proteína quinasa para el tratamiento de trastornos inmunológicos, inflamatorios, alérgicos u otros trastornos.

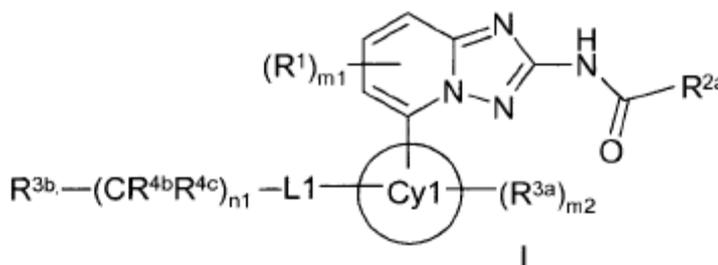
El documento WO 2007/009773 divulga pirazolo[1,5-a]pirimidinas sustituidas como inhibidores de proteína quinasa.

El documento US 2005/222171 divulga pirazolo[1,5-a]pirimidinas sustituidas como inhibidores de proteína quinasa.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los inhibidores de JAK son útiles para el tratamiento de enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo, osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias e inmunes, tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplante (por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar también aplicación en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomiocarcinoma uterino, cáncer de próstata). La presente invención proporciona también procedimientos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y procedimientos para el tratamiento de enfermedades que implican la degradación del cartílago, la degradación de las articulaciones y/o la inflamación mediante la administración de un compuesto de la invención.

Los inhibidores de JAK incluyen compuestos 1,2,4-triazolo[1,5-a] piridina de Fórmula (I):



en la que

Cy1 está seleccionado entre arilo y heteroarilo;

L1 está seleccionado entre un enlace simple, -O-, -C(O)-, -C[=N(R^{4a})]-, -N(R^{4a})-, -CON(R^{4a})-, -SO₂N(R^{4a})-, -S(O)₂-, -N(R^{4a})CO- o -N(R^{4a})SO₂-;

cada R¹ se selecciona independientemente de entre alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, acilamino sustituido o no sustituido, alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido, amido sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, sulfonilo sustituido, sulfonilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o no sustituido, ácido sulfónico, éster de ácido sulfónico, carboxi, ciano, cicloalquilo C₃-C₇ sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo de 4 a 7 miembros, sustituido o no sustituido, halo e hidroxilo;

cada R^{3a} se selecciona independientemente de entre alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, acilamino sustituido o no sustituido, alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido, amido sustituido o no sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, amino sustituido o no sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo sulfanilo sustituido, sulfanilo sustituido, sulfonilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o no sustituido, ácido sulfónico, éster de ácido sulfónico, azido, carboxi, ciano, cicloalquilo C₃-C₇ sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo de 4-7 miembros sustituido o no sustituido, halo, heteroarilo sustituido o no sustituido, hidroxilo, nitro y tiol;

R^{2a} está seleccionado entre alquilo C₁.C₆ sustituido o no sustituido o cicloalquilo C₃.C₇ sustituido o no sustituido;

R^{3b} se selecciona independientemente de entre arilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃.C₇ sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo de 4-7 miembros sustituido o no sustituido, heteroarilo de 5-10 miembros sustituido o no sustituido; o R^{3b} se selecciona independientemente de entre O-R^{3c}, CO-R^{3c} y CON(R^{4a})-R^{3c}; y R^{3c} se selecciona independientemente de entre arilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃.C₇ sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo de 4-7 miembros sustituido o no sustituido, heteroarilo 5 a 10 miembros sustituido o no sustituido;

cada R^{4a}, R^{4b} y R^{4c} se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁.C₆, alquilo C₁.C₆ sustituido, cicloalquilo C₃.C₇ o cicloalquilo C₃.C₇ sustituido;

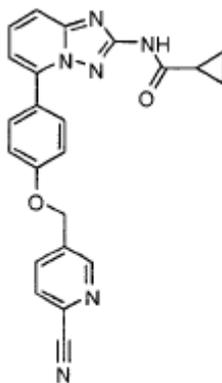
m1 es 0, 1 ó 2; m2 es 0, 1, 2 ó 3, y n1 es 0, 1, 2, 3 ó 4;

con la condición de que

cuando L1 es -O-, -N(R^{4a})-, -CON(R^{4a})- o -SO₂N(R^{4a})- y R^{3b} es diferente de cicloalquilo, arilo o heteroarilo de 5-10 miembros, entonces n1 es 1, 2, 3 ó 4;

o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, o solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables.

Según la invención, se proporciona un compuesto según la fórmula VIa:



VIa

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico. En este aspecto de la invención, la composición farmacéutica puede comprender uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria. Además, los compuestos de la presente invención útiles en las composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento divulgados en la presente memoria, son todos ellos farmacéuticamente aceptables como se preparan y se usan.

Los compuestos de la invención son útiles en un procedimiento de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece una afección de entre las indicadas en la presente memoria, y, particularmente, dicha afección puede estar asociada con una actividad JAK aberrante, por ejemplo, enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplantes (por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar también aplicación en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomiomas uterino, cáncer de próstata). Particularmente, los compuestos de la presente invención son útiles en un procedimiento para tratar afecciones seleccionadas de entre inflamación, tales como artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), estados de

enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), y rechazo de trasplante de órganos, y degradación o degeneración de cartílago, hueso y/o articulación, tales como osteoartritis, cuyo procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria.

Los compuestos de la presente invención son útiles en un procedimiento para tratar un mamífero susceptible de padecer o que padece trastornos proliferativos, particularmente cáncer, (por ejemplo, tumores sólidos), leucemias, mieloma múltiple o psoriasis, cuyo procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de una o más composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o prevención de una afección seleccionada entre las indicadas en la presente memoria, particularmente dichas afecciones pueden estar asociadas con una actividad JAK aberrante, tales como enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, tales como la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplante (por ejemplo rechazo de trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar también aplicación en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomiomas uterino, cáncer de próstata). En una realización específica, la afección está seleccionada entre inflamación, como artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), y rechazo de trasplante de órganos, y degradación o degeneración de cartílago, hueso y/o articulación, tales como osteoartritis.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos proliferativos, particularmente cáncer (por ejemplo, tumores sólidos), leucemias, mieloma múltiple o psoriasis.

En otro procedimiento más del aspecto de tratamiento, se divulga un procedimiento de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece una afección que está causalmente relacionada con una actividad JAK anormal, como se describe en la presente memoria, y comprende la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de una afección o la prevención de una afección de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento o la prevención de una afección que está causalmente relacionada con una actividad JAK anormal.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar un compuesto de Fórmula VIa, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con protocolos y vías de síntesis representativos divulgados más adelante o en la presente memoria.

En consecuencia, un objeto principal de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos, que pueden modificar la actividad JAK y prevenir o tratar, de esta manera, cualquier enfermedades que pueda estar causalmente relacionada con la misma.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar compuestos que puedan tratar o aliviar enfermedades o sus síntomas, tales como la degradación de cartílago y/o hueso y la inflamación relacionada, y enfermedades de las articulaciones, que pueden estar causalmente relacionadas con la actividad de JAK.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que puedan ser usadas en el tratamiento o prevención de una diversidad de estados de enfermedad, incluyendo las enfermedades asociadas con la actividad JAK, tales como enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo, osteoartritis, y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática

juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxina (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardiaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplantes (por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar también aplicación en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomiomas uterino, cáncer de próstata). En una realización específica, la afección está seleccionada entre inflamación, como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxina (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardiaca crónica), y rechazo de trasplante de órganos, y degradación o degeneración de de cartílago, hueso y/o articulación, tales como osteoartritis o cánceres (por ejemplo tumores sólidos o leucemias).

Otros objetos y ventajas serán evidentes para las personas con conocimientos en la materia a partir de una consideración de la descripción detallada siguiente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos y expresiones siguientes se pretende que tengan los significados presentados a continuación y son útiles para la comprensión de la descripción y el alcance deseado de la presente invención.

Al describir la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y procedimientos de uso de dichos compuestos y composiciones, los términos siguientes, si están presentes, tienen los significados siguientes, a menos que se indique lo contrario. Los artículos "un" y "una" pueden ser usados en la presente memoria para hacer referencia a uno o más objetos gramaticales (es decir, al menos uno) del artículo. A modo de ejemplo, "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

"Acilo" se refiere a un radical $-C(O)R^{20}$, en la que R^{20} es hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquilmetilo C_3-C_{10} , heterocicloalquilo de 4-10 miembros, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, formilo, acetilo, ciclohexilcarbonilo, ciclohexilmetilcarbonilo, benzoilo y bencilcarbonilo. Los grupos "acilo" ejemplares son $-C(O)H$, $-C(O)$ -alquilo C_1-C_8 , $-C(O)-(CH_2)_t$ (arilo C_6-C_{10}), $-C(O)-(CH_2)_t$ (heteroarilo de 5-10 miembros), $-C(O)-(CH_2)_t$ (cicloalquilo C_3-C_{10}) y $-C(O)-(CH_2)_t$ (heterocicloalquilo de 4-10 miembros), en las que t es un número entero de 0 a 4. "Alcoxycarbonilo" se refiere a un radical $-C(O)OR^{27}$, en la que R^{27} representa un alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquilalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquilalquilo de 4-10 miembros, aralquilo o heteroarilalquilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Los grupos "alcoxycarbonilo" ejemplares son $C(O)O$ -alquilo C_1-C_8 , $-C(O)O-(CH_2)_t$ (arilo C_6-C_{10}), $-C(O)O-(CH_2)_t$ (heteroarilo de 5-10 miembros), $-C(O)O-(CH_2)_t$ (cicloalquilo C_3-C_{10}) y $-C(O)O-(CH_2)_t$ (heterocicloalquilo de 4-10 miembros), en las que t es un número entero de 1 a 4.

"Alquilo" significa hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono. Particularmente, alquilo tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Más particularmente, es un alquilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Un grupo particular adicional tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos de cadena lineal ejemplares incluyen metilo, etilo n-propilo y n-butilo. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior, como metilo, etilo, propilo o butilo, están unidos a una cadena alquilo lineal; los grupos de cadena ramificada ejemplares incluyen isopropilo, iso-butilo, t-butilo e isoamilo.

"Amino" se refiere al radical $-NH_2$.

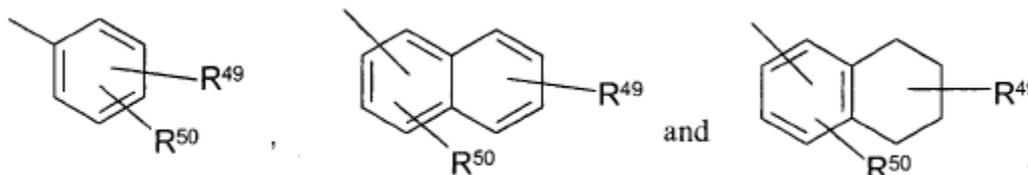
"Aralquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, sustituido con uno o más grupos arilo, como se ha definido anteriormente. Los grupos aralquilo o arilalquilo particulares son grupos alquilo sustituidos con un grupo arilo.

"Ariilo" se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monovalente derivado por eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Particularmente, arilo se refiere a una estructura anillo aromático, mono-cíclico o poli-cíclico que incluye 5 a 12 miembros en el anillo, más normalmente, de 6 a 10. Cuando el grupo arilo es un sistema anillo monocíclico, contiene, preferentemente, 6 átomos de carbono. Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno y trinaftaleno. Particularmente, los grupos

arilo incluyen fenilo, naftilo, indenilo y tetrahidronaftilo.

"Ariilo sustituido" se refiere a un grupo ariilo sustituido con uno o más de los grupos indicados en la definición de "sustituido" en la presente memoria y, particularmente, se refiere a un grupo ariilo que puede estar opcionalmente sustituido con 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, particularmente de 1 a 3 sustituyentes, particularmente 1 sustituyente. Particularmente, "arilo sustituido" se refiere a un grupo ariilo sustituido con uno o más de los grupos seleccionados de entre halo, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, haloalcoxi C₁-C₈, ciano, hidroxilo, alcoxi C₁-C₈ y amino.

Los ejemplos de arilos sustituidos representativos incluyen los siguientes



En estas Fórmulas, uno de entre R⁴⁹ y R⁵⁰ puede ser hidrógeno y al menos uno de entre R⁴⁹ y R⁵⁰ está seleccionado cada uno, independientemente, entre alquilo C₁-C₈, heterocicloalquilo de 4-10 miembros, alcanilo, alcoxi C₁-C₈, hetero-O-arilo, alquilamino, arilamino, heteroarilamino, NR⁵¹COR⁵², NR⁵¹SOR⁵²NR⁵¹SO₂R⁵², COOalquilo, COOarilo, CONR⁵¹R⁵², CONR⁵¹O⁵², NR⁵¹R⁵², SO₂NR⁵¹R⁵², S-alquilo, SOalquilo, SO₂alquilo, Sarilo, SOarilo, SO₂arilo; o R⁴⁹ y R⁵⁰ pueden estar unidos para formar un anillo cíclico (saturado o insaturado) de 5 a 8 átomos, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de entre el grupo N, O o S. R⁵¹ y R⁵² son, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo de 4-10 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo sustituido, heteroarilo de 5-10 miembros.

"Cicloalquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo cíclicos no aromáticos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de un único anillo, como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

"Ciano" se refiere al radical -CN.

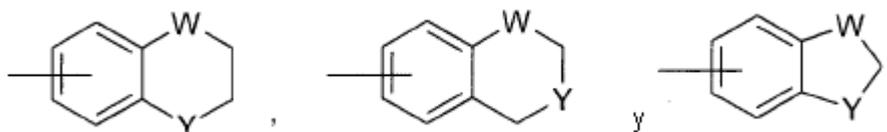
"Halo" o "halógeno" se refiere a flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) y yodo (I). Los grupos halo particulares son flúor o cloro.

"Hetero", cuando se usa para describir un compuesto o un grupo presente en un compuesto, significa que uno o más átomos de carbono en el compuesto o grupo han sido reemplazados por un átomo de nitrógeno, oxígeno, azufre o un heteroátomo. Hetero puede aplicarse a cualquiera de los grupos hidrocarbilo descritos anteriormente, como alquilo, por ejemplo heteroalquilo, cicloalquilo, por ejemplo heterocicloalquilo, arilo, por ejemplo heteroarilo, cicloalqueno, por ejemplo, cicloheteroalqueno, y similares, que tienen de 1 a 5 y, particularmente, 1-3 heteroátomos.

"Heteroarilo" significa una estructura anillo aromático, mono-cíclica o policíclica, que incluye uno o más heteroátomos y de 5 a 12 miembros de anillo, más normalmente de 5 a 10 miembros de anillo. El grupo heteroarilo puede ser, por ejemplo, un anillo monocíclico de cinco miembros o de seis miembros o una estructura bicíclica formada por anillos de cinco y seis miembros condensados o dos anillos de seis miembros condensados o, a modo de ejemplo adicional, dos anillos de cinco miembros condensados. Cada anillo puede contener hasta cuatro heteroátomos seleccionados, típicamente, de entre nitrógeno, azufre y oxígeno. Típicamente, el anillo heteroarilo contendrá hasta 4 heteroátomos, más típicamente, hasta 3 heteroátomos, más normalmente, hasta 2, por ejemplo un único heteroátomo. En una realización, el anillo heteroarilo contiene al menos un átomo de nitrógeno en el anillo. Los átomos de nitrógeno en los anillos heteroarilo pueden ser básicos, como en el caso de un imidazol o piridina, o esencialmente no básico, como en el caso de un indol o de nitrógeno del pirrol. En general, el número de átomos de nitrógeno básicos presentes en el grupo heteroarilo, incluyendo cualquier sustituyente de grupo amino del anillo, será inferior a cinco. Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de cinco miembros incluyen, pero no se limitan, a grupos pirrol, furano, tiofeno, imidazol, furazano, oxazol, oxadiazol, oxatriazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, pirazol, triazol y tetrazol. Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de seis miembros incluyen, pero sin limitación, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina y triazina. Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen un anillo de cinco miembros condensado a otro anillo de cinco miembros incluyen, pero sin limitación imidazotiazol e imidazoimidazol. Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen un anillo de seis miembros condensado a un anillo de cinco miembros incluyen, pero no se limitan, a grupos benzofuran, benzotiofeno, bencimidazol, benzoxazol, isobenzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, bencisotiazol, isobenzofurano, indol, isoindol, isoindolona, indolizina, indolina, isoindolina, purina (por ejemplo, adenina, guanina), indazol, pirazolopirimidina, triazolopirimidina, benzodioxol y pirazolopiridina. Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen dos anillos de seis miembros condensados incluyen, pero no se limitan, a grupos quinolina, isoquinolina, cromano, tiocromano, cromeno, isocromeno, cromano, isocromano, benzodioxano, quinolizina, benzoxazina, benzodiazina, piridopiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, ftalazina, naftiridina y pteridina. Los grupos heteroarilo particulares son aquellos derivados de tiofeno, pirrol, benzotiofeno, benzofurano, indol, piridina, quinolina,

imidazol, oxazol y pirazina.

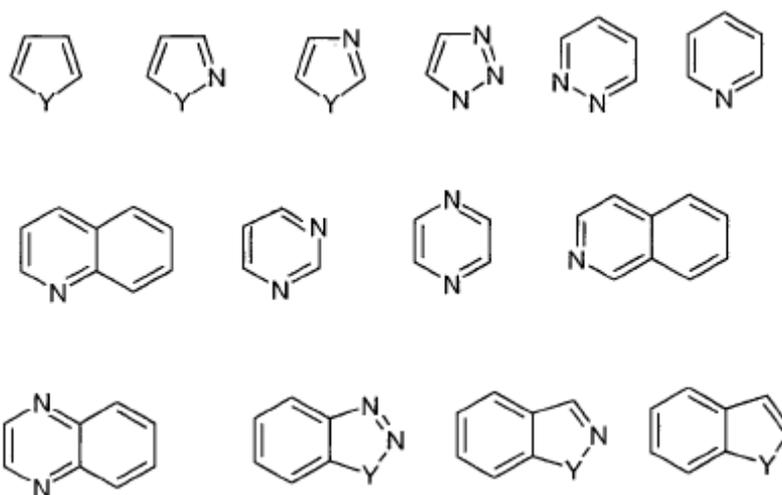
Los ejemplos de arilos representativos que tienen heteroátomos que contienen sustitución incluyen los siguientes:



en las que cada W está seleccionado entre $C(R^{54})_2$, NR^{54} , O y S; y cada Y está seleccionado entre carbonilo, NR^{54} , O y S; y R^{54} es independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquilo de 4-10 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5-10 miembros.

5

Los ejemplos de heteroarilos representativos incluyen los siguientes:

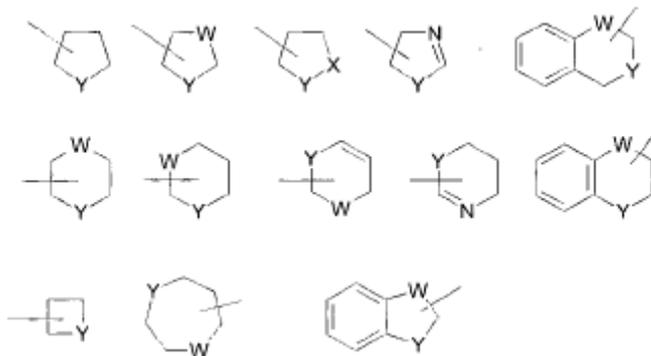


en el que cada Y está seleccionado entre carbonilo, N, NR^{55} , O y S, y R^{55} es independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquilo de 4-10 miembros, arilo C_6-C_{10} , y heteroarilo de 5-10 miembros.

10

Como se usa en la presente memoria, el término "heterocicloalquilo" se refiere a un anillo heterocíclico, no aromático, estable, de 4-10 miembros, y/o incluye anillos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de entre N, O y S, condensados al mismo. Un sistema anillo heterocíclico condensado puede incluir anillos carbocíclicos y sólo necesita incluir un anillo heterocíclico. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, morfolina, piperidina (por ejemplo 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo y 4-piperidinilo), pirrolidina (por ejemplo 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo y 3-pirrolidinilo), pirrolidona, pirano (2H-pirano o 4H-pirano), dihidrotiofeno, dihidropirano, dihidrofurano, dihidrotiazol, tetrahydrofurano, tetrahydrotiofeno, dioxano, tetrahydropirano (por ejemplo 4-tetrahydro piranilo), imidazolona, imidazolidinona, oxazolona, tiazolona, 2-pirazolona, pirazolidina, piperazina y N-alquilo piperazinas, como N-metil piperazina. Otros ejemplos incluyen tiomorfolina y su S-óxido y S,S-dióxido (particularmente tiomorfolina). Otros ejemplos adicionales incluyen azetidina, piperidona, piperazona y N-alquil-piperidinas, como N-metil-piperidina. Los ejemplos particulares de grupos heterocicloalquilo se muestran en los ejemplos ilustrativos siguientes:

15



en los que cada W está seleccionado entre CR^{56} , $C(R^{56})_2$, NR^{56} , O y S; y cada Y está seleccionado entre NR^{56} , O y S; y R^{56} es, independientemente, hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquilo de 4-10 miembros, arilo C_6-C_{10} , heteroarilo de 5-10 miembros. Estos anillos heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi (-O-acilo o $-OC(O)R^{20}$), alcoxi, alcocarbonilo, alcocarbonilamino ($-NR''$ -alcocarbonilo o $-NH-C(O)-OR^{27}$), amino, amino sustituido, aminocarbonilo (amido o $C-(O)-NR''_2$), aminocarbonilamino ($-NR''-C(O)-NR''_2$), aminocarboniloxi ($-O-C(O)-NR''_2$), aminosulfonilo, sulfonilamino, arilo, -O-arilo, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, halógeno, hidroxilo, nitro, tiol, -S-alquilo, -S-arilo, -S(O)-alquilo, -S(O)-arilo, $-S(O)_2$ -alquilo y $-S(O)_2$ -arilo. Los grupos sustituyentes incluyen carbonilo o tiocarbonilo que proporcionan, por ejemplo, lactama y derivados de urea.

5

10 Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica de síntesis orgánica reconocerá que el número máximo de heteroátomos en un anillo heterocíclico estable, químicamente factible, aromático o no aromático, viene determinado por el tamaño del anillo, el grado de insaturación y la valencia de los heteroátomos. En general, un anillo heterocíclico puede tener de uno a cuatro heteroátomos, siempre que el anillo heteroaromático sea químicamente factible y estable.

15

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o la agencia correspondiente en países distintos a los Estados Unidos, o que aparece en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

20

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Particularmente, dichas sales son no tóxicas, pueden ser sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos y sales de adición de base. Específicamente, dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos, como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido benenosulfónico, ácido 4-clorobenenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Las sales incluyen además, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares; y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos no tóxicos, orgánicos o inorgánicos, como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. La expresión "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a un contra-ión catiónico aceptable de un grupo ácido funcional. Dichos cationes son ejemplificados por cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares.

30

35

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto de la invención.

40

El término "profármacos" se refiere a compuestos, incluyendo derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos escindibles y se convierten por solvolisis o en condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos in vivo. Dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, derivados de éster de colina y similares, ésteres de N-alquilmorfolina y similares.

5 El término "solvato" se refiere a las formas del compuesto que están asociadas con un disolvente, normalmente por una reacción de solvolisis. Esta asociación física incluye enlaces de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, etanol, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención pueden prepararse, por ejemplo, en forma cristalina y pueden ser solvatados o hidratados. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, como hidratos, e incluyen además tanto solvatos estequiométricos como solvatos no estequiométricos. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo, cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" abarca solvatos en fase de solución y aislables. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

10 El término "sujeto" incluye seres humanos. Las expresiones 'ser humano', "paciente" y "sujeto" se usan, de manera intercambiable, en la presente memoria.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

15 Los términos "prevenir" o "prevención" se refieren a una reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, causar que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes de la aparición de la enfermedad).

20 El término "profilaxis" se refiere a la "prevención", y se refiere a una medida o un procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitativos de las medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas, la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes de hospital con riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a la inmovilización; y la administración de un agente anti-malaria, como cloroquina, antes de una visita a una región geográfica donde la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

25 En una realización, los términos "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refieren a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, detener la enfermedad o reducir la manifestación, el grado o la severidad de al menos uno de sus síntomas clínicos). En otra forma de realización "tratar" o "tratamiento" se refieren a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En todavía otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refieren a modular la enfermedad o trastorno, bien físicamente, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), bien fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una realización adicional, "tratar" o "tratamiento" se refieren a ralentizar la progresión de la enfermedad.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "afección o afecciones que implican inflamación" se refieren al grupo de afecciones que incluye artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica) y enfermedades relacionadas que implican el cartilago, como la de las articulaciones. Particularmente, la expresión se refiere a artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias del intestino.

35 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "afección o afecciones que implican una respuesta inmune" o "enfermedades autoinmunes" se usan, de manera intercambiable, y se refieren al grupo de enfermedades que incluye la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, incluyendo afecciones como COPD, asma (por ejemplo asma intrínseca, asma extrínseca, asma por polvo, asma infantil) particularmente asma crónica o inveterada (por ejemplo asma tardía e hiperreactividad de las vías respiratorias), bronquitis, incluyendo asma bronquial, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I y complicaciones asociadas con la misma, eccema atópico (dermatitis atópica), dermatitis de contacto y además dermatitis eccematosas, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. Particularmente, el término se refiere a COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria del intestino.

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "rechazo de trasplante" hace referencia al rechazo agudo o crónico de alo- o xenoinjertos de células, tejidos u órganos sólidos, por ejemplo, islotes pancreáticos, células madre, médula ósea, piel, músculo, tejido corneal, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago, o enfermedades de injerto contra huésped.

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades proliferativas" se refiere a afecciones como el cáncer (por ejemplo, leiomiomas uterino o cáncer de próstata), trastornos mieloproliferativos, (por ejemplo, policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis), leucemia (por ejemplo leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda), mieloma múltiple, psoriasis, reestenosis, esclerodermis o fibrosis. Particularmente, la expresión se

refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a un crecimiento maligno o benigno de células en la piel o en órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, de mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Un cáncer tiende a infiltrarse en el tejido contiguo y propagarse (metastatizar) a órganos distantes, por ejemplo,
 10 al hueso, hígado, pulmón o cerebro. Como se usa en la presente memoria, el término cáncer incluye ambos tipos de células tumorales metastásicas, como, pero sin limitación, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y mastocitoma y tipos de carcinoma de tejido, como, pero sin limitarse a, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer primario de hígado, cáncer de ovario, cáncer de próstata y leiomiomasarcoma uterino.

Como se usa en la presente memoria, el término "leucemia" se refiere a enfermedades neoplásicas de la sangre y órganos hematopoyéticos. Dichas enfermedades pueden causar la disfunción de la médula ósea y del sistema inmune, lo que convierte al huésped en altamente susceptible a infección y hemorragia. Particularmente, el término leucemia se refiere a leucemia mieloide aguda (AML) y aguda linfoblástica aguda (ALL).

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedades que implican la alteración del recambio del cartílago" y, específicamente, "enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos" incluye afecciones como osteoartritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurogénica o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis, tales como osteoartritis deformante endémica, enfermedad Mseleni y
 20 enfermedad Handigodu; degeneración resultante de fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y la espondilitis anquilosante.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "malformación o malformaciones congénitas del cartílago" incluye afecciones como condrólisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias y, particularmente, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria y trastornos relacionados.

25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6" incluye afecciones como la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

"Compuesto o compuestos de la invención" y expresiones equivalentes, pretende incluir compuestos de la Fórmula VIa, como se ha descrito anteriormente, cuya expresión incluye las sales farmacéuticamente aceptables, y los solvatos, por
 30 ejemplo, hidratos, y los solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables, donde el contexto lo permita. De manera similar, la referencia a intermedios, se reivindicuen o no ellos mismos, pretende incluir sus sales, y solvatos, cuando el contexto así lo permita.

Cuando en la presente memoria, se hace referencia a intervalos, la referencia a un intervalo debería considerarse una representación de cada miembro de dicho intervalo.

35 Otros derivados de los compuestos de la presente invención tienen actividad en ambas de sus formas de ácido y formas de derivado de ácido, pero en la forma sensible a ácido ofrecen frecuentemente ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en el organismo de los mamíferos (véase, Bundgard, H., Design of Prodrugs, pp 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Los profármacos incluyen derivados de ácido bien conocidos por los practicantes de la técnica, como, por ejemplo, ésteres preparados haciendo reaccionar el ácido parental con un alcohol adecuado, o amidas
 40 preparadas haciendo reaccionar el compuesto ácido precursor con una amina sustituida o no sustituida, o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Los ésteres simples alifáticos o aromáticos, amidas y anhídridos derivados de grupos ácidos colgantes sobre los compuestos de la presente invención son profármacos particularmente útiles. En algunos casos es deseable preparar profármacos de tipo doble éster, como (aciloxi) alquil ésteres o ((alcoxycarbonil) oxi) alquil ésteres. Particularmente, dichos profármacos son los ésteres de alquilo C₁ a C₈, alqueno C₂C₈, arilo, arilo C₇C₁₂ sustituido y
 45 arilalquilo C₇C₁₂ de los compuestos de la invención.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una "variante isotópica" de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos, como por ejemplo, deuterio (²H o D), carbono-13 (¹³C), nitrógeno-15 (¹⁵N), o similares. Se entenderá que, en un compuesto en el que se realiza dicha
 50 sustitución isotópica, los átomos siguientes, cuando están presentes, pueden variar, de manera que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser ²H/D, cualquier carbono puede ser ¹³C, o cualquier nitrógeno puede ser ¹⁵N, y que la presencia y la colocación de dichos átomos puede estar incluida dentro de la experiencia de la técnica. Asimismo, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, en el caso por ejemplo, cuando los compuestos resultantes pueden usarse para estudios de distribución tisular del fármaco y/o sustrato. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ³H, y carbono-14, es decir, ¹⁴C, son particularmente útiles para este propósito en vista de su
 55

facilidad de incorporación y medios de detección rápidos. Además, pueden prepararse compuestos que están sustituidos con isótopos emisores de positrones, como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , y serían útiles en estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.

5 Se pretende que todas las variantes isotópicas de los compuestos proporcionados en la presente memoria, radiactivos o no, estén incluidas dentro del alcance de la invención.

Debe entenderse también que los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o la secuencia de unión de sus átomos o la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros".

10 Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno de otro se denominan "diastereómeros" y los que no son imágenes especulares superponibles el uno del otro se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero puede caracterizarse por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe por las reglas de secuencia R- y S- de Cahn y Prelog, o por la manera en que la molécula rota el plano de la luz polarizada y se designa como dextrógiro o levógiro (es decir, como isómeros (+) o (-) respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina una "mezcla racémica".

15 "Tautómeros" se refiere a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto particular, y que varían en el desplazamiento de los átomos de hidrógeno y electrones. De esta manera, dos estructuras pueden estar en equilibrio mediante el movimiento de electrones π y un átomo (normalmente H). Por ejemplo, enoles y cetonas son tautómeros, ya que se interconvierten rápidamente mediante un tratamiento con ácido o base. Otro ejemplo de tautomería son las formas aci- y nitro- de fenilnitrometano, que se forman de manera similar mediante un tratamiento con ácido o base.

20 Las formas tautómeras pueden ser relevantes para la consecución de la reactividad química y la actividad biológica óptimas de un compuesto de interés.

25 Los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; por lo tanto, dichos compuestos pueden ser producidos como estereoisómeros (R) o (S) individuales o como mezclas de los mismos.

A menos que se indique lo contrario, se pretende que la descripción o la nomenclatura de un compuesto particular en la especificación y en las reivindicaciones incluyan tanto los enantiómeros individuales como sus mezclas, racémicas o no racémicas. Los procedimientos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros son bien conocidos en la técnica.

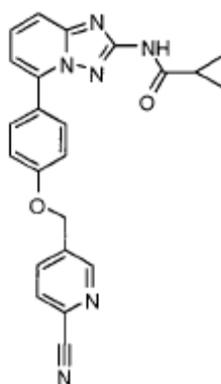
30

Los compuestos

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los inhibidores de JAK son útiles para el tratamiento de enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplante (por ejemplo rechazo de trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar aplicación también en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomioma uterino, cáncer de próstata). Particularmente enfermedades que implican la degradación y/o inflamación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo artritis. La presente invención proporciona procedimientos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y procedimientos de tratamiento de enfermedades que implican la degradación y/o inflamación de cartílagos, huesos y/o articulaciones mediante la administración de un compuesto de la invención. Los compuestos pueden ser inhibidores de uno o más miembros de la familia JAK; específicamente, pueden inhibir la actividad de una o más de entre JAK1, JAK2, JAK3 y/o TYK2.

45

En consecuencia, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto según la Fórmula VIa:



VIa

En una realización, el compuesto de la invención no es una variante isotópica.

En una realización, con respecto a la Fórmula VIa, el compuesto es el compuesto 176 de la Tabla 1.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona también profármacos y derivados de los compuestos según la Fórmula VIa anterior. Los profármacos son derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos metabólicamente escindibles y se convierten, mediante solvolisis o en condiciones fisiológicas, en los compuestos de la invención, que son farmacéuticamente activos, in vivo. Dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, derivados de éster de colina y similares, ésteres de N-alquil morfolina y similares.

Otros derivados de los compuestos de la invención tienen actividad tanto en sus formas de ácido como en las formas derivadas de ácido, pero la forma sensible a ácido ofrece frecuentemente ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en el organismo de los mamíferos (véase, Bundgard, H. , Design of Prodrugs, pp 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Los profármacos incluyen derivados de ácido bien conocidos por los practicantes de la técnica, como, por ejemplo, ésteres preparados haciendo reaccionar el ácido parental con un alcohol adecuado, o amidas preparadas haciendo reaccionar el compuesto ácido precursor con una amina sustituida o no sustituida, o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Los ésteres simples alifáticos o aromáticos, amidas y anhídridos derivados de grupos ácidos colgantes sobre los compuestos de la presente invención son profármacos preferentes. En algunos casos, es deseable preparar profármacos de tipo doble éster, como (aciloxi) alquil ésteres o ((alcoxicarbonil) oxo) alquil ésteres. Particularmente útiles son los ésteres de alquilo C₁ a C₈, alqueno C₂-C₈, arilo, arilo C₇-C₁₂ sustituido y arilalquilo C₇-C₁₂ de los compuestos de la invención.

Composiciones farmacéuticas

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos de la invención se administran, típicamente, en la forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones pueden prepararse de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo. Generalmente, los compuestos de la presente invención se administran en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad de compuesto administrada realmente será determinada, típicamente, por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse mediante una diversidad de rutas incluyendo oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, intravenosa, intramuscular e intranasal. Dependiendo de la ruta de suministro prevista, los compuestos de la presente invención se formulan, preferentemente, como composiciones inyectables u orales o como pomadas, como lociones o como parches, todos ellos para la administración transdérmica.

Las composiciones para la administración oral pueden adoptar la forma de soluciones líquidas o suspensiones a granel, o polvos a granel. Más comúnmente, sin embargo, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitarias para facilitar la dosificación exacta. La expresión "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente, vehículo o portador farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringas precargadas, premedidas, de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas. En dichas composiciones, el compuesto activo es normalmente un componente menor (de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 50% en peso o, preferentemente, de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 40% en peso) siendo el resto diversos vehículos o portadores y adyuvantes de procesamiento útiles para formar la forma de dosificación deseada.

Las formas líquidas adecuadas para la administración oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y agentes de dispensación, colorantes, aromatizantes y similares. Las formas sólidas pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente desintegrante, como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante, como estearato de magnesio; un agente deslizante, como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Típicamente, las composiciones inyectables se basan en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Como antes, el compuesto activo en dichas composiciones es típicamente un componente menor, siendo frecuentemente de aproximadamente el 0,05 al 10% en peso, siendo el resto el vehículo inyectable y similares.

Las composiciones transdérmicas se formulan, típicamente, como una pomada o crema tópica que contiene el ingrediente o ingredientes activos, generalmente, en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20% en peso, preferentemente, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20% en peso, preferentemente, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% en peso y, más preferentemente, de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 15% en peso. Cuando se formulan como una pomada, los ingredientes activos se combinan, típicamente, con una base de ungüento parafínico o miscible en agua. Como alternativa, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con, por ejemplo, una base de crema de aceite en agua. Dichas formulaciones transdérmicas son bien conocidas en la técnica y, generalmente, incluyen ingredientes adicionales para mejorar la penetración dérmica de la estabilidad de los ingredientes activos o la formulación. La totalidad de dichas formulaciones transdérmicas e ingredientes conocidos están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse también mediante un dispositivo transdérmico. En consecuencia, la administración transdérmica puede conseguirse usando un parche de tipo depósito o membrana porosa, o una variedad de matriz sólida.

Los componentes descritos anteriormente para composiciones administrables por vía oral, inyectables o administrables por vía tópica son meramente representativos. Otros materiales, así como técnicas de procesamiento y similares, se establecen en la Parte 8 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, que se incorpora a la presente memoria, por referencia.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse también en formas de liberación sostenida o desde sistemas de suministro de fármacos de liberación sostenida. Una descripción de los materiales de liberación sostenida representativos se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas que pueden ser preparadas según la presente invención. La presente invención, sin embargo, no se limita a las siguientes composiciones farmacéuticas.

35 **Formulación 1-Comprimidos**

Un compuesto de la invención puede ser mezclado como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seca en una relación en peso aproximada de 1:2. Se añade una cantidad menor de estearato de magnesio como lubricante. La mezcla se forma en comprimidos de 240-270 mg (80-90 mg de compuesto activo de amida por comprimido) en una prensa de comprimidos.

40 **Formulación 2-Cápsulas**

Un compuesto de la invención puede ser mezclado como un polvo seco con un diluyente de almidón en una relación en peso aproximada de 1:1. La mezcla puede cargarse en cápsulas de 250 mg (125 mg de compuesto activo de amida por cápsula).

Formulación 3-Líquido

45 Un compuesto de la invención (125 mg), puede ser mezclado con sacarosa (1,75 g) y goma de xantano (4 mg) y la mezcla resultante puede mezclarse, pasarse a través de un tamiz de malla EE.UU. Nº 10 y, a continuación, puede mezclarse con una solución preparada previamente de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa sódica (11:89, 50 mg) en agua. Se diluyen benzoato de sodio (10 mg), aroma y colorante con agua y se añaden con agitación. A continuación, puede añadirse agua suficiente, con agitación. A continuación, se añade suficiente agua para producir un volumen total de 5 ml.

50

Formulación 4-Comprimidos

Un compuesto de la invención puede mezclarse como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seca en una relación en peso aproximada de 1:2. Una cantidad menor de estearato de magnesio se añade como un lubricante. La mezcla se forma en comprimidos de 450-900 mg (150-300 mg de compuesto activo de amida) en una prensa de comprimidos.

5 Formulación 5-Inyección

Un compuesto de la invención puede disolverse o suspenderse en un medio acuoso, inyectable, con solución salina estéril tamponada a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml.

Formulación 6-Tópica

10 El alcohol estearílico (250 g) y un petrolato blanco (250 g) se funden a aproximadamente 75°C y, a continuación, se añade una mezcla de un compuesto de la invención (50 g) metilparabeno (0,25 g), propilparabeno (0,15 g), lauril sulfato de sodio (10 g) y propilenglicol (120 g) disuelto en agua (aproximadamente 370 g) y la mezcla resultante se agita hasta que se congela.

Procedimiento de tratamiento

15 Los compuestos de la invención pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de afecciones en mamíferos que están relacionadas o pueden atribuirse causalmente a la actividad aberrante de JAK. Particularmente, las condiciones relacionadas con la actividad aberrante de una o más de entre JAK1, JAK2, JAK3 y/o TYK2. Por consiguiente, el compuesto de la invención y las composiciones farmacéuticas de la presente invención encuentran uso como agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo, osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxina (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplantes (por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos). Los inhibidores de JAK pueden encontrar aplicación también en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Particularmente, los inhibidores de JAK encuentran aplicación en el tratamiento de cánceres, especialmente leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, leiomiomas uterino, cáncer de próstata). Particularmente, las afecciones se seleccionan de entre afecciones inflamatorias, afecciones relacionadas con degradación de cartílagos y/o articulaciones en mamíferos, incluyendo seres humanos. En otra realización, los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención encuentran uso como agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar trastornos proliferativos en mamíferos, incluyendo seres humanos. En una realización específica el compuesto de la invención y las composiciones farmacéuticas de los mismos encuentran uso como agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar el cáncer en mamíferos, incluyendo seres humanos.

35 En un procedimiento adicional de los aspectos de tratamiento, se divulgan procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece una afección que implica una respuesta inmune o una enfermedad autoinmune. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la enfermedad autoinmune está seleccionada entre COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria del intestino.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una afección que implica una respuesta autoinmune o una enfermedad autoinmune. En una realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona entre COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria del intestino.

50 En un procedimiento del aspecto de tratamiento, se divulga un procedimiento de tratamiento, prevención o profilaxis en un mamífero susceptible de padecer o que padece enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, una afección asociada con, o enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), por ejemplo, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurógena o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis como osteoartritis deformante endémica, enfermedad Mseleni y enfermedad Handigodu; degeneración resultante de fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante, cuyo procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la invención, o una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos descritos en la presente memoria.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, una afección asociada con, o enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), por ejemplo, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, la distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurógena o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis, como osteoartritis deformante endémica, enfermedad Mseleni y enfermedad Handigodu; degeneración resultante de fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante.
- 10 También se describe un procedimiento de tratamiento de malformaciones congénitas del cartílago, incluyendo condrólisis hereditaria, condrodisplasias u pseudocondrodisplasias, particularmente, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria, y trastornos relacionados, cuyo procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritas en la presente memoria.
- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de malformaciones congénitas del cartílago, incluyendo condrólisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias y, particularmente, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria y trastornos relacionados.
- 20 En otro aspecto, se divulga un procedimiento de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece una afección que implica inflamación. En un procedimiento adicional de los aspectos de tratamiento, se divulgan procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece enfermedades o trastornos mediados por o que resultan en inflamación, como, por ejemplo, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas que implican el cartílago, como la de las articulaciones, cuyo procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria. En un aspecto específico, la afección que implica inflamación está seleccionada entre artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias del intestino. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para tratar afecciones o prevenir afecciones de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria.
- 25 30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de una afección que implica inflamación. En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades y trastornos mediados por o que resultan en inflamación, como, por ejemplo, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas que implican cartílago, como la de las articulaciones. En una realización específica, la afección que implica inflamación está seleccionada entre artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias del intestino.
- 35 40 En un procedimiento adicional de los aspectos de tratamiento, se divulgan procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece una enfermedad proliferativa, particularmente cáncer (por ejemplo, tumores sólidos, como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML o ALL), mieloma múltiple y/o psoriasis, cuyos procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria. En un procedimiento adicional de los aspectos de tratamiento, se divulgan procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece cáncer (por ejemplo, tumores sólidos como leiomiomas uterino o cáncer de próstata) y/o leucemias.
- 45 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de una enfermedad proliferativa, particularmente cáncer (por ejemplo, tumores sólidos, como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML o ALL), mieloma múltiple y/o psoriasis. En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis del cáncer (por ejemplo, tumores sólidos, como leiomiomas uterino o cáncer de próstata) y/o leucemias.
- 55

En un procedimiento adicional de los aspectos de tratamiento, se divulgan procedimientos para tratar a un mamífero susceptible de padecer o que padece enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, particularmente enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferativa mesangial, cuyos procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz de una o más composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, particularmente, enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

10 En un procedimiento adicional de los aspectos de tratamiento, se divulgan procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible a padecer o que padece rechazo de trasplante, cuyos procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria. En una realización específica, se divulgan procedimientos de tratamiento del rechazo de trasplantes de órganos.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis del rechazo de trasplantes. En un aspecto específico, se divulgan procedimientos para el tratamiento del rechazo de trasplantes de órganos.

20 Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un producto farmacéutico, especialmente en el tratamiento o la prevención de las afecciones y enfermedades indicadas anteriormente. También se proporciona en la presente memoria el uso de un compuesto de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una de las afecciones y enfermedades indicadas anteriormente.

25 Un régimen particular del presente procedimiento comprende la administración a un sujeto que padece una enfermedad que implica inflamación, de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación en el paciente y, preferentemente, terminar, los procesos responsables de dicha inflamación. Una realización especial del procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un paciente que padece o es susceptible de padecer el desarrollo de artritis reumatoide, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la inflamación en las articulaciones de dicho paciente y, preferentemente, terminar, los procesos responsables de dicha inflamación.

30 Un régimen particular adicional del presente procedimiento comprende la administración a un sujeto que padece un estado de enfermedad caracterizado por la degradación de cartílagos o articulaciones (por ejemplo, osteoartritis) de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención durante un periodo de tiempo suficiente para reducir y, preferentemente, terminar, los procesos autopetruadores responsables de dicha degradación. Una realización especial del procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un paciente que padece o es susceptible de padecer el desarrollo de osteoartritis, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación del cartílago en las articulaciones de dicho paciente y, preferentemente, terminar, los procesos autopetruadores responsables de dicha degradación. En una realización particular, dichos compuestos exhiben propiedades anabólicas y/o anti-catabólicas del cartílago.

40 Los niveles de dosis de inyección están comprendidos entre aproximadamente 0,1 mg/kg/hora y al menos 10 mg/kg/hora, durante aproximadamente 1 a aproximadamente 120 horas y especialmente de 24 a 96 horas. Un bolo de precarga de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más puede ser administrado también para conseguir niveles adecuados de estado estacionario. No se espera que la dosis total máxima supere aproximadamente 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

45 Para la prevención y/o tratamiento de las afecciones a largo plazo, como afecciones degenerativas, el régimen de tratamiento normalmente se extiende durante muchos meses o años, de manera que una dosificación oral es preferente para la conveniencia y la tolerancia del paciente. Con la dosificación oral, de uno a cinco y, especialmente, de dos a cuatro y, típicamente, tres dosis orales por día son regímenes representativos. Usando estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg del compuesto de la invención, proporcionando cada dosis particular de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg y, especialmente, de 1 a 50 aproximadamente 5 mg/kg.

Las dosis transdérmicas se seleccionan, generalmente, para proporcionar niveles en sangre similares o menores que los que se consiguen usando las dosis de inyección.

Cuando se usan para prevenir la aparición de una afección inflamatoria, los compuestos de la presente invención se

administrarán a un paciente en riesgo de desarrollar la afección, típicamente, bajo el asesoramiento y la supervisión de un médico, a los niveles de dosificación descritos anteriormente. Los pacientes con riesgo de desarrollar una afección particular incluyen generalmente aquellos que tienen un historial familiar de la afección, o aquellos que han sido identificados mediante ensayos genéticos o cribados como particularmente susceptibles a desarrollar la afección.

- 5 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse como el único agente activo o pueden administrarse en combinación con otros agentes, incluyendo otros compuestos que demuestran la misma o similar actividad terapéutica, y que se determinan como seguros y eficaces para dicha administración combinada. En una realización específica, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite el uso de dosis considerablemente más bajas de cada uno, reduciendo, de esta manera, los efectos secundarios observados.
- 10 En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que implica inflamación; los agentes particulares incluyen, pero sin limitación, agentes inmunorreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticosteroides (por ejemplo, prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato de mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3, por ejemplo, Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.
- 15 En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de artritis (por ejemplo artritis reumatoide); los agentes particulares incluyen, pero sin limitación, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), esteroides, DMARDs sintéticos (por ejemplo, pero sin limitación, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofin, aurotiomalatode sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina y ciclosporina), y DMARDs biológicos (por ejemplo, pero sin limitación, infliximab, etanercept, adatumumab, rituximab y abatacept).
- 20 En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de trastornos proliferativos; los agentes particulares incluyen pero sin limitación: metotrexato, leukovorin, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin (TM)), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ejemplo Iressa (R), Tarceva (TM), Erbitux (TM)), inhibidores de VEGF (por ejemplo, Avastin (TM)), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade (TM)), Glivec (R) o inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Además, un compuesto de la invención puede ser administrado en combinación con otras terapias, incluyendo, pero sin limitarse a, radioterapia o cirugía. En una realización específica, el trastorno proliferativo está seleccionado entre cáncer, enfermedad mieloproliferativa o leucemia.
- 25 En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes; los agentes particulares incluyen pero sin limitación: glucocorticoides, agentes citostáticos (por ejemplo, análogos de purina), agentes alquilantes, (por ejemplo, mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino y otros), antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ejemplo, dactinomicina antraciclinas, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ejemplo, anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OTK3) anticuerpos monoclonales, Atgam® y Thymoglobuline®), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones (por ejemplo, IFN-β), proteínas de unión a TNF (por ejemplo, infliximab (Remicade), etanercept (Enbrel), o adalimumab (Humira)), micofenolato, fingolimod, miriocina.
- 30 En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención del rechazo de trasplantes; los agentes particulares incluyen pero sin limitación: inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (por ejemplo, sirolimus, everolimus), antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de receptor anticuerpo monoclonal anti-IL-2Rα, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti células T (por ejemplo, globulina antitímocito (ATG), globulina anti-linfocito (ALG)).
- 35 En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de asma y/o rinitis y/o COPD; los agentes particulares incluyen pero sin limitación: agonistas beta₂-adrenérgicos (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhhalada o comprimidos), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio), glucocorticoides (orales o inhalados) agonistas β₂ de acción prolongada (por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol y albuterol oral de liberación sostenida), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ejemplo fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrienos e inhibidores de síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlukast y zileuton), inhibidores de liberación de mediadores (por ejemplo, cromoglicato y ketotifeno), reguladores biológicos de la respuesta IgE (por ejemplo omalizumab), antihistaminas (por ejemplo ceterizina, cinarizina, fexofenadina), vasoconstrictores (por ejemplo oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).
- 50
- 55

Además, el compuesto de la invención puede administrarse en combinación con terapias de emergencia para el asma y/o

la COPD, dichas terapias incluyen la administración de oxígeno o de heliox, salbutamol o terbutalina nebulizada (opcionalmente combinado con un anticolinérgico (por ejemplo ipratropio), esteroides sistémicos (oral o intravenosa, por ejemplo, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona o hidrocortisona), salbutamol intravenoso, beta-agonistas no específicos, inyectados o inhalados (por ejemplo, epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol),
 5 anticolinérgicos (IV o nebulizado, por ejemplo, glicopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina, bamifilina), anestésicos inhalatorios que tienen un efecto broncodilatador (por ejemplo, isoflurano, halotano, enflurano), ketamina, sulfato de magnesio intravenoso.

En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de IBD; los agentes particulares incluyen pero sin limitación: glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, budesonida), agentes inmunomoduladores que modifican la síntesis de la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores que modifican una enfermedad biológica (infliximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de SLE; los agentes particulares incluyen pero sin limitación: fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARDs) como antipalúdicos (por ejemplo plaquenil, hidroxicloroquina), inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico, fármacos inmunosupresores y analgésicos, como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, opiáceos (por ejemplo, dextropropoxifeno y co-codamol), opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona, MS Contin o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo duragesic.

En una realización, el compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de psoriasis, los agentes particulares incluyen pero sin limitación: tratamientos tópicos, como soluciones de baño, cremas hidratantes, cremas medicadas y ungüentos que contienen alquitrán de hulla, ditranol (antralina), corticosteroides, como desoximetasona (Topicort), flucinonida, análogos de la vitamina D₃ (por ejemplo, calcipotriol), aceite Argan y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos, como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxurea, sulfasalazina, micofenolato de mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o agentes biológicos como Amevive, Enbrel, Humira, Remicade, Raptiva y ustekinumab (un bloqueador de IL-12 e IL-23). Además, un compuesto de la invención puede administrarse en combinación con otras terapias, incluyendo, pero sin limitarse a, fototerapia, fotoquimioterapia o (por ejemplo, psoraleno y fototerapia ultravioleta A (PUVA)).

En la co-administración se incluye cualquier medio de suministro de dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para la persona con conocimientos en la materia. Aunque los dos o más agentes pueden ser administrados simultáneamente en una única formulación, esto no es esencial. Los agentes pueden administrarse en formulaciones diferentes y en momentos diferentes.

Procedimientos sintéticos generales

General

Los compuestos de Fórmula VIa, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes procedimientos generales. Se apreciará que cuando se proporcionan condiciones de proceso típicas o preferentes (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, proporciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), pueden usarse también otras condiciones del proceso a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o solventes particulares usados, pero dichas condiciones pueden ser determinadas por una persona con conocimientos en la materia mediante procedimientos de optimización rutinarios.

Además, como será evidente para las personas con conocimientos en la materia, pueden necesitarse grupos protectores convencionales para prevenir que ciertos grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, así como las condiciones adecuadas para la protección y desprotección, son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, numerosos grupos protectores, y su introducción y eliminación, se describen en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Segunda Edición, Wiley, Nueva York, 1991, y referencias citadas en la misma.

Los procedimientos siguientes se presentan con detalles en cuanto a la preparación de bicicloheteroarilos representativos que se han indicado anteriormente en la presente memoria. Los compuestos de la invención pueden prepararse a partir de materiales de partida y reactivos conocidos o comercialmente disponibles por una persona con conocimientos en la técnica de la síntesis orgánica.

Todos los reactivos eran de calidad comercial y se usaron como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se

indique lo contrario. Se usaron disolventes anhidros disponibles comercialmente para las reacciones llevadas a cabo en atmósfera inerte. Se usaron disolventes de grado reactivo en todos los demás casos, a menos que se especifique lo contrario. Se realizó una cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (35-70 μm). Se realizó una cromatografía de capa fina usando placas F-254 de gel de sílice pre-recubiertas (espesor 0,25 mm). Se registraron los espectros ^1H RMN en un espectrómetro Bruker DPX 400 NMR (400 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) para los espectros ^1H RMN se presentan en partes por millón (ppm) con relación a tetrametilsilano (δ 0,00) o el pico correspondiente del disolvente residual, es decir, CHCl_3 (δ 7,27), como referencia interna. Las multiplicidades se dan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), multiplete (m) y ancho (br). Las constantes de acoplamiento (J) se proporcionan en Hz. Los espectros de electropulverización MS se obtuvieron en un espectrómetro Micromass Platform LC/MS. Columna usada para todos los análisis LCMS: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 mm ID x 50 mm l (Pieza N°186002350). HPLC preparativa: Waters XBridge Prep C18,5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm l (Pieza N° 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$. El H_2O contiene o bien 0,1% de TFA o bien 0,1% de NH_3 .

Lista de abreviaturas usadas en la sección experimental:

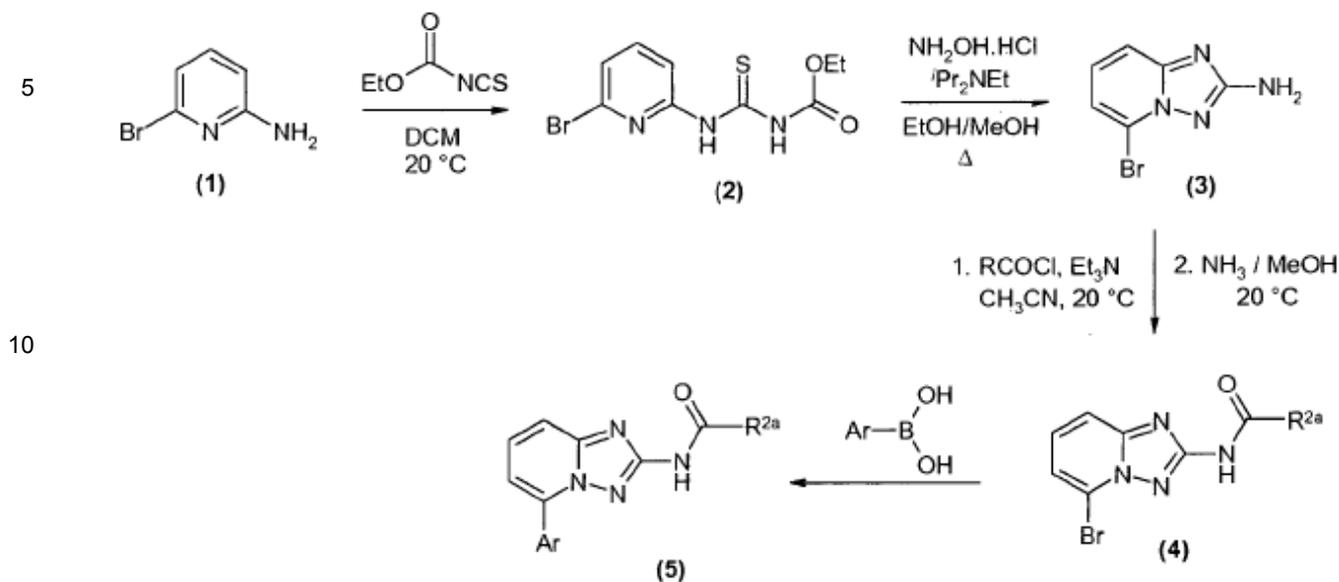
DCM	Diclorometano
DiPEA	N,N-diisopropiletilamina
MeCN	Acetonitrilo
BOC	tert-butiloxi-carbonilo
DMF	N,N-dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPA	Difenilbosforilazida
LC-MS	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas
Ppm	Partes por millón
EtOAc	Acetato de etilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
Rt	Tiempo de retención
s	Singlete
brs	Singlete amplio
m	Multiplete
d	Doblete
PdCl_2ppf	[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocen] dicloropaldio(II)
TEA	Trietilamina

15 Preparación sintética de los compuestos de Fórmula I y Fórmula VIa

Un compuesto de Fórmula I puede ser producido según el esquema siguiente.

Procedimiento sintético general

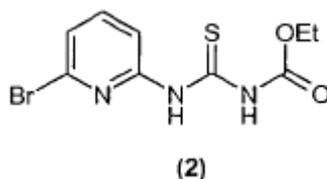
Esquema 1



en el que Ar es $\text{Cy1-L1-(CR}^{4b}\text{R}^{4c}\text{)}_{n1}\text{-R}^{3b}$; y Cy1, L1, n1, R^{2a} , R^{3b} , R^{4b} y R^{4c} son como se describe en la presente memoria.

General

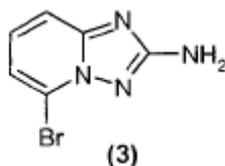
1.1.1 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (2)



20 A una solución de 2-amino-6-bromopiridina (1) (253,8 g, 1,467 mol) en DCM (2,5 l) enfriada a 5°C, se añade, gota a gota, isotiocianato de etoxicarbonilo (173,0 ml, 1,467 mol) durante 15 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente (20°C) y se agita durante 16 horas. Una evaporación en vacío proporciona un sólido que puede recogerse por filtración, puede lavarse minuciosamente con gasolina (3 x 600 ml) y secarse al aire para obtener (2). La tiourea puede usarse como para la siguiente etapa sin ninguna purificación. ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 12,03 (1H, br s, NH), 8,81 (1H, d, J 7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, t, J 8,0 Hz, H-4), 7,32 (1H, dd, J 7,7 y 0,6 Hz, H-5), 4,31 (2H, q, J 7,1 Hz, CH_2), 1,35 (3H, t, J 7,1 Hz, CH_3).

25

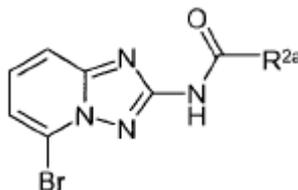
1.1.2 5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a] piridin-2-ilamina (3)



30 A una suspensión de clorhidrato de hidroxilamina (101,8 g, 1,465 mol) en EtOH/MeOH (1:1, 900 ml) se añade N,N-diisopropiletilamina (145,3 ml, 0,879 mol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente (20°C) durante 1 hora. A continuación, puede añadirse 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (2) (89,0 g, 0,293 mol) y la mezcla se calienta lentamente a reflujo (Nota: se necesita un depurador para desactivar el H_2S evolucionado). Después de 3 horas a reflujo, la mezcla se deja enfriar y se filtra para recoger el sólido precipitado. Puede recogerse producto adicional mediante evaporación en vacío del filtrado, adición de H_2O (250 ml) y filtración. Los sólidos combinados se lavan sucesivamente con

H₂O (250 ml), EtOH/MeOH (1:1, 250 ml) y Et₂O (250 ml), a continuación, se seca en vacío para obtener el derivado de triazolopiridina (**3**) como un sólido. El compuesto puede usarse como para la siguiente etapa sin ninguna purificación. ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,43-7,34 (2H, m, 2 x H aromático), 7,24 (1H, dd, J 6,8 y 1,8 Hz, H aromático), 6,30 (2H, br, NH₂): m/z 213/215 (1:1, M+H⁺, 100%).

5 1.1.3 Procedimiento general para mono-acilación para obtener intermedio (**4**)



10 A una solución de la 2-amino-triazolopiridina (**3**) (7,10 g, 33,3 mmol) en CH₃CN seco (150 ml) a 5°C se añade Et₃N (11,6 ml, 83,3 mmol) seguido de cloruro de ácido (83,3 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita hasta que todo el material de partida (**3**) se consume. Si se requiere, puede añadirse Et₃N adicional (4,64 ml, 33,3 mmol) y el cloruro de ácido (33,3 mmol) para asegurar la reacción completa. Después de la evaporación del disolvente en vacío, el residuo resultante se trata con solución 7 N de amoníaco metanólico (50 ml) y se agita a temperatura ambiente (durante 1-16 horas) para hidrolizar cualquier producto bis-acilado. El aislamiento del producto se realiza mediante la eliminación de volátiles en vacío seguido de trituración con Et₂O (50 ml). Los sólidos pueden recogerse mediante filtración, lavarse con H₂O (2 x 50 ml), acetona (50 ml) y Et₂O (50 ml), después se seca en vacío para obtener el intermedio acilo requerido (**4**). En algunos casos, puede requerirse una cromatografía en columna (gasolina/EtOAc) para obtener compuestos puros

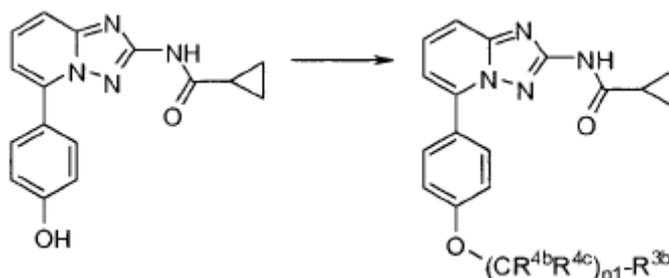
15

Procedimiento A

1.1.4 Preparación de compuestos de Fórmula I mediante acoplamiento de Suzuki (**5**):

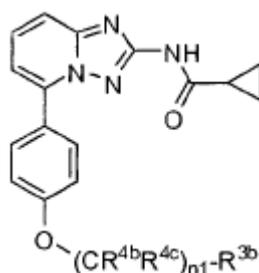
20 Un ácido borónico apropiado (2eq.) se añade a una solución de intermedio de bromo (**4**) en 1,4-dioxano/agua (5:1). Se añaden K₂CO₃ (2 eq.) y PdCl₂dppf (5%) a la solución. A continuación, la mezcla resultante se calienta en un microondas a 140°C durante 30 minutos (Esta reacción puede llevarse a cabo también mediante calentamiento tradicional en un baño de aceite a 90°C durante 16 horas en atmósfera de N₂). Se añade agua y la solución se extrae con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secan sobre MgSO₄ y se evaporan en vacío. El compuesto final se obtiene después de una purificación mediante cromatografía flash.

Procedimiento C



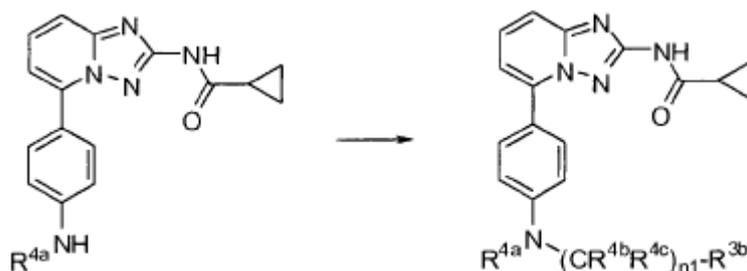
25 en la que R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{3b} y n1 son como se describen en la presente memoria.

Reacción de alquilación (Procedimiento general)



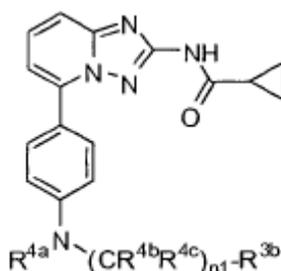
- 5 Se disuelven ácido ciclopropanocarboxílico [5-(4-hidroxi-fenil)-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il]-amida (1,1 eq) obtenido mediante el Procedimiento A y K_2CO_3 (5 eq) (o $AgCO_3$) en DMF en atmósfera de N_2 y se añade, gota a gota, el agente alquilante apropiado (1,1 eq). La suspensión resultante se calienta a $50^\circ C$ durante 16 horas. Después de este tiempo, la reacción está completada. El compuesto se extrae con EtOAc y agua, se lava con salmuera y se seca sobre $MgSO_4$. Las capas orgánicas se filtran y se evaporan. El compuesto final se aísla mediante HPLC preparativa. HPLC preparativa: Waters XBridge Prep C18 $5\ \mu m$ ODB 19 mm ID x 100 mm I (Pieza N° 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de MeCN/ H_2O . El H_2O contiene 0,1% de TFA o 0,1% de NH_3 .

Procedimiento E



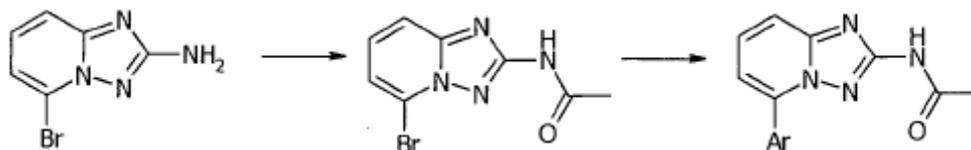
en las que R^{4a} , R^{4b} , R^{4c} , R^{3b} y n_1 son como se describe en la presente memoria.

- 10 Aminación reductiva (Procedimiento general)

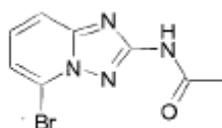


- 15 El aldehído apropiado (2 eq.), el derivado de anilina (1 eq.) obtenido mediante el Procedimiento A y $Ti(OPr)_4$ se mezclan y se agitan a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se diluye en etanol y se añade $Na(CN)BH_3$ (1 eq.). La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se diluye en agua y se filtra. El filtrado se lava con etanol. Las fases de disolvente combinadas se evaporan en vacío. El compuesto final se aísla mediante HPLC preparativa.

HPLC preparativa: Waters XBridge Prep C18 $5\ \mu m$ ODB 19 mm ID x 100 mm I (Pieza N° 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de MeCN/ H_2O . El H_2O contiene el 0,1% de TFA o el 0,1% de NH_3 .

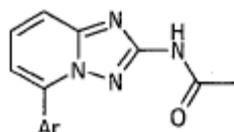
Procedimiento F

- 5 en las que Ar es $\text{Cy1-L1-(CR}^{4b}\text{R}^{4c})_{n1}\text{-R}^{3b}$; y Cy1, L1, n1, R^{3b} , R^{4b} y R^{4c} son como se describe en la presente memoria.
N-(5-bromo-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il)-acetamida



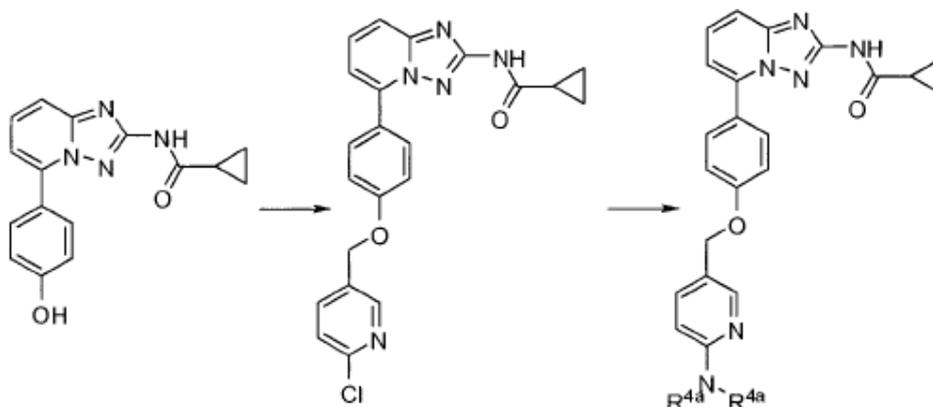
- 10 A una solución de 5-bromo-2-amino-triazolopiridina (1 eq.) en CH_3CN seco a 5°C se añade Et_3N (2,5 eq.) seguido de cloruro de acetilo (2,5 eq.). A continuación, la mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita hasta que todo el material de partida se consume. Si es necesario, se añaden Et_3N y cloruro de ácido (1 eq.) adicionales para asegurar la reacción completa. Después de la evaporación del disolvente en vacío, el residuo resultante se trata con solución 7 N de amoníaco metanólico y se agita a temperatura ambiente, (durante 16 h) para hidrolizar cualquier producto bis-acilado. El aislamiento del producto se realiza mediante la eliminación de volátiles en vacío seguido de adición de agua y extracción con acetato de etilo. A continuación, la fase orgánica se seca sobre MgSO_4 , se evapora en vacío. El compuesto se usa sin purificación adicional.

- 15 Reacción de Suzuki (Procedimiento General)

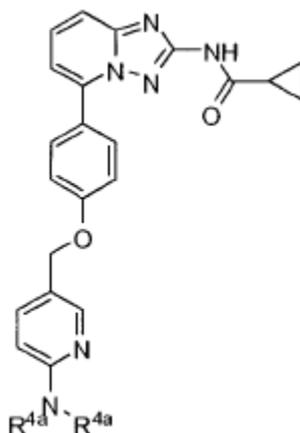


- 20 Se añade ácido borónico (2eq.) a una solución de N-(5-bromo-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il)-acetamida en 1,4-dioxano/agua (5:1). Se añaden K_2CO_3 (2 eq.) y $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (5%) (dppf = 1,1'- bis (difenilfosfino) ferroceno) a la solución. A continuación, la mezcla resultante se calienta en un horno de microondas (CEM Discover) en un tubo sellado a 140°C durante 30 minutos. Se añade agua y la solución se extrae con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secan sobre MgSO_4 y se evaporan en vacío. El compuesto final se obtiene después de purificación mediante HPLC preparativa. Analítica: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 mm ID x 50 mm l (pieza N° 186002350).

- 25 HPLC preparativa: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm l (Pieza N° 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$. El H_2O contiene el 0,1% de TFA o el 0,1% de NH_3 .

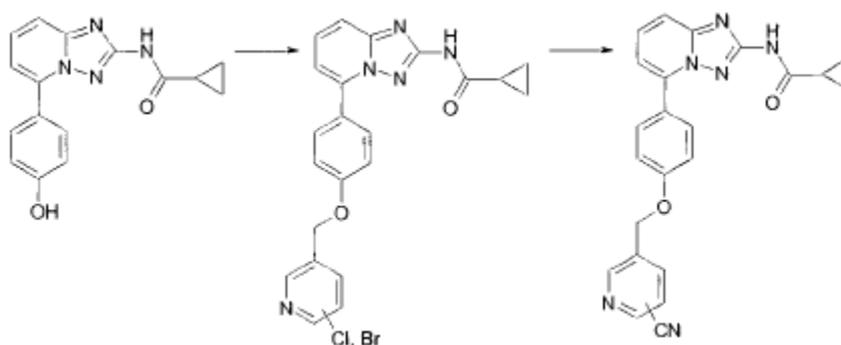
Procedimiento L

L.1 Sustitución aromática nucleófila (Procedimiento General)

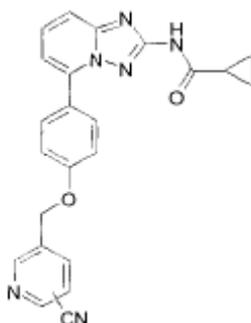


5 Ácido ciclopropanocarboxílico {5-[4-(6-cloro-piridin-3-ilmethoxi)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida preparada mediante el procedimiento C(1 eq.), una amina apropiada, (1,5 eq.) se mezclan en DMSO en un tubo sellado. La reacción se calienta a 100°C durante 24 horas. Una vez que toda la SM ha desaparecido mediante LCMS, se añade agua a la mezcla de reacción y los orgánicos se extraen con acetato de etilo. La capa orgánica se seca sobre MgSO₄ y se evapora bajo vacío. El compuesto final se aísla mediante HPLC preparativa. Analítica: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 mm ID x 50 mm I (Pieza N° 186002350)

HPLC preparativa: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm I (Pieza N° 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de MeCN/H₂O. El H₂O contiene el 0,1% de TFA o el 0,1% de NH₃.

10 **Procedimiento N**

N.1 {5-[4-(nitril-arilmethoxi)fenil]-[1,2,4]trizaolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico

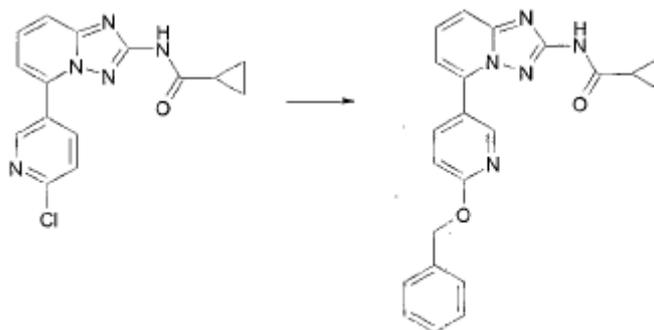


Se añade Pd(PPh₃)₄ (0,04 mmol) a una solución desgasificada de {5-[4-(haloaril-3-ilmethoxi)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico preparada mediante el Procedimiento B (0,24 mmol) y Zn(CN)₂ (0,24 mmol) en DMF (1 ml). La mezcla de reacción se expone a radiación de microondas (W: 150 W; T: 150°C) durante 30

minutos. La mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava con agua. La capa orgánica se seca sobre $MgSO_4$, se filtra y el solvente se elimina bajo vacío. El compuesto se purifica mediante HPLC preparativa para obtener el producto (del 30% al 50%).

Síntesis de compuestos representativos de Fórmula I, y el compuesto de Fórmula VIa

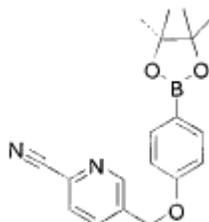
- 5 **Compuesto de comparación 57:** [5-(6-benziloxi-piridin-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico



- 10 A $0^\circ C$ y bajo atmósfera de N_2 , se trató alcohol bencílico (2 eq) en una solución de THF con NaH al 60% en aceite mineral (4 eq) durante 30 minutos. A continuación, se añadió [5-(6-cloro-piridin-3-il)-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico, preparada mediante el Procedimiento A, a la solución y la mezcla se agitó a $70^\circ C$ durante 3 horas. La reacción se completó. La mezcla de reacción se inactivó con agua y el compuesto se extrajo con EtOAc. El compuesto se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró. El compuesto se purificó en HPLC Prep.

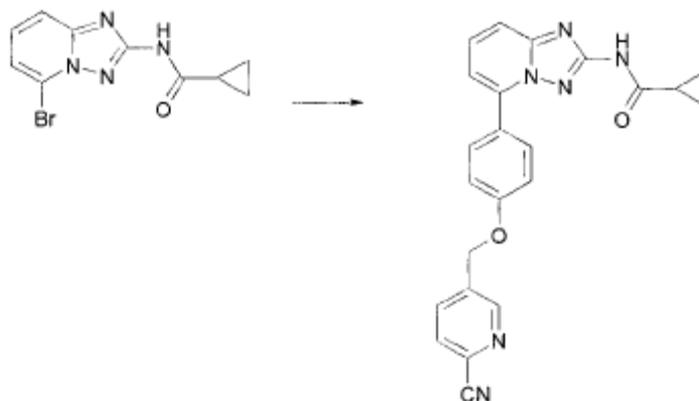
Compuesto 176: N-(5-(4-((6-cianopiridin-3-il) metoxi) fenil)-[1, 2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida

176.1: Síntesis de 5-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoximetil]-piridin-2-carbonitrilo



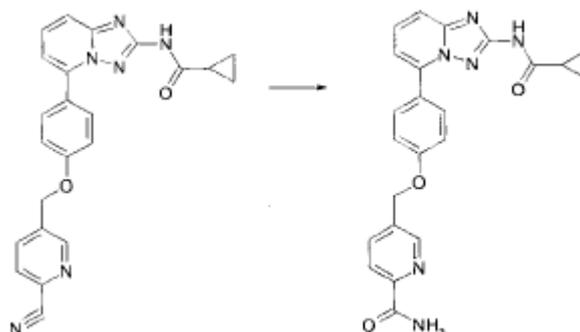
- 15 A éster de pinacol de ácido 4-hidroxifenilborónico (25 g; 0,11 mol; 1,0 equiv) en acetona (250 ml) a temperatura ambiente se añadieron, bajo argón, 5-clomometil-piridina-2-carbonitrilo (19 g; 0,12 mol; 1,1 equiv) y carbonato de cesio (73,9 g, 0,22 mol; 2 equiv). La mezcla de reacción se calentó durante 4 horas a reflujo. A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, la acetona se evaporó. Se añadió agua (200 ml) y el producto se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró hasta la sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (gasolina:EtOAc 10:1) para obtener el boronato esperado como un sólido blanco.
- 20

176.2: Síntesis de (5-[4-(6-ciano-piridin-3-ilmetoxi)-fenil]-[1,2,4] triazolo [1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico



- 5 Se añadió 5-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2] dioxaborolan-2-il)-fenoximetil]-piridina-2-carbonitrilo (10 g, 0,03 mol, 1,1 equiv.) a una solución de (5-bromo-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (7,6 g, 0,027 mol) en 1,4-dioxano/agua (4:1; 70 ml). Se añadieron K_2CO_3 (7,45, 0,054 mol, 2 eq.) y $PdCl_2dppf$ (5%) a la solución. A continuación, la mezcla resultante se calentó en un baño de aceite a $90^\circ C$ bajo N_2 hasta la finalización (monitorizada por LCMS). El 1,4-dioxano se eliminó en vacío, y se añadió agua/EtOAc y el sólido se filtró. El sólido obtenido se disolvió en metanol/DCM, se secó sobre $MgSO_4$ y el compuesto final se obtuvo después de la purificación mediante cromatografía flash, eluyendo con EtOAc puro como un sólido blanco.

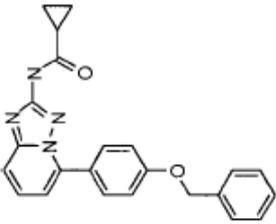
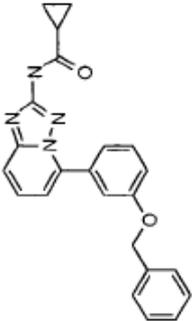
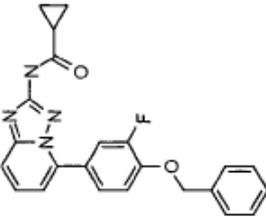
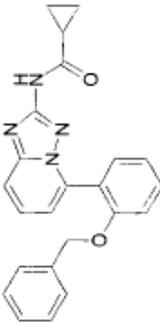
Compuesto de comparación 192: Amida de ácido S-{4-[2-(ciclopropanocarboxil-amino)-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-5-il]-fenoximetil}-piridina-2-carboxílico



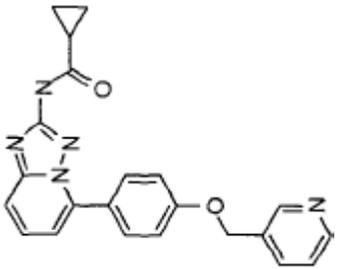
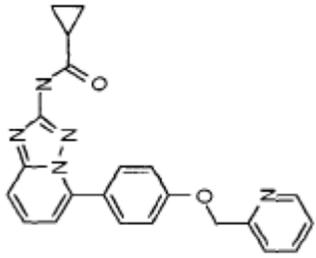
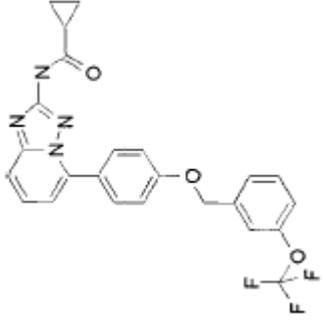
- 10 A una solución de {5-[4-(6-ciano-piridin-3-ilmetoxi)-fenil]-[1,2,4] triazolo [1,5-a] piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (30 mg, 0,073 mmol, 1 equiv) y K_2CO_3 (10 mg, 0,073 mmol, 1 equiv) en DMSO (0,2 ml) a $10^\circ C$, se añadió, gota a gota, H_2O_2 al 30% (17 μl , 0,146 mmol, 2 equiv). Después de agitar a temperatura ambiente la mezcla durante 4 horas, la mezcla se diluyó con DMSO y se filtró. El filtrado se sometió a purificación mediante HPLC preparativa: sistema UPLC (XBridge™ Prep C18, 5 μm , columna de 19x100 mm); 8 min LC; flujo: 20 ml/min, gradiente: del 30% al 70% de acetonitrilo en agua 0,1% de TFA; aislando el producto final.
- 15

Los compuestos de comparación ejemplares y los compuestos de Fórmula VIa (Compuesto 176) que se han preparado o pueden ser preparados según los procedimientos de síntesis descritos en la presente memoria se enumeran en la Tabla I, a continuación. Los datos de los espectros de RMN de algunos compuestos de comparación representativos y el compuesto de Fórmula VIa (Compuesto 176) se proporcionan en la Tabla II.

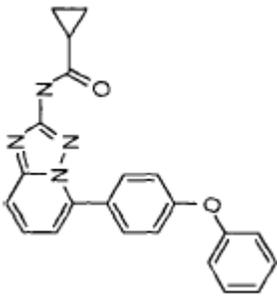
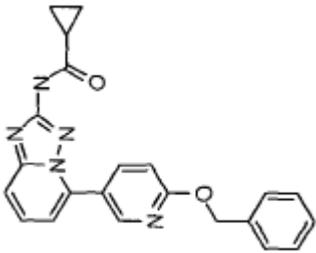
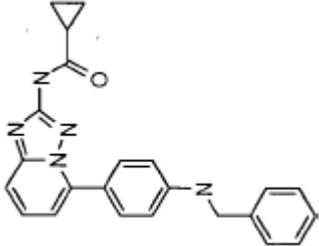
TABLA I

N° cpd	Estructura	Nombre	Procedimiento	MW	MS medido
12		N-(5-(4-(benziloxy)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	A	384,44	385,10
14		N-(5-(3-(benziloxy)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	A	384,44	385,20
15		N-(5-(4-(3-fluorofenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	A	402,43	403,10
16		N-(5-(2-(benziloxy)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	A	384,44	385,20

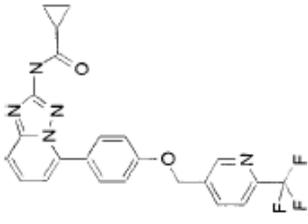
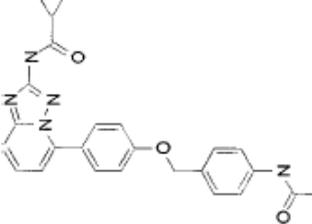
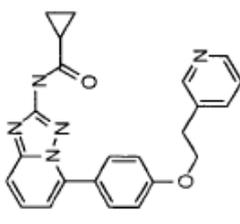
(Cont.)

36		<p>N-(5-(4-(3-(cyclopropylideneamino)pyridin-2-yl)phenyl)-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)cyclopropanocarboxamida</p>	C	385,43	408,0 (M ⁺ +Na)
37		<p>N-(5-(4-(3-(cyclopropylideneamino)pyridin-2-yl)phenyl)-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)cyclopropanocarboxamida</p>	C	385,43	408,0 (M ⁺ +Na)
38		<p>N-(5-(4-(3-(trifluorometoxi)benziloxi)fenil)-[1,2,4]triazolo [1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	C	468,44	469,0

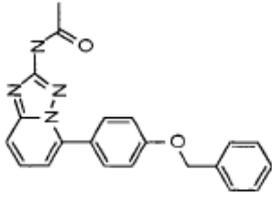
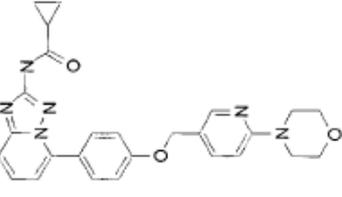
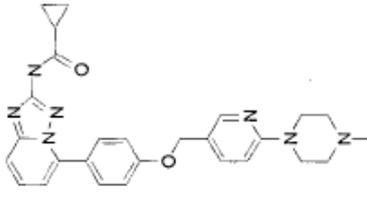
(Cont.)

46		N-(5-(4-fenoxifenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	A	370,41	371,00
57		N-(5-(6-(benziloxi)piridin-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	Descrito anteriormente	385,43	386,00
72		N-(5-(4-(benzilamino)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il) ciclopropanocarboxamida	E	383,46	384,00

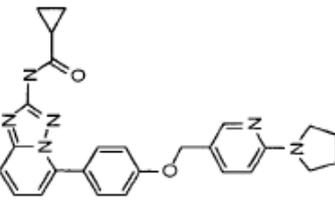
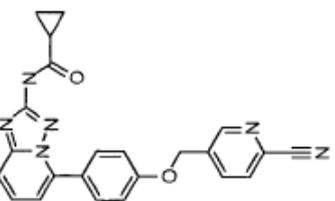
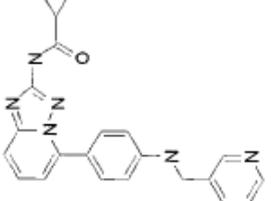
(Cont.)

78		<p>N-(5-(4-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metoxi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	C	453,43	454,00
92		<p>N-(5-(4-(4-acetamidobenziloxi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	C	441,49	442,00
127		<p>N-(5-(4-(2-(piridin-3-il)etoxi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	C	399,45	400,0

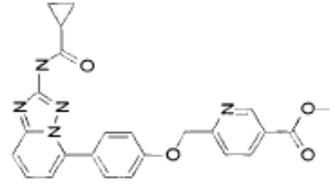
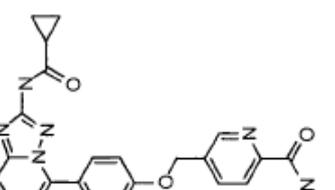
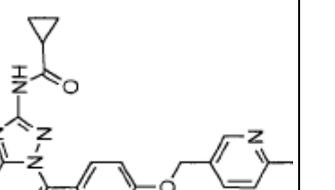
(Cont.)

163		<p>N-(5-(4-(benziloxy)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)acetamida</p>	F	358,40	359,0
165		<p>N-(5-(4-((6-morfolinopiridin-3-il)metoksi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	L	470,53	471,1
167		<p>N-(5-(4-((6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)metoksi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	L	483,58	484,1

(Cont.)

174		<p>N-(5-(4-((6-(pirrolidin-1-il)piridin-3-il)metoxi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	L	454,53	455,1
176		<p>N-(5-(4-((6-cianopiridin-3-il)metoxi)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	Procedimiento descrito anteriormente	410,44	411,0
182		<p>N-(5-(4-(piridin-3-ilmetilamino)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida</p>	E	384,44	385,0

(Cont.)

190		<p>metil 6-((4-(2-(ciclopropanocarboxamido)-[1,2,4]triazolo [1,5-a]piridin-5-il)fenilciclopropano-carboxamido)- [1,2,4] triazolo[1,5-a]piridin-5-il)fenoxi)metil) nicotinato</p>	C	443,47	444,0
192		<p>5-((4-(2-(ciclopropanocarboxamido)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)fenilciclopropanocarboxamido)-[1,2,4] triazolo[1,5-a]piridin-5-il)fenoxi)metil)picolinamida</p>	Descrito anteriormente	428,45	429,1
197		<p>{5-[4-(6-metil-piridin-3-ilmetoxi)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanecarboxílico</p>	C	399,45	400,1

(Cont.)

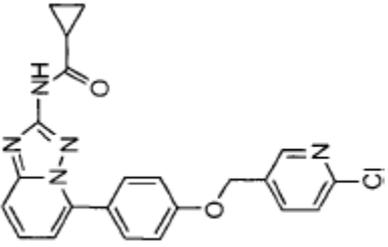
198		{5-[4-(6-cloro-piridin-3-ilmetoxi)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	C	419,87	420,0
-----	---	--	---	--------	-------

TABLA II: Datos de RMN de los compuestos de comparación y el compuesto de Fórmula Via

Nº cpd	Datos RMN (δ)
12	(^1H , CDCl_3) 8,70 (1H, b, NH), 7,97 (2H, d, ArH), 7,60-7,30 (7H, m, ArH), 7,15 (2H, m, ArH), 7,07 (1H, m, ArH), 5,17 (2H, s, CH_2), 1,60 (1H, pico bajo agua, CH), 1,21 (2H, m, CH_2), 0,94 (2H, m, CH_2)
15	(^1H , DMSO) 11,04 (1H, br, NH), 8,08 (1H, d, ArH), 7,88 (1H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,51 (2H, d, ArH), 2,48-7,30 (5H, m, ArH), 5,32 (2H, s, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,83 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
36	(^1H , DMSO) 11,03 (1H, br, NH), 8,62 (1H, m, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,89 (1H, m, ArH), 7,66 (2H, m, ArH), 7,58 (1H, d, ArH), 7,40 (1H, dd, ArH), 7,27 (1H, d, ArH), 7,21 (2H, d, ArH), 5,31 (2H, s, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,83 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
37	(^1H , DMSO) 11,01 (1H, br, NH), 8,04 (2H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,55 (2H, m, ArH), 7,50 (1H, s, ArH), 7,38 (1H, d, ArH), 7,28 (1H, d, ArH), 7,20 (2H, d, ArH), 5,30 (2H, s, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
38	(^1H , DMSO) 11,01 (1H, br, NH), 8,00 (2H, d, ArH), 7,69 (2H, d, ArH), 7,69 (1H, dd, ArH), 7,64 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, d, ArH), 7,11 (2H, d, ArH), 4,07 (2H, d, CH_2), 2,78 (1H, m, CH), 2,2-1,8 (7H, m, CH, $3\times\text{CH}_2$), 0,83 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
57	(^1H , DMSO) 11,18 (1H, br, NH), 8,01 (2H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,26 (1H, d, ArH), 7,09 (2H, d, ArH), 4,12 (2H, t, CH_2), 2,86 (2H, t, CH_2), 2,28 (6H, s, $2\times\text{CH}_3$), 2,02 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$),
72	(^1H , DMSO) 10,95 (1H, br, NH), 7,85 (2H, d, ArH), 7,61 (1H, dd, ArH), 7,51 (1H, d, ArH), 7,40 (4H, m, ArH), 7,36 (1H, m, ArH), 7,24 (1H, d, ArH), 7,09 (4H, m, ArH), 6,88 (1H, m, ArH), 6,70 (2H, d, ArH), 4,37 (2H, d, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
73	(^1H , DMSO) 11,05 (1H, s, NH), 8,09 (2H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,3-7,56 (7H, m, ArH), 7,36 (1H, m, ArH), 4,54 (1H, b, CH), 3,80 (2H, m, CH_2), 3,06 (1H, br, CH), 2,02-1,80 (4H, br, $2\times\text{CH}$, CH_2), 1,58 (2H, m, CH_2), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
78	(^1H , DMSO) 11,05 (1H, s, NH), 8,09 (2H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,3-7,56 (7H, m, ArH), 7,36 (1H, m, AcH), 4,54 (1H, b, CH), 3,80 (2H, m, CH_2), 3,06 (1H, br, CH), 2,02-1,80 (4H, br, $2\times\text{CH}$, CH_2), 1,58 (2H, m, CH_2), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
92	(^1H , DMSO) 11,03 (1H, br, NH), 10,01 (1H, br, NH), 8,00 (2H, d, ArH), 7,65 (4H, m, ArH), 7,41 (2H, d, ArH), 7,27 (1H, m, ArH), 7,17 (2H, d, ArH), 5,15 (2H, s, CH_2), 2,04 (4H, m, CH_3 , CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$),
127	(^1H , DMSO), 10,98 (1H, s, NH), 8,63 (1H, s, ArH), 8,51 (1H, m, ArH), 8,00 (2H, d, ArH), 7,91 (1H, d, ArH), 7,64 (2H, m, ArH), 7,46 (1H, m, ArH), 7,24 (1H, m, ArH), 7,13 (2H, m, ArH), 4,36 (2H, t, CH_2), 3,14 (2H, t, CH_2), 2,04 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$),
163	(^1H , DMSO) 10,72 (1H, br, NH), 7,99 (2H, m, ArH), 7,65 (2H, b, ArH), 7,48 (4H, b, ArH), 7,18 (2H, m, ArH), 5,21 (2H, d, CH_2), 2,12 (3H, br, CH_3)
165	(^1H , DMSO) 8,26 (1H, d, ArH), 8,01 (2H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,62 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, d, ArH), 7,17 (2H, d, ArH), 6,87 (1H, d, ArH), 5,10 (2H, s, CH_2), 3,69 (4H, t, $2\times\text{CH}_2$), 3,46 (4H, t, $2\times\text{CH}_2$), 2,07 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
167	(^1H , DMSO) 11,00 (1H, br, NH), 10,03 (1H, br, NH), 8,31 (1H, d, ArH), 8,03 (2H, d, ArH), 7,76 (1H, d, ArH), 7,69 (1H, m, ArH), 7,63 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, m, ArH), 7,18 (2H, m, ArH), 7,00 (1H, d, ArH), 5,12 (2H, s, CH_2), 4,41 (2H, br, CH_2), 3,49 (2H, br, CH_2), 3,15 (4H, br, $2\times\text{CH}_2$), 2,84 (3H, s, CH_3), 2,04 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
174	(^1H , DMSO) 11,02 (1H, br, NH), 8,14 (1H, s, ArH), 8,03 (3H, m, ArH), 7,66 (2H, m, ArH), 7,27 (1H, d, ArH), 7,20 (2H, dd, ArH), 7,10 (1H, d, ArH), 5,17 (2H, s, CH_2), 3,53 (4H, t, $2\times\text{CH}_2$), 2,02 (5H, t, $2\times\text{CH}_2$, CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$),
176	(^1H , DMSO) 11,0 (1H, br, NH), 8,89 (1H, s, ArH), 8,16 (1H, d, ArH), 8,09 (1H, d, ArH), 8,04 (2H, d, ArH), 7,67 (2H, m, ArH), 7,27 (1H, d, ArH), 7,23 (2H, d, ArH), 5,41 (2H, s, CH_2), 2,04 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$),

(Cont.)

182	(¹ H, DMSO) 10,94 (1H, b, NH), 8,62 (1H, s, ArH), 8,46 (1H, d, ArH), 7,86 (2H, d, ArH), 7,78 (1H, d, ArH), 7,62 (1H, dd, ArH), 7,51 (1H, d, ArH), 7,37 (1H, m, ArH), 6,89 (1H, m, NH), 6,73 (2H, d, ArH), 6,57 (1H, s, ArH), 4,42 (2H, d, CH ₂), 2,05 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂),
190	(¹ H, DMSO) 11,04 (1H, br, NH), 9,11 (1H, s, ArH), 8,38 (1H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,69 (3H, m, ArH), 7,22 (3H, m, ArH), 5,41 (2H, s, ArH), 3,90 (3H, s, ArH), 2,04 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂),
192	(¹ H, DMSO) 11,07 (1H, b, NH), 8,76 (1H, s, ArH), 8,16 (1H, br, ArH), 8,09 (2H, s, ArH), 8,03 (2H, d, ArH), 7,68 (3H, m, ArH), 7,28 (1H, d, ArH), 7,23 (2H, d, ArH), 5,38 (2H, s, CH ₂), 2,02 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂),
197	(¹ H, DMSO) 10,99 (1H, b, NH), 8,57 (1H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,79 (1H, dd, ArH), 7,69 (1H, dd, ArH), 7,63 (1H, dd, ArH), 7,29 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, dd, ArH), 7,20 (2H, d, ArH), 5,22 (2H, s, CH ₂), 2,50 (3H, s, CH ₃), 2,03 (1H, b, CH), 0,81 (4H, m, CH ₂),
198	(¹ H, DMSO) 10,99 (1H, b, NH), 8,56 (1H, m, ArH), 8,03 (2H, d, ArH), 7,99 (1H, dd, ArH), 7,69 (1H, dd, ArH), 7,63 (1H, dd, ArH), 7,58 (1H, d, ArH), 7,27 (1H, dd, ArH), 7,21 (2H, d, ArH), 5,29 (2H, s, CH ₂), 2,04 (1H, b, CH), 0,81 (4H, m, CH ₂),

Ejemplos biológicos

Ejemplo 1 - Ensayos in vitro

5 Ejemplo 1.1 Ensayo de inhibición JAK1

Se adquirió dominio catalítico de JAK1 recombinante humana (aminoácidos 850-1.154, número de catálogo 08-144) en Cama Biosciences. Se incubaron 10 ng de JAK1 con 12,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo de Sigma P0275) en tampón de reacción de quinasa (15 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,01% de Tween-20, 10 mM MgCl₂, 2 µM ATP no radiactivo, 0,25 µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contienen compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final del 1%), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, con fondo en V). Después de 45 min a 30°C, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. La totalidad de la reacción de quinasa terminada fue transferida a placas prelavadas de filtro de 96 pocillos (ácido fosfórico 75 mM) (número de catálogo de Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución ácido fosfórico 75 mM y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y se realizó una lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) de las cpm obtenidas en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

20 Porcentaje de inhibición = ((cpm determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente - cpm determinada para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinada en presencia de vehículo - cpm determinada para la muestra con inhibidor de control positivo)) * 100%.

25 Se prepararon diluciones en serie de dosificación para los compuestos que permitían el ensayo de efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK1 y el cálculo del valor IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó rutinariamente a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM - 6,67 µM - 2,22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujeron las concentraciones superiores (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Puntuación semi-cuantitativa:

- * > 501 nM
- 30 ** 101 - 500 nM
- *** 0,1 - 100 nM

TABLA III: Valores IC₅₀ de JAK1 de los compuestos

Nº cpd	JAK1		Nº cpd	JAK1
12	***		163	***
14	**		165	**
15	***		167	**
36	***		174	*
37	***		176	***
38	**		182	***
57	***		190	***
72	***		192	***
78	***	G100833	197	***
92	***	G106233	198	***
127	**			

Ejemplo 1.2 Ensayo de inhibición de JAK2

Se adquirió dominio catalítico JAK2 humana recombinante (aminoácidos 808-1.132, número de catálogo PV4210) en Invitrogen. Se incubaron 0.025 mU de JAK2 con 2,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma P0275) en tampón de reacción de quinasa (5 mM MOPS pH 7,5, 9 mM MgAc, 0,3 mM EDTA, 0,06% de Brij y 0,6 mM DTT, 1 µM ATP no radiactivo, 0,25 µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contiene compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, con fondo en V). Después de 90 minutos a 30°C, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. La totalidad de la reacción de quinasa terminada fue transferida a placas de filtro de 96 pocillos prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) (número de catálogo Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución ácido fosfórico 75 mM y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y se realizó una lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) de las cpm obtenidas en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = ((cpm determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente - cpm determinada para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinada en presencia de vehículo - cpm determinada para la muestra con inhibidor de control positivo)) * 100%.

Se prepararon diluciones en serie de dosis para los compuestos que permiten en ensayo de los efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK2 y el cálculo del valor IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó rutinariamente a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM - 6,67 µM - 2,22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final del 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuestos aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujo la concentración superior (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Puntuación Semi-cuantitativa:

> 501 nM

101-500 nM

1 - 100 nM

30

TABLA IV: Valores IC₅₀ de JAK2 de los compuestos

Nº cpd	JAK2
12	###
14	#
36	###
37	###
57	###
72	###
78	###
92	##
163	####
176	###
197	###
198	###

Ejemplo 1.3 Ensayo de inhibición de JAK3

Se adquirió dominio catalítico JAK3 humana recombinante (aminoácidos 781-1.124, número de catálogo PV3855) en Invitrogen. Se incubaron 0,025 mU de JAK3 con 2,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma P0275) en tampón de reacción de quinasa (25 mM Tris pH 7,5, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM Na₃VO₄, b-glicerolfosfato 5 mM, 0,01% de Triton X-100, ATP 1 µM no radiactivo, 0,25 µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contenían compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, con fondo en V). Después de 105 minutos a 30°C, las reacciones se inactivaron mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. Todas las reacciones de quinasa terminadas se transfirieron a placas prelavadas de filtro (ácido fosfórico 75 mM) de 96 pocillos (número de catálogo Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución ácido fosfórico 75 mM y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, la parte superior de las placas se selló y se realizó una lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) de las cpm obtenidas en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = ((cpm determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente - cpm determinada para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinada en presencia de vehículo - cpm determinada para la muestra con inhibidor de control positivo)) * 100%.

Se preparó una serie de diluciones de dosis para los compuestos que permitían el ensayo de los efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK3 y el cálculo del valor IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó rutinariamente a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM - 6,67 µM - 2,22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuestos aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujo la concentración superior (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Puntuación semi-cuantitativa:

JAK 3

+ > 501 nM

++ 101 - 500 nM

TABLA V: Valores IC₅₀ de JAK3 de los compuestos

Nº cpd	JAK3
12	+++
15	++
36	++
37	+
57	+
72	+
78	++
163	++
176	+++

Ejemplo 1.4 Ensayo de inhibición de TYK2

5 Se adquirió dominio catalítico TYK2 humano recombinante (aminoácidos 871-1.187, número de catálogo 08-147) de
 Cama Biosciences. Se incubaron 5 ng de TYK2 con 12,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma P0275) en
 tampón de reacción quinasa (Hepes 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Na₃VO₄ 0,2 mM, 0,1% NP-40, ATP 0,1 µM no
 radiactivo, 0,125 µCi ³³P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5
 µl que contenían compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en
 10 una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, con fondo en V). Después de 90 minutos a 30°C, las reacciones se
 inactivaron mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. La totalidad de reacciones quinasa terminadas
 se transfirieron a placas de filtro prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) de 96 pocillos (número de catálogo Perkin Elmer
 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una
 solución ácido fosfórico 75 mM y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se
 15 selló la parte superior de las placas y se realizó la lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se
 calculó restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina
 10 µM) de la cpm obtenida en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad
 se determinó como:

20 Porcentaje de inhibición = ((cpm determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente - cpm determinada
 para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinada en presencia de vehículo - cpm
 determinada para la muestra con inhibidor de control positivo)) * 100%.

25 Se preparó una serie de diluciones de dosis para los compuestos que permitían el ensayo de los efectos de dosis-
 respuesta en el ensayo de TYK2 y el cálculo del valor IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó
 rutinariamente a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM - 6,67 µM - 2,22 µM -
 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27nM - 9 nM) en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando la potencia de una serie de
 compuestos aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujo la concentración superior (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Puntuación semi-cuantitativa:

* > 1.001 nM

** 501-1.000 nM

*** 101-500 nM

30 **** 1 - 100 nM

TABLA VI: Valores IC₅₀ de Tyk2 de los compuestos

Nº cpd	TYK2
15	*
36	***
37	**
57	*
72	*
92	*
163	*
176	****

Ejemplo 2. Ensayos celulares

Ejemplo 2.1 Ensayo de señalización JAK-STAT:

5 Células HeLa se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% suero fetal de ternera inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100 µg de estreptomina/ml. Las células HeLa se usaron a una confluencia del 70% para la transfección. Se transfectaron, transitoriamente, 20.000 células en 87 µl medio de cultivo de células con 40 ng de pSTAT1 (2)-luciferasa (Panomics), 8 ng de LacZ informante como informante de control interno y 52 ng de pBSK usando 0,32 µl de Jet-PEI (Polyplus) como reactivo de transfección por pocillo en formato de placa de 96 pocillos.

10 Después de una incubación durante la noche a 37°C, 10% de CO₂, se eliminó el medio de transfección. Se añadieron 75 µl de DMEM + 1,5.% de suero de ternera fetal inactivado por calor. Se añadieron 15 µl del compuesto a una concentración 6,7 x durante 60 minutos y, a continuación, 10 µl de OSM humana (Peprtech) a una concentración final de 33 ng/ml.

Todos los compuestos se ensayaron por duplicado empezando a 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 dosis en total (20 µM - 6,6 µM - 2,2 µM - 740 nM - 250 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) a una concentración final de 0,2% de DMSO.

15 Después de una incubación durante la noche a 37°C, 10% de CO₂, las células se lisaron en 100 µl/pocillo de tampón de lisis (PBS, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5% de trehalosa, 0,025% Tergitol NP9, 0,15% de BSA).

Se usaron 40 µl de lisado celular para leer la actividad β-galactosidasa mediante la adición de 180 µl de solución βGal (tampón de 30 µl ONPG 4mg/ml + 150 µl β-galactosidasa (Na₂HPO₄ 0,06 M, NaH₂PO₄ 0,04 M, MgCl₂ 1 mM)) durante 20 minutos. La reacción se inactivó mediante la adición de 50 µl de Na₂CO₃ 1 M. La absorbancia se leyó a 405 nm.

20 La actividad de luciferasa se midió usando 40 µl de lisado de células más 40 µl de Steadylite[®], como describe el fabricante (Perkin Elmer), en el Envision (Perkin Elmer).

Se usaron 10 µM de un inhibidor pan-JAK como control positivo (100% de inhibición). Como control negativo, se usó 0,5% de DMSO (0% de inhibición). Los controles positivos y negativos se usaron para calcular los valores z' y "porcentaje de inhibición" (PIN).

25 Porcentaje de inhibición = ((fluorescencia determinada en presencia de vehículo - fluorescencia determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente) dividido por (fluorescencia determinada en presencia de vehículo - fluorescencia determinada para la muestra sin desencadenante)) * 100%.

Los valores de PIN se representaron para los compuestos ensayados en dosis-respuesta y se derivaron los valores de EC₅₀.

30

Tabla VII: Valores EC₅₀ de señalización JAK-STAT

* > 1.001 nM	
** 501 – 1.000 nM	
*** 101 – 500 nM	
**** 1 – 100 nM	
Nº cpd	EC ₅₀ (nM)
12	***
14	*
15	***
36	***
37	**
57	*
72	*
78	*
92	*
163	*
176	****
182	*
190	*
192	***
197	***
198	***

Ejemplo 2.2 Ensayo de señalización OSM/IL-1 β

5 Se mostró que OSM e IL-1 β regulan de manera ascendente, sinérgicamente, los niveles MMP 13 en la línea celular humana condrosarcoma SW1353. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo en un volumen de 120 μ l de DMEM (Invitrogen) que contenía el 10% (v/v) de FBS y el 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) incubado a 37°C 5% de CO₂. Las células se preincubaron con 15 μ l de compuesto en medio M199 con 2% de DMSO 1 hora antes de la activación con 15 μ l de OSM e IL-1 β para conseguir 25 ng/ml de OSM y 1 ng/ml de IL-1 β , y los niveles de MMP13 se midieron en un medio acondicionado 48 horas después de la activación. La actividad MMP13 se midió usando un ensayo de actividad de captura de anticuerpos. Para este propósito, placas de 384 pocillos (NUNC, 460518, negro Maxisorb) se recubrieron con 35 μ l de una solución de 1,5 μ g/ml de anticuerpo anti-humano MMP13 (R&D Systems, MAB511) durante 24 horas a 4°C. Después de lavar los pocillos 2 veces con PBS + 0,05% de Tween, los sitios de unión restantes se bloquearon con 100 μ l de leche seca sin grasa al 5% (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) en PBS durante 24 horas a 4°C. A continuación, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS + 0,05% de Tween y se añadieron 35 μ l de una dilución 1/10 de sobrenadante de cultivo que contenía MMP13 en tampón de bloqueo diluido 100 veces y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con PBS + 0,05% de Tween seguido de activación de MMP13 mediante la adición de 35 μ l de una solución 1,5 mM de acetato de 4-aminofenilmercúrico (APMA) (Sigma, A9563) e incubación a 37°C durante 1 hora. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS + 0,05% de Tween y se añadieron 35 μ l de sustrato MMP13 (Biomol, P-126, sustrato fluorogénico OmniMMP). Después de una incubación durante 24 horas a 37°C, la fluorescencia del sustrato convertido se midió en un Perkin Elmer Wallac EnVision 2102 Multilabel Reader (longitud de onda de excitación: 320 nm, longitud de onda de emisión: 405 nm).

Porcentaje de inhibición = ((fluorescencia determinada en presencia de vehículo - fluorescencia determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente) dividido por (fluorescencia determinada en presencia de vehículo - fluorescencia determinada para la muestra sin desencadenante)) * 100%.

* > 1.001 nM

5 ** 501-1000 nM

*** 1 - 500 nM

TABLA VIII: Valores EC₅₀ de MMP13

Nº cpd	EC ₅₀ (nM)
12	*
15	*
36	**
37	*
57	*
72	**
78	**
163	*
176	***
182	*
192	*
197	*
198	*

10 **Ejemplo 2.3 Ensayo de proliferación PBL**

Los linfocitos de sangre periférica humana (PBL) se estimularon con IL-2 y la proliferación se midió usando un ensayo de incorporación de BrdU. Los PBL se estimularon, en primer lugar, durante 72 horas con PHA para inducir el receptor IL-2, se mantuvieron en ayunas durante 24 horas para detener la proliferación celular, seguido de estimulación de IL-2 durante otras 72 horas (incluyendo 24 horas de etiquetado BrdU). Las células se preincubaron con compuestos de ensayo 1 hora antes de la adición de IL-2. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía el 10% (v/v) de FBS.

15

Ejemplo 3. Modelos in vivo

Ejemplo 3.1 Modelo CIA

3.1.1 Materiales

Se adquirieron adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) en Difco. Se obtuvieron colágeno bovino de tipo II (CII), lipopolisacárido (LPS) y Enbrel en Chondrex (Isle d'Abeau, Francia); Sigma (P4252, l'Isle d'Abeau, Francia), Whyett (25 mg de jeringa inyectable, Francia) Acros Organics (Palo Alto, CA), respectivamente. Todos los demás reactivos usados eran de grado reactivo y todos los disolventes eran de grado analítico.

20

3.1.2 Animales

Se obtuvieron ratas Agouti oscuras (machos, de 7-8 semanas de edad) en Harlan Laboratories (Maison-Alfort, Francia). Las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (07:00 - 19:00). La temperatura se mantuvo a 22°C, y se proporcionaron comida y agua *ad libitum*.

25

3.1.3 Artritis inducida por colágeno (CIA)

Un día antes del experimento, se preparó una solución CII (2 mg/ml) con ácido acético 0,05 M y se almacenó a 4°C. Justo antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes iguales de adyuvante (IFA) y CII mediante un homogeneizador en una botella de vidrio pre-enfriada en un baño de agua con hielo. Podría requerirse adyuvante adicional y homogeneización prolongada si no se forma una emulsión. Se inyectaron 0,2 ml de la emulsión por vía intradérmica en la base de la cola de cada rata en el día 1, una segunda inyección intradérmica de refuerzo (solución CII a 2 mg/ml en solución salina CFA 0,1 ml) se aplicó en el día 9. Este procedimiento de inmunización se modificó con relación a los procedimientos publicados (Sims et al., 2004; Jou et al., 2005).

3.1.4 Diseño del estudio

Los efectos terapéuticos de los compuestos de ensayo se ensayaron en el modelo de CIA en ratas. Las ratas se dividieron aleatoriamente en grupos iguales y cada grupo contenía 10 ratas. Todas las ratas se inmunizaron en el día 1 y con refuerzo el día 9. La dosificación terapéutica duró desde el día 16 al día 30. El grupo de control negativo se trató con vehículo (MC 0,5%) y el grupo de control positivo con Enbrel (10 mg/kg, 3 veces por semana., s.c). Un compuesto de interés se ensayó típicamente en 3 dosis, por ejemplo, 3, 10, 30 mg/kg, p.o.

3.1.5 Evaluación clínica de artritis

La artritis se puntuó según el procedimiento de Khachigian 2006, Lin et al 2007 y Nishida et al. 2004. La hinchazón de cada una de las cuatro patas se clasificó con la puntuación de artritis como se indica a continuación: 0 - sin síntomas; 1 - enrojecimiento e inflamación leves, pero definitivos de un tipo de articulación, como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e inflamación aparentes limitados a dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados, 2 - enrojecimiento e inflamación moderados de dos o más tipos de articulaciones, 3 - enrojecimiento e inflamación severos de toda la pata, incluyendo dedos; 4- extremidad con máxima inflamación con afectación de múltiples articulaciones (puntuación máxima acumulativa clínica de artritis 16 por animal) (Nishida et al., 2004).

3.1.6 Cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis

Clínicamente, la pérdida de peso corporal está asociada con artritis (Shelton et al, 2005; Argiles et al, 1998; Rall, 2004; Walsmith et al, 2004). Por lo tanto, los cambios en el peso corporal después de la aparición de la artritis podrían ser usados como un criterio de evaluación no específico para evaluar el efecto de los agentes terapéuticos en el modelo de rata. El cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis se calculó como se indica a continuación:

$$\text{Ratones: } \frac{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana } 6)} - \text{Peso Corporal}_{(\text{semana } 5)}}{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana } 5)}} \times 100\%$$

$$\text{Ratas: } \frac{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana } 4)} - \text{Peso Corporal}_{(\text{semana } 3)}}{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana } 3)}} \times 100\%$$

3.1.7 Radiología

Se tomaron radiografías de las patas traseras de cada animal individual. Se asignó un número de identidad aleatorio ciego a cada una de las radiografías, y dos evaluadores independientes clasificaron la gravedad de la erosión ósea con el sistema de puntuación radiológica de Larsen, como se indica a continuación: 0 - normal con contornos óseos intactos y espacio normal de las articulaciones; 1 - leve anomalía con uno o dos cualesquiera de los huesos metatarsianos exteriores mostrando una leve erosión ósea, 2 - anomalía temprana definitiva en la que cualquiera de entre tres a cinco de los huesos metatarsianos exteriores muestran erosión ósea; 3 - anomalía destructiva media en la que todos los huesos metatarsianos exteriores, así como uno o dos cualesquiera de los huesos metatarsianos interiores, muestran erosiones óseas definidas, 4 - anomalía destructiva grave en la que todos los huesos metatarsianos muestran erosión ósea definida y al menos una de las articulaciones metatarsianas interiores está completamente erosionada, conservándose parcialmente una parte del contorno de la articulación ósea, 5 - anomalía mutilante sin contornos óseos. Este sistema de puntuación es una modificación de Salvemini et al, 2001; Bush et al, 2002; Sims et al, 2004; Jou et al, 2005.

3.1.8 Histología

Después de un análisis radiológico, las patas traseras de los ratones se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 10% (pH 7,4), se descalcificaron con descalcificante óseo rápido para histología fina (Laboratorios Eurobio) y se incluyeron en parafina. Para garantizar una evaluación extensiva de las articulaciones artríticas, se cortaron al menos cuatro secciones en serie (5 µm de espesor) y cada serie de secciones tenía una separación de 100 µm. Las secciones se tizaron con hematoxilina y eosina (H&E). Se realizaron exámenes histológicos a doble ciego para la inflamación sinovial y daño del hueso y del cartílago. En cada pata, se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron la infiltración celular, la gravedad de pannus, la erosión del cartílago y la erosión ósea. La puntuación se realizó como se indica a continuación: 1 - normal, 2 - leve, 3 - moderada, 4 - marcada. Estas cuatro puntuaciones se sumaron y se representaron como una puntuación adicional, concretamente, la "puntuación RA total".

3.1.9 Análisis de micro-tomografía computarizada (µCT) del calcáneo (hueso del talón):

La degradación ósea observada en RA ocurre especialmente en el hueso cortical y puede ser revelada mediante un análisis µCT (Sims NA et al, 2004; Oste L et al, ECTC Montreal 2007). Después de la exploración y reconstrucción de volumen 3D del hueso calcáneo, la degradación ósea se midió como el número de objetos discretos presentes por portaobjetos, aislados *in silico* en perpendicular al eje longitudinal del hueso. Cuanto mayor era la cantidad de hueso degradado, mayor era la cantidad de objetos discretos medidos. Se analizaron 1.000 secciones, distribuidas uniformemente, a lo largo del calcáneo (separadas por aproximadamente 10,8 µm).

3.1.10 Resultados

El compuesto 176 era eficaz en todas las lecturas realizadas en el estudio CIA en ratas. Se obtuvo una significación estadística para 3 mg/kg en la puntuación clínica y las lecturas de inflamación de patas. Los compuestos adicionales seleccionados se ensayaron también en el estudio CIA en ratas. El compuesto de comparación 36 era activo a 30 mg/kg. El compuesto de comparación 37 era activo a 10 mg/kg.

Ejemplo 3.2 modelo de shock séptico

La inyección de lipopolisacárido (LPS) induce una liberación rápida del factor de necrosis tumoral soluble (TNF-alfa) a la periferia. Este modelo se usa para analizar los bloqueadores prospectivos de la liberación de TNF *in vivo*.

Se trataron seis ratones BALB/cJ hembra (20 g) por grupo a la dosificación deseada, po, una vez. Treinta minutos más tarde, se inyectó, ip, LPS (15 µg/kg; *E. Coli* serotipo 0111:B4). Noventa minutos después, los ratones se sacrificaron y se recogió la sangre. Los niveles de TNF alfa circulante se determinaron usando kits ELISA disponibles comercialmente. Se usó dexametasona (5 µg/kg) como compuesto antiinflamatorio de referencia. Los compuestos seleccionados se ensayaron a una o múltiples dosis, por ejemplo, 3 y/o 10 y/o 30 mg/kg, po.

El compuesto 176 exhibió una reducción estadísticamente significativa en la liberación de TNF (> 50%) a 3, 10 y 30 mg/kg po.

Los compuestos adicionales seleccionados se ensayaron también en el modelo de shock séptico. El compuesto de comparación 36 era activo a 30 mg/kg. Los compuestos de comparación 37 y 197 eran activos a 3 mg/kg.

35 Ejemplo 3.3 Modelo MAB

El modelo MAB permite una evaluación rápida de la modulación de una respuesta inflamatoria similar a RA por sustancias terapéuticas (Kachigian LM Nature Protocols (2006): 2.512-2.516. Collagen antibody-induced arthritis). Se inyectó, iv, a ratones DBA/J un cóctel de mAbs dirigido contra colágeno II. Un día más tarde, se inició el tratamiento con el compuesto (vehículo: 10% (v/v) HPβCD). Tres días más tarde, los ratones recibieron, ip, una inyección de LPS (50 µg/ratón), resultando en una aparición rápida de la inflamación. El tratamiento con compuesto se continuó hasta 10 días después de la inyección de mAb. La inflamación se leyó midiendo la hinchazón de la pata y registrando la puntuación clínica de cada pata. La puntuación acumulativa de artritis clínica de cuatro extremidades se presentó para mostrar la gravedad de la inflamación. Se aplica un sistema de puntuación a cada extremidad usando una escala de 0-4, correspondiendo el valor 4 a la inflamación más grave.

0	Sin síntomas
1	Enrojecimiento e inflamación leves pero definitivos de un tipo de articulación, como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e inflamación aparentes limitados a dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados
2	Enrojecimiento e inflamación moderados de dos o más tipos de articulaciones

- 3 Enrojecimiento e hinchazón severos de toda la pata, incluyendo los dedos
- 4 Extremidad con máxima inflamación con afectación de múltiples articulaciones

El compuesto 176, dosificado po a entre 10 y 30 mg/kg redujo la puntuación clínica con una significación estadística a 30 mg/kg y redujo significativamente la inflamación a ambas dosis de 10 y 30 mg/kg.

- 5 Se ensayaron también compuestos de comparación adicionales seleccionados en el modelo MAC. Los compuestos de comparación 36 y 37 eran activos a 30 mg/kg.

Ejemplo 3.4 Modelos de oncología

Modelos *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas hacia enfermedades mileoproliferativas impulsadas por JAK2 se describen por Wernig et al. Cancer Cell 13, 311, 2008 y Geron et al. Cancer Cell 13, 321, 2008.

Ejemplo 3.5 Modelo IBD en ratones

- 10 Los modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas hacia IBD se describen en Wirtz et al. 2007.

Ejemplo 3.6 Modelo de asma en ratones

Los modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas hacia el asma se describen en Nials et al, 2008; Ip et al. 2006; Pernis et al, 2002; Kudlacz et al, 2008.

Ejemplo 4: Toxicidad, DMPK y modelos de Seguridad

- 15 **Ejemplo 4.1 Solubilidad termodinámica**

Se prepara una solución de 1 mg/ml del compuesto de ensayo en un tampón de fosfato 0,2 M pH 7,4 o un tampón de citrato 0,1 M pH 3,0 a temperatura ambiente en un vial de vidrio.

Las muestras se hacen girar en una unidad Rotator STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) a una velocidad de 3,0 a temperatura ambiente durante 24 horas.

- 20 Después de 24 horas, 800 µl de la muestra se transfieren a un tubo Eppendorf y se centrifugan 5 minutos a 14.000rpm. A continuación, se transfieren 200 µl del sobrenadante de la muestra a una placa de solubilidad MultiscreenR (Millipore, MSSLBPC50) y el sobrenadante se filtra (10-12 "Hg) con la ayuda de un colector de vacío en una placa Greiner transparente de 96 pocillos de polipropileno con fondo en V (Nº Cat 651201). Se diluyen 5 µl del filtrado en 95 µl (F20) del mismo tampón usado para la incubación en la placa que contiene la curva estándar (Greiner, Nº cat. 651201).

- 25 La curva estándar para el compuesto se prepara fresca en DMSO, a partir de una solución 10mM madre DMSO diluida con un factor 2 en DMSO (5.000 µM) y, a continuación, diluida en DMSO hasta 19,5 µM. A continuación, se transfieren 3 µl de la serie de diluciones a partir de 5.000 µM a 97 µl de una mezcla (50/50) acetonitrilo-tampón. El intervalo de concentración final era de 2,5 a 150 µM.

- 30 La placa se sella con esteras de sellado (MA96RD-04S, www.kinesis.co.uk) y las muestras se miden a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) bajo condiciones optimizadas usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

- 35 Las muestras se analizan en LCMS con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El disolvente A es amoníaco 15 mM y el disolvente B es acetonitrilo. Las muestras se pasan bajo un spray de iones positivos en una columna XBridge C18 3,5 µM (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 minutos y varía del 5% de B al 95% de B.

Las áreas de pico se analizan con la ayuda del paquete de software Masslynx y las áreas de los picos de las muestras se representan frente a la curva estándar para obtener la solubilidad del compuesto.

Los valores de solubilidad se indican en µM o µg/ml.

Ejemplo 4.2 Solubilidad acuosa

- 40 Partiendo de una solución madre 10 mM en DMSO, se preparan una serie de diluciones del compuesto en DMSO. La serie de diluciones se transfiere a una placa 96 NUNC Maxisorb de fondo plano (Nº Cat 442404) y se añade tampón de fosfato 0,2 M pH 7,4 o tampón de citrato de 0,1 M pH 3,0 a temperatura ambiente.

La concentración final varió de 200 μM a 2,5 μM en 5 pasos de dilución iguales. La concentración final de DMSO no superó el 2%. Se añadieron 200 μM de pireno a los vértices de cada placa de 96 pocillos y estos sirven como punto de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

5 Las placas de ensayo se sellan y se incuban durante 1 hora a 37°C con agitación a 230 rpm. A continuación, las placas se escanean con un microscopio de luz blanca, proporcionando imágenes individuales del precipitado por cada concentración. El precipitado se analiza y se convierte en un número que se traza en un gráfico. La primera concentración a la que el compuesto aparece completamente disuelto es la concentración indicada, sin embargo, la concentración real se encuentra en algún lugar entre esta concentración y una etapa de dilución superior.

Los valores de solubilidad se indican en $\mu\text{g/ml}$.

10 **Ejemplo 4.3 Unión de proteínas plasmáticas (diálisis de equilibrio)**

Una solución madre 10 mM del compuesto en DMSO se diluye con un factor de 5 en DMSO. Esta solución se diluye adicionalmente en plasma recién descongelado, de ser humano, rata, ratón o perro (BioReclamation INC) con una concentración final de 10 μM y la concentración final de DMSO del 0,5% (5,5 μl en 1.094,5 μl de plasma en un dispositivo PP-Masterblock de 96 pocillos (Greiner, N° Cat 780285)).

15 Se prepara y se llena una placa Pierce Red Device con inserciones (ThermoScientific, N° Cat. 89809) con 750 μl de PBS en la cámara de tampón y 500 μl del plasma enriquecido en la cámara de plasma. La placa se incuba durante 4 horas a 37°C con agitación a 230 rpm. Después de la incubación, se transfieren 120 μl de ambas cámaras a 360 μl de acetonitrilo en placas de 96 pocillos, de fondo redondo, profundos PP (Nunc, N° Cat 278743) y se sellan con una tapa de lámina de aluminio. Las muestras se mezclan y se colocan en hielo durante 30 minutos. A continuación, esta placa se centrifuga durante 30 minutos a 1200 rcf a 4°C y el sobrenadante se transfiere a una placa PP de 96 pocillos de fondo en v (Greiner, 651201) para un análisis de LCMS.

La placa se sella con esteras de sellado (MA96RD-04S) de www.kinesis.co.uk y las muestras se miden a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) bajo condiciones optimizadas usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

25 Las muestras se analizan en LCMS con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El disolvente A era amoníaco 15 mM y el disolvente B era acetonitrilo. La muestra se pasó bajo un spray de iones positivos en una columna XBridge C18 3,5 μM (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo total de ejecución de 2 minutos y varía de 5% de B a 95% de B.

30 Se consideró que el área del pico del compuesto en la cámara de tampón y la cámara de plasma eran el 100% de compuesto. El porcentaje unido a plasma se derivó de estos resultados y se pasó a LIMS como un porcentaje unido al plasma.

La solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en PBS se inspeccionó mediante microscopio para indicar si se observa o no precipitación.

Ejemplo 4.4 Posibilidad de prolongación QT

35 La posibilidad de prolongación de QT se evaluó en el ensayo de fijación de parche hERG.

4.4.1 Fijación de parche de células enteras convencional

40 Se registraron las fijaciones de membrana en células enteras usando un amplificador EPC10 controlado por el software Pulse v8.77 (HEKA). Típicamente, la resistencia en serie era menor de 10 M Ω y se compensó para un valor mayor del 60%, a los registros no se les aplicó sustracción de fugas. Los electrodos se fabricaron a partir de pipetas de vidrio GC 150TF (Harvard), la resistencia era de entre 2 y 3 M Ω .

La solución de baño externo contenía: NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, glucosa 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4.

La solución de pipeta de membrana interna contenía: Kgluconate 100 mM, KCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂ATP 5 mM, glutatión 2 mM, EGTA 11 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2.

Los fármacos se perfundieron usando un sistema de perfusión rápida Biologic MEV-9/EVH-9.

45 Todos los registros se realizaron sobre canales hERG que expresaban, de manera estable, células HEK293. Las células se cultivaron en cubreobjetos redondos de 12 mm (German glass, Bellco) anclados en la cámara de registro mediante dos varillas de platino (Goodfellow). Se provocaron corrientes de hERG usando un impulso de activación a +40 mV durante 1.000 ms seguido de un impulso final de corriente a -50 mV durante 2.000 ms, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se aplicaron impulsos cada 20 s y todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

4.4.2 Análisis de datos

Se calcularon los valores IC₅₀ e IC₂₀ para cada compuesto ensayado. Se calcula la proporción de la diferencia entre el valor IC₂₀ y las concentraciones C_{max} no unidas del compuesto de ensayo obtenidas a las dosis terapéuticas relevantes, como se determinan por los resultados obtenidos a partir del modelo de CIA en ratas.

- 5 Para las curvas de respuesta a concentración, la amplitud de pico de corriente final se midió durante la etapa de voltaje a -50 mV. Se realiza un ajuste de la curva de datos de respuesta a concentración usando la ecuación:

$$y = a + [(b - a) / (1 + 10^{-(\log c - x) d})]$$

- 10 en la que a es la respuesta mínima, b es la respuesta máxima y d es la pendiente Hill; esta ecuación puede usarse para calcular tanto IC₅₀ (en la que y = 50 y c es el valor IC₅₀) como IC₂₀ (en la que y = 20 y c es el valor IC₂₀). Se usó el software GraphPad® Prism® (Graphpad® Software Inc.) para todos los ajustes de curvas.

La Tabla IX, a continuación, resume los resultados obtenidos para los compuestos seleccionados ensayados.

TABLA IX

Compuesto	Dosis	Proporción de diferencia
37	10	7
176	3	137
176	10	82

- 15 Una diferencia de 100 veces o superior indica una baja posibilidad de prolongación de QT. Por lo tanto, puede observarse que, en comparación con el compuesto de comparación 37, el compuesto 176 tiene un problema de una posibilidad de prolongación de QT mucho menor.

Ejemplo 4.5 Estabilidad microsomal

- 20 Una solución madre 10 mM de compuesto en DMSO se diluyó 1.000 veces en un tampón fosfato 1 mM pH 7.4 en una placa de 96 pocillos (Greiner, Cat N° 780285) y se pre-incubó a 37°C.

Se añadieron 40 µl de agua desionizada a un tubo de almacenamiento Matrix 2D de polipropileno etiquetado con un código de barras (Thermo Scientific) y se pre-incubó a 37°C.

- 25 Se preparó una solución madre de trabajo de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) en tampón de fosfato 182 mM pH 7, 4 y se colocó en hielo antes de su uso. Se preparó un co-factor que contenía MgCl₂, glucosa-6-fosfato y NADP⁺ en agua desionizada y se colocó en hielo antes de su uso.

Se preparó una solución de trabajo final que contenía microsomas de hígado (Xenotech) de una especie de interés (ser humano, ratón, rata, perro), G6PDH descrito previamente y co-factores y esta mezcla se incubó durante un tiempo no superior a 20 minutos, a temperatura ambiente.

- 30 Se añadieron 30 µl de la dilución de compuesto precalentado a 40 µl de agua precalentada en los tubos Matrix y se añadieron 30 µl de la mezcla microsomal. Las concentraciones finales de reacción eran compuesto 3 µM, 1 mg de microsomas, 0.4LU/ml de GDPDH, MgCl₂ 3,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM y NADP⁺ 1,3 mM.

Para medir el porcentaje restante de compuesto en el tiempo cero se añadió MeOH o ACN (1:1) al pocillo antes de añadir la mezcla microsomal. Las placas se sellaron con Matrix Sepra seals™ (Matrix, N° Cat. 4464) y se agitó durante unos pocos segundos para garantizar la mezcla de todos los componentes.

- 35 Las muestras que no se inactivaron se incubaron a 37°C, 300 rpm y después de 1 hora de incubación, la reacción se inactivó con MeOH o ACN (1:1).

Después de inactivar la reacción, las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 minutos para precipitar las proteínas. A continuación, las placas se centrifugaron durante 30 minutos a 1200 rcf a 4°C y el sobrenadante se transfirió a una placa PP de 96 pocillos de fondo en V (Greiner, 651201) para el análisis de LCMS.

- 40 Estas placas se sellaron con esteras de sellado (MA96RD-04S) de www.kinesis.co.uk y las muestras se midieron a

temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) bajo condiciones optimizadas usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula precursora.

5 Las muestras se analizaron en LCMS con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El disolvente A era amoníaco 15 mM y el disolvente B era metanol o acetonitrilo, dependiendo de la solución de inactivación usada. Las muestras se pasaron bajo pulverización de iones positivos en una columna XBridge C18 3,5 μ M (2,1 x 30 mm) de Waters. El gradiente de disolvente tenía un tiempo total de ejecución de 2 minutos y varió del 5% de B al 95% de B.

El área del pico del compuesto precursor en el tiempo 0 se consideró como el 100% restante. El porcentaje restante después de 1 hora de incubación se calculó desde el tiempo 0 y se calculó como el porcentaje restante. La solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en tampón se inspecciona con microscopio y se muestran los resultados.

10 Los datos sobre la estabilidad microsomal se expresan como un porcentaje de la cantidad total de compuesto restante después de 60 minutos.

TABLA X – Estabilidad microsomal

Nº de compuesto	Humano (%)	Rata (%)
12	70	94
14		
15	43	14
36	11,65	72,41
37	70,98	79,47
38		
57	42,75	34,5
72	4,88	2,2
78	78,21	93,85
92	30,21	23,6
127		
163	53,64	39,78
165		
167		
174		
176	157,1	90,21
182	19,33	19,23
190	2,13	25,64
192	127,2	77,62
197	46,6	59,41
198	65,8	72,45

Ejemplo 4.6 Permeabilidad Caco2

15 Se realizaron ensayos Caco-2 bidireccionales, como se describe a continuación. Se obtuvieron células Caco-2 de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, cat. 86010202) y se usaron después de un cultivo de células de 21 días en placas Transwell de 24 pocillos (Fisher TKT-545-020B).

Se sembraron 2×10^5 células/pocillo en un medio de revestimiento que consiste en DMEM + GlutaMAXI + 1% de NEAA +

10% de FBS (FetalClone II) + 1% de Pen/Strep. El medio se cambió cada 2-3 días.

Los compuestos de ensayo y de referencia (propranolol y rhodamine123 o vinblastina, todos ellos adquiridos en Sigma) se prepararon en solución salina equilibrada de Hanks que contenían HEPES 25 mM (pH 7,4) y se añadieron a las cámaras apical (125 µl) o basolateral (600 µl) del conjunto placa Transwell a una concentración de 10 µM con una concentración final de DMSO del 0,25%.

Se añadió amarillo Lucifer (Sigma) 50 µM al tampón donante en todos los pocillos para evaluar la integridad de las capas celulares supervisando la permeación de amarillo Lucifer. Debido a que el amarillo Lucifer (LY) no puede penetrar libremente barreras lipofílicas, un alto grado de transporte de LY indica una mala integridad de la capa de células.

Después de 1 hora de incubación a 37°C mientras se agitaba en un agitador orbital a 150 rpm, se tomaron alícuotas de 70 µl de ambas cámaras apical (A) y basal (B) y se añadieron a 100 µl de una solución de acetonitrilo:agua 50:50 que contenía un estándar analítico interno (carbamazepina 0,5 µM) en una placa de 96 pocillos.

El amarillo Lucifer se midió con un dispositivo Spectramax Gemini XS (Ex 426nm y Em 538nm) en una placa de 96 pocillos que contenía 150 µl de líquido del lado basolateral y apical.

Las concentraciones de compuesto en las muestras se midieron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Los valores de permeabilidad aparente (Pap) se calcularon a partir de la relación:

$$Pap = \frac{[Compuesto]_{\text{aceptor final}} \times V_{\text{aceptor}}}{([compuesto]_{\text{donante inicial}} \times V_{\text{donante}})} / T_{\text{inc}} \times \frac{V_{\text{donante}}}{\text{área de superficie} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/s}}$$

V = volumen de la cámara

T_{inc} = tiempo de incubación

Área de superficie = 0,33 cm²

Las relaciones de flujo de salida, como una indicación del flujo de salida activo de la superficie celular apical, se calculan usando la proporción de P_{ap} B > A/P_{ap} A > B.

Se usaron los criterios de aceptación de ensayo siguientes:

Propranolol: valor P_{ap} (A > B) ≥ 20 (x 10⁻⁶ cm/s)

Rodamina 123 o vinblastina: valor P_{ap} (A > B) < 5 (x 10⁻⁶ cm/s) con una proporción de flujo de salida ≤ 5.

Permeabilidad de amarillo Lucifer: ≤ 100 nm/s

TABLA XI: Proporción flujo de salida de Caco2

Nº de compuesto	P _{ap} A>B (x10 ⁻⁶ cm/s)	Proporción de flujo de salida
12	23,3	0,82
15	25,8	0,91
36	36,55	0,89
37	23	0,85
72	14,93	1,31
78	2	1,5
163	13,4	0,85

(Cont.)

176	10,6	0,8
192	12,5	2

Ejemplo 4.7 Estudio farmacocinético en roedores

4.7.1 Estudio farmacocinético

5 Los compuestos se formulan en mezclas de PEG200/solución fisiológica o PEG400/DMSO/ solución salina para la vía intravenosa y en 0,5% de metilcelulosa o 10-30% de hidroxipropil- β -ciclodextrina pH 3 o pH 7,4 para la vía oral. Los compuestos de ensayo se administran por vía oral como una única sonda esofágica a 5-10 mg/kg y se dosifican por vía intravenosa como un bolo a través de la vena caudal a 1 mg/kg. Cada grupo consiste en 3 ratas. Las muestras de sangre se recogen a través de la vena yugular, usando ratas canuladas, o en el seno retro-orbital con heparina de litio como anticoagulante en los puntos de tiempo en el intervalo siguiente: de 0,05 a 8 horas (vía intravenosa), y de 0,25 a 6 ó 24 horas (vía oral). Las muestras de sangre entera se centrifugan a 5.000 rpm durante 10 minutos y las muestras de plasma resultantes se almacenan a -20°C pendientes de análisis.

4.7.2 Cuantificación de los niveles de compuesto en plasma

Las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de ensayo se determinan mediante un procedimiento LC-MS/MS en el que el espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de electropulverización positiva.

15 4.7.3 Determinación de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se calculan usando Winnonlin[®] (Pharsight[®], United

Ejemplo 4.8 Estudio de toxicidad de 7-días en ratas

20 Se realizó un estudio de toxicidad oral de 7-días con los compuestos de ensayo en ratas Sprague-Dawley macho para evaluar su potencial tóxico y su toxicocinética, a dosis diarias de 100, 300 y 500 mg/kg/día, mediante alimentación forzada, a un volumen de dosis constante de 5 ml/kg/día.

Los compuestos de ensayo se formularon en 30% (v/v) de HP β CD en agua purificada. Cada grupo incluía 5 ratas macho principales, así como 3 animales satélite para la toxicocinética. Un cuarto grupo recibió solo 30% (v/v) de HP β CD en agua, a la misma frecuencia, volumen de dosificación y por la misma vía de administración, y actuó como el grupo de control de vehículo.

25 El objetivo del estudio era determinar la dosis más baja con la que no se identificaron eventos adversos (nivel de efecto adverso no observable - NOAEL). En este protocolo se ensayaron el compuesto de comparación 37 y el compuesto 176.

Los niveles NOAEL para el compuesto de comparación 37 y el compuesto 176 se estimaron a 500 mg/kg.

30 Las personas con conocimientos en la materia apreciarán que las descripciones anteriores son de naturaleza ejemplar y explicativa y, como se ha indicado, pretenden ilustrar la invención y sus realizaciones preferentes. A través de experimentación rutinaria, una persona con conocimientos en la materia reconocerá modificaciones y variaciones evidentes que pueden realizarse sin apartarse del espíritu de la invención. De esta manera, se pretende que la presente invención no esté definida por la descripción anterior, sino por las reivindicaciones siguientes y sus equivalentes.

Referencias

- Choy EH, Panayi GS. (2001). N Engl J Med. 344: 907-16.
- 35 Chubinskaya S and Kuettner KE (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. The international journal of biochemistry & cell biology 35(9)1323-1340.
- Clegg DO et al. (2006) N Engl J Med. 2006 354:795-808. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis.
- Firestein GS. (2003). Nature. 423:356-61.
- 40 Kachigian LM. (2006) Collagen antibody-induced arthritis, Nature Protocols 2512-2516:
- Lee DM, Weinblatt ME (2001). Lancet. 358: 903-11.

- Legendre F, Dudhia J, Pujol J-P, Bogdanowicz P. (2003) JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 278(5):2903-2912.
- 5 Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. (2001) Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires janus kinase/STAT signaling pathway. (2001) *J Immunol* 166:3491-3498.
- O'Dell JR. (2004) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 350(25):2591-602.
- Osaki M, Tan L, Choy BK, Yoshida Y, Cheah KSE, Auron PE, Goldring MB. (2003) The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1alpha, JAK1 and JAK2. *Biochem J* 369:103-115.
- 10 Oste L et al., ECTC Montreal 2007: A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry
- Otero M, Lago R, Lago F, Gomez Reino JJ, Gualillo O. (2005) Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Research & Therapy* 7:R581-R591.
- 15 Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Schreiber RD. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine-induced biologic responses *Cell* 93: 373-383.
- Sims NA et al., (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum.* 50 2338-2346:
- 20 Smolen JS, Steiner G. (2003). *Nat Rev Drug Discov.* 2: 473-88.
- Wernig et al. (2008) Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera, *Cancer Cell* 13(4), 311-320
- Geron et al. (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors *Cancer Cell* 13 (4), 321-30
- 25 Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. (2005). *Nat Rev Drug Discov.* 4:331-44. Osteoarthritis - an untreatable disease?
- Wirtz et al. (2007) Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073-1083:
- Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383
- 30 Constantinescu et al., 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3): 122-131
- Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadimitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (suppl 3):S233-S242
- O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., *Nature Reviews*, 2004, 555-564
- Nials et al. (2008) Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge, *Disease Models & Mechanisms*, 213-220.
- 35 Ip et al. (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH₂-terminal kinase 1/2 signalling pathways, *Clin. Exp.Immun.* 162-172.
- Pernis et al. (2002) JAK-STAT signaling in asthma *J. Clin. Invest.* 1279.
- 40 Kudlacz et al. (2008) The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia, *Eur J Pharmacol* 154-161.
- Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen I-M, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP, Willmann CL; (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *PNAS* May 22. [Epub ahead of print]
- 45 Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. (1998)Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1:245-51.

Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. (2002) Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 46: 802-5.

Jou IM, Shiau AL, Chen SY, Wang CR, Shieh DB, Tsai CS, Wu CL. (2005) Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52:339-44.

- 5 Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, Yoshida A, Yamana J, Yamamura M, Ninomiya Y, Inoue H, Asahara H. (2004) Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 10: 3365-76.

Rall LC, Roubenoff R. (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology*; 10:1219-23.

- 10 Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. (2001) Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 44:2909-21.

Shelton DL, Zeller J, Ho WH, Pons J, Rosenthal A. (2005) Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain.* 116:8-16.

- 15 Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht S, Martin TJ, Gillespie MT, Romas E. (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 50: 2338-46.

Walsmith J, Abad L, Kehayias J, Roubenoff R. (2004) Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*; 31:23-9.

Khachigian, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. (2006) *Nature Protocols* 1, 2512-6.

- 20 Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clément-Lacroix P. (2007) Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* Apr;150 (7):829-31.

Todas las publicaciones, incluyendo, pero sin limitación, las patentes y solicitudes de patentes, citadas en la presente solicitud, se incorporan a la presente memoria, por referencia, como si cada publicación individual se indicara específica e individualmente para ser incorporada por referencia en la presente memoria, como si se expusiera en su totalidad.

- 25 De la descripción anterior, las personas con conocimientos en la materia idearán diversas modificaciones y cambios en las composiciones y procedimientos de la presente invención. La totalidad de dichas modificaciones incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas están destinadas a ser incluidas en la misma.

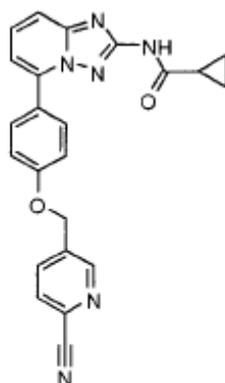
Deberá entenderse que factores tales como la capacidad de penetración celular diferencial de los diversos compuestos pueden contribuir a discrepancias entre la actividad de los compuestos en los ensayos bioquímicos y celulares *in vitro*.

- 30 Al menos algunos de los nombres químicos de los compuestos de la invención, como se proporcionan y se establecen en la presente solicitud, pueden haber sido generados, de manera automatizada, por el uso de un programa de software de nomenclatura productos químicos comercialmente disponible, y no se han verificado independientemente. Los programas representativos que realizan esta función incluyen la herramienta de nomenclatura Lexichem, comercializada por Open Eye Software, Inc., y la herramienta Autonom Software, comercializada por MDL, Inc. En el caso en que el nombre químico indicado y la estructura representada difieran, la estructura representada es la correcta.

- 35 Las estructuras químicas mostradas en la presente memoria se prepararon usando ChemDraw® o ISIS® / DRAW. Cualquier valencia abierta que aparece sobre un átomo de carbono, oxígeno o nitrógeno en las estructuras de la presente memoria indica la presencia de un átomo de hidrógeno. Cuando existe un centro quiral en una estructura, pero no se muestra estereoquímica específica para el centro quiral, la estructura abarca ambos enantiómeros asociados con la estructura quiral.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la Fórmula VIa:



VIa

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

3. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento.

4. Compuesto según la reivindicación 1 o una composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo, osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxina (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplantes (por ejemplo, rechazo de trasplantes de órganos).

5. Compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades proliferativas.

6. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades que implican la degradación de cartílagos, huesos y/o articulaciones, por ejemplo, osteoartritis; y/o afecciones que implican respuestas inflamatorias o inmunes, tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo asma, rinitis), artritis idiopática juvenil, colitis, enfermedades inflamatorias del intestino, estados de enfermedad impulsados por endotoxina (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados crónicos de endotoxina que contribuyen, por ejemplo, a insuficiencia cardíaca crónica), enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago (por ejemplo, enfermedades que implican la estimulación anabólica de condrocitos), malformaciones congénitas del cartílago, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 y rechazo de trasplantes (por ejemplo, rechazo de trasplantes de órganos).

7. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende uno o más agentes activos diferentes.

9. Compuesto según la reivindicación 4 ó 5, para su uso en combinación con uno o más agentes activos diferentes.

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 6 ó 7, en el que el medicamento es para ser administrado con uno o más agentes activos diferentes.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, un compuesto según la reivindicación 9 o el uso según la reivindicación 10, en el que el uno o más agentes activos diferentes son agentes terapéuticos para el tratamiento y/o la

prevención de una enfermedad que implica inflamación, artritis, trastornos proliferativos, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, asma y/o rinitis y/o COPD, IBD, SLE o psoriasis.

12. Composición farmacéutica, compuesto o uso según la reivindicación 11, en el que el uno o más agentes activos diferentes son agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que implica inflamación seleccionada de entre agentes inmunoreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticosteroides (por ejemplo, prednisona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato de mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam; agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de artritis seleccionados de entre analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), esteroides, DMARDs sintéticos (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofin, aurotiomalatode sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxicloroquina, azatioprina y ciclosporina), y DMARDs biológicos (por ejemplo, infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab y abatacept); agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de trastornos proliferativos seleccionados de entre metotrexato, leukovorin, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER², capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR, inhibidores de VEGF, inhibidores de proteasoma e inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG); agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes seleccionados de entre glucocorticoides, agentes citostáticos (por ejemplo, análogos de purina), agentes alquilantes, (por ejemplo, mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ejemplo, dactinomicina antraciclina, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ejemplo, anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OKT3) anticuerpos monoclonales), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones (por ejemplo, IFN- β), proteínas de unión a TNF (por ejemplo, infliximab, etanercept o adalimumab), micofenolato, fingolimod y miriocina; agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención del rechazo de trasplantes seleccionados de entre inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (por ejemplo, sirolimus, everolimus), anti-antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticosteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo monoclonales de receptor anti-IL-2R α , basiliximab, daclizumab) y anticuerpos policlonales anti células T (por ejemplo, globulina antitímocito (ATG), globulina anti-linfocito (ALG)); agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de asma y/o rinitis y/o COPD seleccionados de entre agonistas beta₂-adrenérgicos (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhulado o comprimidos), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio), glucocorticoides (orales o inhalados) agonistas β_2 de acción prolongada (por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol y albuterol oral de liberación sostenida), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ejemplo fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrienos e inhibidores de síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlukast y zileuton), inhibidores de liberación de mediadores (por ejemplo, cromoglicato y ketotifeno), reguladores biológicos de la respuesta IgE (por ejemplo omalizumab), antihistaminas (por ejemplo ceterizine, cinarizina, fexofenadina), vasoconstrictores (por ejemplo oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina); agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de IBD seleccionados de entre glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, budesonida), agentes inmunomoduladores que modifican la síntesis de la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores que modifican una enfermedad biológica (infliximab, adalimumab, rituximab y abatacept); agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de SLE seleccionados de entre fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARDs) tales como antipalúdicos (por ejemplo plaquenil, hidroxicloroquina), inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico, fármacos inmunosupresores y analgésicos, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, opiáceos (por ejemplo, dextropropoxifeno y co-codamol), opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo duragesic; o agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de psoriasis seleccionados de entre tratamientos tópicos, tales como soluciones de baño, cremas hidratantes, cremas medicadas y ungüentos que contienen alquitrán de hulla, ditranol (antralina), corticosteroides, tales como desoximetasona, fluocinonida, análogos de la vitamina D₃ (por ejemplo, calcipotriol), aceite Argan y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos, tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxiurea, sulfasalazina, micofenolato de mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o agentes biológicos tales como ustekinumab (un bloqueador de IL-12 e IL-23).