

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 170**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10728648 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2445912**

54 Título: **Nuevo compuesto útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y degenerativas**

30 Prioridad:

26.06.2009 US 220685 P

25.01.2010 US 298188 P

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

06.11.2014

73 Titular/es:

**GALAPAGOS N.V. (100.0%)
Generaal de Wittelaan L11 A3
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 519 170 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

Nuevo compuesto útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y degenerativas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto que es un inhibidor de JAK, una familia de tirosina quinasas que están implicadas en los trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6. La presente invención también proporciona procedimientos para la producción de dicho compuesto, composiciones farmacéuticas que comprenden este compuesto, y procedimientos de prevención y/o tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6 por medio de la administración de un compuesto de la invención

15 Las quinasas de Janus (JAKs) son tirosina quinasas citoplásmicas que producen la transducción de la generación de señales de citoquina desde los receptores de membrana hasta los factores de transcripción STAT. Se describen cuatro miembros de familia de JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Tras la unión de la citoquina a su receptor, los miembros de la familia de JAK experimenta auto- y/o transfosforilación unos con otros, seguido de fosforilación de STATs que posteriormente migran al núcleo para modular la transcripción. La transducción de señal intracelular de JAK-STAT surte los interferones, la mayoría interleucinas, así como también una variedad de citoquinas y factores endocrinos tales como EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTIF, GM-CSF y PRL (Vainchenker W. et al. (2008).

20 La combinación de investigación de modelos genéticos e inhibidor JAK de molécula pequeña reveló el potencial terapéutico de diversos JAKs. JAK3 se valida por medio de la genética en ratón y humano como una diana de inmuno-supresión (O'Shea J. et al. (2004)). Se sometieron de manera satisfactoria inhibidores JAK3 a desarrollo clínico, inicialmente para el rechazo de trasplante de órganos pero posteriormente también en otras indicaciones inmuno-inflamatorias tales como artritis reumatoide (RA), soriasis y enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

25 TYK2 es una diana potencial para enfermedades inmuno-inflamatorias, siendo validada por la genética humana y estudios de knock-out en ratones (Levy D. y Loomis C. (2007)).

30 JAK1 es una nueva diana en el área de enfermedades inmuno-inflamatorias. JAK1 heterodimeriza con los otros JAKs para transducir la generación de señal pro-inflamatoria accionada por citoquina. Por tanto, cabe esperar que la inhibición de JAK1 y/u otras JAKs constituya una ventaja terapéutica para un espectro de enfermedades inflamatorias así como también para otras enfermedades accionadas por la transducción de señal con mediación de JAK.

Antecedentes de la invención

35 La degeneración del cartílago es la marca de contraste de diversas enfermedades, entre las cuales artritis reumatoide y osteoartritis son las más prominentes. La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad crónica degenerativa de las articulaciones, caracterizada por inflamación y destrucción de las estructuras de la articulación. Cuando no se controla la enfermedad, conduce a discapacidad sustancial y dolor debido a la pérdida de funcionalidad de la articulación e incluso a la muerte prematura. El objetivo de la terapia de RA, por tanto, es no solo ralentizar la enfermedad sino también lograr la remisión con el fin de detener la destrucción de la articulación. Además de la gravedad del desenlace de la enfermedad, la elevada prevalencia de RA (~ un 0,8 % de los adultos se ven afectados en todo el mundo) se traduce en un elevado impacto socio-económico. (Para revisiones sobre RA, se hace referencia a Smolen y Steiner (2003); Lee y Weinblatt (2001); Choy y Panavi (2001); O'Dell (2004) y Firestein (2003)).

45 La osteoartritis (también denominada como OA, o artritis de uso-y-desgarro) es la forma más común de artritis y se caracteriza por pérdida del cartílago articular, con frecuencia asociada con hipertrofia del hueso y dolor. Para una revisión amplia de osteoartritis, se remite a Wieland et al. (2005).

50 La osteoartritis es difícil de tratar. Actualmente, no existe cura disponible y el tratamiento se centra en el alivio del dolor y prevenir la deformación de la articulación afectada. Los tratamientos comunes incluyen el uso de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Aunque los complementos de la dieta, tales como condroitina y sulfato de glucosamina, se han constatado como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la osteoartritis, un ensayo clínico reciente reveló que ambos tratamientos no reducen el dolor asociado a la osteoartritis. (Clegg et al., 2006). Tomados juntos, no existen fármacos osteoartóricos de modificación de la enfermedad.

55 La simulación de los procesos anabólicos, procesos catabólicos de bloqueo o una combinación de estos dos, puede tener como resultado la estabilización del cartílago, y quizás incluso la reversión del daño, y por tanto previenen el avance posterior de la enfermedad. Diversos agentes de estimulación pueden favorecer la estimulación anabólica de condrocitos. El factor-I de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) es el factor de crecimiento anabólico predominante en el fluido sinovial y estimula la síntesis por un lado de proteoglucanos y por otro, de colágeno. También se ha

mostrado que los miembros de la familia de proteína morfogenética ósea (BMP), en concreto BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7, y los miembros del factor- β de crecimiento de transformación en humanos (TGF- β) pueden inducir la estimulación anabólica de condrocitos (Chubinskaya y Kuettnner, 2003). Se ha identificado recientemente un compuesto que induce la estimulación anabólica de condrocitos (documento US 6.500.854; documento EP 1 391 211). No obstante, la mayoría de estos compuestos muestran diversos efectos secundarios y, por consiguiente, existe una fuerte necesidad de compuestos que estimulen la diferenciación de condrocitos sin estos efectos secundarios.

Vandeghinste et al. (documento WO 2005/124342) descubrió JAK1 como diana cuya inhibición podría tener relevancia terapéutica para diversas enfermedades incluyendo OA. JAK1 pertenece a la familia de quinasa de Janus (JAK) de tirosina quinasa citoplásmicas, implicadas en la transducción de señal intracelular con mediación de receptor de citoquina. La familia JAK consiste en 4 miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. JAKs se enganchan a receptores de citoquina, tras la unión de la citoquina, seguido de heterodimerización del receptor de citoquina y una subunidad de receptor compartido (cadena gamma-c común, gp130). Posteriormente, se activan las JAKs por medio de auto- y/o transfosforilación por medio de otra JAK, dando como resultado la fosforilación de los receptores y el enganche y la fosforilación de los miembros del transductor de señal y el activador de transcripción (STATs). Los STATs fosforilados dimerizan y experimentan traslocación al núcleo, en el cual se unen a regiones mejoradoras de los genes responsables de las citoquinas. El estudio de knockout del gen de JAK1 en ratones demostró que JAK1 desempeña funciones esenciales y no redundantes durante el desarrollo: los ratones JAK1 $-/-$ murieron 24 horas después del nacimiento y el desarrollo de linfocitos se vio gravemente alterado. Además, las células JAK1 $-/-$ no fueron reactivas, o fueron menos reactivas, frente a las citoquinas que usan receptores de citoquina de clase II, receptores de citoquina que usan la sub-unidad gamma-c para la generación de señal y la familia de receptores de citoquina que usan la subunidad gp130 para la generación de señal (Rodig et al., 1998).

Se han implicado varios grupos en la generación de señal de JAK-STAT en biología de condrocitos. Li et al. (2001) mostraron que oncostatina M induce la expresión de genes de MMP y TIMP3 en condrocitos primarios por medio de la activación de los mecanismos de generación de señal de JAK/STAT y MAPK. Osaki et al. (2003) mostraron que la inhibición de colágeno II con mediación de interferón-gamma en condrocitos implica la generación de señal de JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo de cartílago por medio de la reducción de la expresión de los componentes de la matriz, y por medio de la inducción de la expresión de colagenasas y sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2), que actúa como mediador en la producción de óxido nítrico (NO). Otero et al. (2005) mostraron que leptina y IL1-beta inducían de forma sinérgica la producción de NO o la expresión de NOS2 mRNA en condrocitos, y que esa se bloqueó por medio de un inhibidor de JAK. Legendre et al. (2003) mostraron que el receptor IL6/IL6 inducía la infra-regulación de colágeno II de genes de matriz específicos de cartílago, núcleo de agregan y proteína de unión en condrocitos articulares bovinos, y que esto presentaba mediación de generación de señal de JAK/STAT. Por tanto, estas observaciones sugieren un papel de la actividad de JAK quinasa en la homeostasis de cartílago y oportunidades terapéuticas para los inhibidores de JAK quinasa.

Los miembros de la familia de JAK se han visto implicados en trastornos adicionales que incluyen trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan et al., 2007, Mol. Immunol. 44 (10):2497-506), en el cual se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular de JAK2, también puede servir de utilidad en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Adicionalmente, la familia de JAK, en particular, JAK1, JAK2 y JAK3, se han ligado a cáncer, en particular a 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 la red el 6 de diciembre de 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) y leucemia linfoblástica aguda (Mullighan et al., 2009) o tumores sólidos por ejemplo leiomiomasarcoma uterino (Constantinescu et al., 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3): 122-131), cáncer de próstata (Tam et al., 2007, British Journal of Cancer, 87, 378-383). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1 y JAK2, pueden también presentar utilidad en el tratamiento de cáncer (leucemias y tumores sólidos por ejemplo, cáncer de próstata, leiomiomasarcoma uterino).

Además, probablemente, la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, glomerulonefritis proliferativa mesangial, soriasis y sarcoma de Kaposi se deben a la hipersecreción de citoquina IL-6, cuyos efectos biológicos están mediados por la generación de señal de JAK-STAT celular (Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto y Tadimitsu Kishimoto, Arthritis Res 2002, 4 (suplemento3):S233-S242). Este resultado muestra que los inhibidores de JAK pueden también tener utilidad en el tratamiento de dichas enfermedades.

Se ha establecido un vínculo con enfermedades autoinmunitarias para JAK3 y Tyk2. Las mutaciones de JAK3, pero también en la cadena de componente del receptor gamma-c de generación de señal aguas arriba y el receptor IL7 suman, todas juntas, aproximadamente un 70 % de los casos de inmunodeficiencia combinada grave en humanos (O'Shea et al., 2004). Nótese que JAK1 coopera con JAK3 en la transducción de señales a partir de la cadena del receptor gamma-c. Los polimorfismos de Tyk2 se observan en el lupus sistémico eritematoso (SLE) (O'Sullivan et al., 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506). Además, actuando como diana la familia de JAK puede proporcionar una oportunidad terapéutica en el área de la inmuno-inflamación.

El documento WO 2009/017954 divulga [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridinas sustituidas como inhibidores de JAK2.

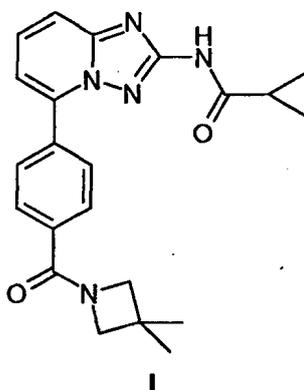
Las terapias actuales no son satisfactorias y por tanto sigue siendo necesario identificar compuestos adicionales que puedan usarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6. Por tanto, la presente invención proporciona un compuesto, procedimientos para su fabricación y composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención junto con un excipiente farmacéutico aceptable. En particular, el compuesto exhibe elevada potencia y selectividad para JAK1 con respecto a otros miembros de la familia de JAK además de las dianas de quinasa 385 y las dianas que no son de quinasa. Adicionalmente, los datos indican que el compuesto tiene un buen margen de seguridad. Por tanto, se concluye que la presente invención ofrece una nueva oportunidad para el tratamiento de enfermedades con mediación de JAK1, en particular enfermedades inflamatorias tales como SLE (lupus eritematoso sistémico) y RA.

La presente invención también proporciona el uso del compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de estas enfermedades y trastornos.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1, son útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6. La presente invención también proporciona procedimientos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y procedimientos para el tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6 por medio de la administración del compuesto de la invención.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se divulga un compuesto de la invención que tiene la Fórmula I:



El compuesto de la invención es un nuevo inhibidor de JAK que exhibe una elevada potencia y selectividad para JAK1 con respecto a otros miembros de la familia de JAK y dianas de quinasa 385 y dianas que no son de quinasa, así como también muestra un buen margen de seguridad terapéutico. El uso de un compuesto con este perfil puede tener como resultado ventajas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular SLE y RA debidas a una menor incidencia de los efectos de la diana.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención, y un vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente. Además, el compuesto de la presente invención útil en las composiciones farmacéuticas y los procedimientos de tratamientos divulgados en la presente memoria, es farmacéuticamente aceptable según se prepara y se usa. En este aspecto de la invención, la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente ingredientes adicionales apropiados para su uso en combinación con el compuesto de la invención.

En otro aspecto de la invención, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un mamífero susceptible de o afectado con un trastorno entre los listados anteriormente en la presente memoria, y en particular, dicho trastorno se puede asociar a una actividad aberrante de JAK, por ejemplo, trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o una o más composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria. En un aspecto específico, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un mamífero susceptible de o

afectado por un trastorno que puede estar asociado a una actividad aberrante de JAK, en particular trastornos inflamatorios, enfermedades proliferativas y enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada entre las listadas anteriormente en la presente memoria, en particular trastornos como los asociados a una actividad aberrante de JAK tales como trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6. En un aspecto específico, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos asociados a una actividad aberrante de JAK1, en particular trastornos inflamatorios, enfermedades proliferativas y enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago.

10 En otro aspecto de procedimiento de tratamiento, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de un mamífero susceptible o afectado por un trastorno que está relacionado causalmente con una actividad anormal de JAK como se ha descrito en la presente memoria, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz que previene el trastorno o trata el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención descrito en la presente memoria. En una realización específica, la actividad anormal de JAK es actividad anormal de JAK1.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno que está relacionado causalmente con actividad anormal de JAK. En una realización específica la actividad anormal de JAK es actividad anormal de JAK1.

20 En aspectos adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar el compuesto de la invención, con protocolos sintéticos representativos y mecanismos divulgados posteriormente en la presente memoria.

25 Por consiguiente, un objetivo principal de la presente invención es proporcionar un compuesto, que pueda modificar la actividad de JAK y, de este modo, prevenir o tratar cualesquiera trastornos que puedan estar relacionados causalmente con la misma. En particular, cualesquiera trastornos que pueden estar relacionados causalmente con la actividad de JAK1.

30 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un compuesto que pueda tratar o aliviar trastornos o enfermedades o síntomas de los mismos, tales como trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6, que puedan estar relacionados causalmente con la actividad de JAK. En particular, una enfermedad o trastorno que pueda estar relacionado causalmente con la actividad de JAK1.

35 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que se puedan usar en el tratamiento o la prevención de una variedades de estados de enfermedad, incluyendo las enfermedades asociadas a la actividad de JAK tales como trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6. En particular, trastornos asociados a la actividad de JAK1.

40 Otros objetivos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva detallada adjunta.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los siguiente términos están concebidos para que tengan los significados presentados a continuación y sean útiles para la comprensión de la memoria descriptiva y el alcance pretendido de la presente invención.

45 Cuando se describe la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y procedimientos de uso de dichos compuestos y composiciones, los siguientes términos, si están presentes, tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario.

50 Los artículos "un" y "una" se pueden usar en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de un (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o susceptible de aprobación por una agencia reguladora de un gobierno o estado o federación o agencia correspondiente en países diferentes a Estados Unidos, o que se lista en U.S. Pharmacopoeia u otro compendio farmacéutico reconocido para su uso en animales, y más particularmente, en humanos.

"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacéutica deseada del compuesto parental. En particular, dichas sales no son tóxicas y pueden ser sales de adición de ácido orgánico o inorgánico y sales de adición de base. Específicamente, dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales 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 benzocico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-en-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 parental bien es sustituido por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión alcalino térreo, o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Sales adicionales incluyen, a modo de ejemplo únicamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando el compuesto contiene funcionalidad básica, sales de ácidos inorgánico u orgánicos no tóxicas, tales como hidrocloreuro, hidrobromuro, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. La expresión "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a un contra-ión catiónico aceptable de un grupo funcional ácido. Dichos cationes se ejemplifican por medio de cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares.

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

"Solvato" se refiere a formas del compuesto que se asocian a un disolvente, normalmente por medio de reacción de solvólisis. La asociación física incluye la unión de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, etanol, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, en forma cristalina y se pueden solvatar o hidratar. Solvatos apropiados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, y además incluyen tanto solvatos estequiométricos como solvatos no estequiométricos. En algunos casos el solvato es susceptible de aislamiento, por ejemplo cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente a la estructura reticular del cristal del sólido cristalino. "Solvato" engloba solvatos de fase de disolución y solvatos susceptible de aislamiento. Solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

"Sujeto" incluye humanos. Los términos "humano", "paciente" y "sujeto" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

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

"Prevenir" o "prevención" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, provocar 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).

El término "profilaxis" está relacionado con la "prevención" y se refiere a una medida o procedimiento cuya finalidad es prevenir, en lugar de tratar o curar la enfermedad. Ejemplos no limitantes de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalarios con riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a la inmovilización; y la administración de agente anti-malaria tal como cloroquina, antes de una visita a una región geográfica en la cual la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es elevado.

"Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a la mejora de la enfermedad o trastorno (es decir, detener la enfermedad o reducir la manifestación, alcance o gravedad de al menos uno de sus síntomas clínicos). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que no resulta discernible por parte del sujeto. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno bien de forma física (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), de forma fisiológica (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambas. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a ralentizar el avance de la enfermedad.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "trastorno(s) inflamatorio(s)" se refiere al grupo de trastornos que incluyen, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática juvenil, soriasis, enfermedades respiratorias alérgicas (por ejemplo, asma, rinitis), enfermedades intestinales inflamatorias (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), estados de enfermedad inducidos por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones tras cirugía de derivación o estados crónicos de endotoxinas que contribuyen por ejemplo a insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas que

afectan al cartílago, tales como las que afectan a las articulaciones. En particular, la expresión se refiere a artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedades respiratorias alérgicas (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.

5 Según se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad(es) autoinmunitaria(s)" se refiere al grupo de enfermedades que incluye enfermedades respiratorias obstructivas, incluyendo trastornos tales como EPOC, asma (por ejemplo, asma intrínseco, asma extrínseco, asma de polvo, asma infantil), asma inveterada o particularmente crónica (por ejemplo, asma tardía y hiper-respuesta de las vías respiratorias), bronquitis, incluyendo asma bronquial, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, diabetes melitus de tipo I y complicaciones asociadas a la misma, eczema atópico (dermatitis atópica), dermatitis de contacto y dermatitis eczematosa, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. En particular, la expresión se refiere a EPOC, asma, lupus sistémico eritematoso, diabetes melitus de tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.

15 Según se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad(es) proliferativa(s)" se refiere a trastornos tales como cáncer (por ejemplo, leiomiocarcinoma uterino o cáncer de próstata), trastornos mieloproliferativos (por ejemplo, policitemia verdadera, trombocitosis esencial y mielofibrosis), leucemina (por ejemplo, leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda), mieloma múltiple, soriasis, restenosis, esclerodermis o fibrosis. En particular, la expresión se refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y soriasis.

20 Según se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a proliferación celular maligna o benigna en la piel u órganos corporales, por ejemplo pero sin limitarse a, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. El cáncer tiene a infiltrarse en el interior del tejido adyacente y a dispersarse (metástasis) hasta órganos distantes, por ejemplo en huesos, hígado, pulmón o cerebro. Según se usa en la presente memoria, el término cáncer incluye tanto tipos celulares tumorales metastásicos, tales como pero sin limitarse a, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y mastocitoma como tipos de carcinomas tisulares, tales como pero sin limitarse a, cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células que no son pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de hígado primario, cáncer de ovarios, cáncer de próstata y leiomiocarcinoma uterino.

25 Según se usa en la presente memoria, el término "leucemia" se refiere a enfermedades neoplásicas de la sangre y de los órganos que forman la sangre. Dichas enfermedades pueden provocar disfunción del sistema inmunitario y de la médula ósea, que convierte al hospedador en altamente susceptible a infección y hemorragias. En particular, el término leucemia se refiere a leucemia mieloide (AML) y leucemia linfoblástica aguda (ALL).

Según se usa en la presente memoria, la expresión "rechazo de trasplante" se refiere al rechazo de células agudo o crónico, tejido o alo- o xeno-injertos de órganos sólidos de, por ejemplo, isletas pancreáticas, hemocitoblastos, médula ósea, piel, músculo, tejido de la córnea, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, riñón, hígado, intestino, páncreas, traquea o esófago, o enfermedades de injerto-frente-hospedador.

35 Según se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago" incluye trastornos tales como osteoartritis, artritis soriasica, artritis reumatoide juvenil, artritis de Gouty, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática de reflejos, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurogénica o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis tales como osteoartritis deformans endémica, enfermedad de Mseleni y enfermedad de Handigou; degeneración resultante de fibromialgia, lupus sistémico eritematoso, escleroderma y espondilitis anquilosante.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "malformación(es) congénita(s) de cartílago" incluyen trastornos tales como condrolisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafiseal y trastornos relacionados.

45 Según se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad(es) asociada(s) a hipersecreción de IL6" incluye trastornos tales como enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, soriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

50 Según se usa en la presente memoria, el término "JAK" se refiere a la familia de quinasas de Janus (JAK) que son tirosina quinasas citoplásmicas que producen la transducción de la señal de citoquina desde los receptores de membrana hasta los factores de transcripción de STAT. Se describen cuatro miembros de la familia de JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 y el término JAK puede hacer referencia a todos los miembros de la familia de JAK de forma colectiva o a uno o más miembros de la familia de JAK según indique el contexto.

55 "Compuesto(s) de la invención", y expresiones equivalentes, significan el compuesto de Fórmula que se describe en la presente memoria, cuya expresión incluye sales farmacéuticamente aceptables, y los solvatos, por ejemplo, hidratos, y los solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables cuando el contexto lo permita. Similarmente, la referencia a intermedios, tanto si se reivindican en sí mismos como si no, significa sus sales y sus solvatos, cuando el contexto lo permita.

Cuando se hace referencia a intervalos en la presente memoria, por ejemplo pero sin limitación, alquilo C₁-C₈, la cita

de un intervalo debería considerarse una representación de cada miembro de dicho intervalo.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene proporciones de isótopos no naturales en uno o más átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una "variante isotópica" de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos, tales como por ejemplo, deuterio (^2H o D), carbono-13 (^{13}C), nitrógeno-15 (^{15}N) o similares. Debe entenderse que, en un compuesto en el que se lleva a cabo dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando se encuentran presentes, pueden variar, de manera que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser $^2\text{H/D}$, cualquier carbono puede ser ^{13}C , o cualquier nitrógeno puede ser ^{15}N , y la presencia y ubicación de dichos átomos puede venir determinada por la experiencia de la técnica. De igual forma, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, por ejemplo, cuando los compuestos resultantes se puedan usar para estudios de distribución de fármaco y/o tejido de sustrato. Los isótopos radioactivos de tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir ^{14}C , son particularmente útiles para este fin, a la vista de su facilidad de incorporación y procedimientos sencillos de detección. Además, se pueden preparar los compuestos que están sustituidos con isótopos que emiten positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , y sería útiles en los estudios de Topografía de Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.

Se pretende que todas las variantes isotópicas del compuesto que se proporciona en la presente memoria, radiactivo o no, queden englobadas dentro del alcance de la invención.

Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno de otro se denominan "diastereoisómeros" y aquellos que son imágenes especulares que se pueden superponer, uno con respecto al otro, se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, se una a cuatro grupos diferentes, existe la posibilidad de un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por medio de la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe por medio de las reglas de secuenciación-R y S de Cahn y Prelog, o por medio de la manera en la cual la molécula rota el plano de luz polarizada y se designa como dextrorrotatorio o levorotatorio (es decir, como isómeros-(+) o (-), respectivamente). Puede existir un compuesto quiral en forma de enantiómero individual o en forma de sus mezclas. Una mezcla que contiene proporciones iguales de enantiómeros se denomina "mezcla racémica".

Los "tautómeros" se refieren a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto particular, y que varían en el desplazamiento de los átomos de hidrógeno y los electrones. De este modo, dos estructuras pueden estar en equilibrio a través del movimiento de los electrones π y un átomo (normalmente H). Por ejemplo, los enoles y las cetonas son tautómeros ya que se interconvierten de forma rápida por medio de tratamiento bien con un ácido o bien con una base. Otro ejemplo de tautomerismo son las formas áci- y nitro- de fenilnitrometano, que se forman de igual manera por medio de tratamiento con un ácido o una base.

Las formas tautómeras pueden ser relevantes para lograr la reactividad química óptima y la actividad biológica de un compuesto de interés.

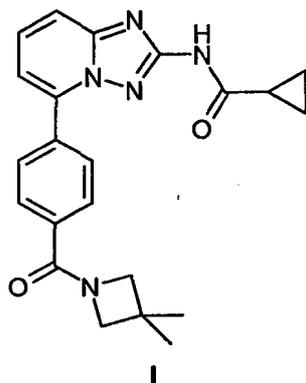
El compuesto de la invención puede poseer uno o más centros asimétricos; dichos compuestos pueden por tanto producirse en forma de estereoisómeros (R) o (S) individuales o en forma de sus mezclas.

A menso que se indique lo contrario, se pretende que la descripción o nomenclatura de un compuesto particular en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluya tanto los enantiómeros individuales como las mezclas, racémicas o de cualquier otro tipo. Los procedimientos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros resultan bien conocidos en la técnica.

El compuesto

La presente invención está basada en el descubrimiento de que los inhibidores de JAK son útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6. La presente invención también proporciona procedimientos para la producción del compuesto, composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto y procedimientos para el tratamiento de enfermedades que implican la degradación de cartílago, hueso y/o degradación articular y/o inflamación por medio de la administración del compuesto de la invención. El presente compuesto es un inhibidor de los miembros de la familia de JAK; específicamente inhibe la actividad de JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. En particular, inhibe la actividad de JAK1.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se divulga un compuesto de la invención que tiene una Fórmula I:



El compuesto de la invención es {5-[4-(3,3-dimetil-azetidín-1-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico.

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

5 En un aspecto, el compuesto de la invención está presente como base libre.

En un aspecto, el compuesto de la invención es una sal farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, el compuesto de la invención es un solvato del compuesto.

En un aspecto, el compuesto de la invención es un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

Composiciones farmacéuticas

10 Cuando se emplea como sustancia farmacéutica, el compuesto de la invención normalmente se administra en forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones se pueden preparar de manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo. Generalmente, el compuesto de la invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad de compuesto que se administra actualmente, normalmente, viene determinada por un médico, a la luz de circunstancias relevantes, incluyendo el trastorno objeto
15 de tratamiento, la ruta de administración seleccionada, el compuesto administrado, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por medio de una variedad de rutas incluyendo oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intra-articular, intravenosa, intramuscular e intranasal. Dependiendo de la ruta de administración, preferentemente, el compuesto de la presente invención se forma como
20 composiciones inyectables o composiciones orales o como ungüentos, lociones o parches, todos ellos para administración transdérmica.

Las composiciones para administración oral pueden adoptar la forma de disoluciones líquidas o suspensiones en volumen, o polvos en masa. Más comúnmente, no obstante, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitarias para facilitar una dosificación precisa. La expresión "formas de dosificación unitarias" se refiere
25 a unidades físicamente discretas apropiadas para dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, de manera que cada unidad contiene un cantidad pre-determinada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéutico apropiado. Las formas de dosificación unitarias típicas incluyen ampollas pre-medidas y pre-rellenadas o jeringas de composiciones líquidas o
30 píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas. En dichas composiciones, normalmente el compuesto de la invención es un componente secundario (de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 50 % en peso o preferentemente de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 40 % en peso) siendo el resto diversos vehículos o excipientes y coadyuvantes de procesado útiles para conformar la forma de dosificación deseada.

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

Normalmente, las composiciones inyectables están basadas en disoluciones salinas estériles inyectables o

disoluciones salinas con tampón de fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Como anteriormente, el compuesto activo de dichas composiciones es normalmente un componente secundario, con frecuencia de aproximadamente un 0,05 a un 10 % en peso, siendo el resto el vehículo inyectables y similares.

5 Normalmente, las composiciones transdérmicas se formulan como pomada tópica o crema que contiene el(los) principio(s) activo(s), generalmente, en una cantidad que varía de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 10 % en peso, y más preferentemente de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 15 % en peso. Cuando se formula en forma de pomada, normalmente los principios activos se combinan con una base de pomada bien parafínica o bien miscible con agua. Alternativamente, los
10 principios activos se pueden formular en una crema con, por ejemplo, una base de crema de aceite en agua. Dichas formulaciones transdérmicas se conocen bien en la técnica y generalmente incluyen ingredientes adicionales para mejorar la penetración dérmica de estabilidad de los principios activos o la formulación. Dichas formulaciones transdérmicas conocidas e ingredientes se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

15 El compuesto de la invención también se puede administrar por medio de un dispositivo transdérmico. Por consiguiente, la administración transdérmica se puede conseguir usando un parche, de tipo de membrana porosa o de reserva), o variedad de matriz sólida.

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

El compuesto de la invención también se puede administrar en formas de liberación retardada o a partir de sistemas de administración de fármacos de liberación retardada. Una descripción de materiales representativos de liberación retardada se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences.

25 Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas que se pueden preparar de acuerdo con la invención. No obstante, la presente invención no está limitada a las siguientes composiciones farmacéuticas.

Formulación 1 - Comprimidos

30 Se puede mezclar el compuesto de la invención en forma de polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una proporción en peso de aproximadamente 1:2. Se puede añadir una cantidad secundaria de estearato de magnesio como lubricante. Se puede conformar la mezcla para dar lugar a comprimidos de 240-270 mg (80-90 mg de compuesto activo de amida por comprimido) en una prensa de comprimidos.

Formulación 2 - Cápsulas

35 Se puede mezclar el compuesto de la invención en forma de polvo seco con un diluyente de almidón en una proporción en peso de aproximadamente 1:1. Se puede introducir la mezcla en cápsulas de 250 mg (125 mg de compuesto activo de amida por cápsula).

Formulación 3 - Líquido

40 Se puede mezclar el compuesto de la invención (125 mg) con sacarosa (1,75 g) y goma xantán (4 mg) y se puede homogeneizar la mezcla resultante, se puede hacer pasar a través de un tamiz U.S. de N^o. de malla 10, y posteriormente se puede mezclar con una disolución previamente preparada de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa de sodio (11:89, 50 mg) en agua. Se puede diluir benzoato de sodio (10 mg), aromatizante, y colorantes con agua y se puede añadir con agitación. Posteriormente, se puede añadir agua suficiente con agitación. A continuación, se puede añadir agua suficiente para producir un volumen total de 5 ml.

Formulación 4 - Comprimidos

45 Se puede mezclar el compuesto de la invención en forma de polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una proporción en peso de aproximadamente 1:2. Se puede añadir una cantidad secundaria de estearato de magnesio como lubricante. Se puede conformar la mezcla para dar lugar a comprimidos de 400-900 mg (150-300 mg de compuesto activo de amida por comprimido) en una prensa de comprimidos.

Formulación 5 - Inyección

50 Se puede disolver el compuesto de la invención o se puede suspender en un medio acuoso inyectable de disolución salina estéril tamponada hasta una concentración de aproximadamente 5 mg/ml.

Formulación 6 - Tópica

Se puede fundir alcohol estearílico (250 g) y petrolato blanco (250 g) a aproximadamente 75 °C y posteriormente se

puede añadir una mezcla del compuesto de la invención (50 g), metilparabeno (0,25 g), propilparabeno (0,15 g), lauril sulfato de sodio (10 g) y propilén glicol (120 g), disueltos en agua (aproximadamente 370 g), y se puede agitar la mezcla resultante hasta que se congele.

Procedimientos de tratamiento

- 5 Se puede usar el compuesto de la invención como agente terapéutico para el tratamiento de trastornos en mamíferos que están causalmente relacionados o que se pueden atribuir a actividad aberrante de JAK. En particular, trastornos relacionados con la actividad aberrante de JAK1. Por consiguiente, el compuesto y las composiciones farmacéuticas de la invención encuentran uso como sustancias terapéuticas para prevenir y/o tratar trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago y/o enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6 en mamíferos incluyendo humanos.

15 En el procedimiento adicional de aspectos de tratamiento, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible frente o afectado por un trastorno inflamatorio. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria. En una realización específica, el trastorno inflamatorio está seleccionado entre artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias intestinales.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de un trastorno inflamatorio. En una realización específica, el trastorno específico está seleccionado entre artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias intestinales.

25 En un procedimiento adicional de aspectos de tratamiento, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible frente a afectado por una enfermedad autoinmunitaria. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria. En una realización específica, la enfermedad autoinmunitaria está seleccionada entre EPOC, asma, lupus sistémico eritematoso, diabetes melitus de tipo I y enfermedad inflamatoria intestinal.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria. En una realización específica, la enfermedad autoinmunitaria está seleccionada entre EPOC, asma, lupus sistémico eritematoso, diabetes melitus de tipo I y enfermedad inflamatoria intestinal.

35 En otro procedimiento de aspectos de tratamiento, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible frente o afectado por una enfermedad proliferativa, en particular cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML o ALL), mieloma múltiple y/o soriasis. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de una enfermedad proliferativa, en particular cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML o ALL), mieloma múltiple y/o soriasis.

45 En un procedimiento adicional de aspectos de tratamiento, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible frente o afectado por rechazo de trasplante. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria. En una realización específica, la invención proporciona procedimientos de tratamiento de rechazo de trasplante de órganos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de rechazo de trasplantes. En una realización específica, la invención proporciona procedimientos de tratamiento de rechazo de trasplante de órganos.

50 En un procedimiento de aspecto de tratamiento, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento, prevención o profilaxis en un mamífero susceptible frente o afectado por enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de malformaciones congénitas de cartílago. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de malformaciones congénitas de cartílago.

- En otro procedimiento de aspectos de tratamiento, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible frente o afectado por enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6, en particular enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferativa mesangial. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz para prevenir el trastorno o tratar el trastorno de una o más composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención que se describen en la presente memoria.
- 10

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de enfermedades asociadas a hipersecreción de IL6, en particular enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

- 15 Como otro aspecto de la invención se proporciona el compuesto de la invención para su uso como sustancia farmacéutica, especialmente, en el tratamiento o prevención de los trastornos y enfermedades anteriormente mencionados. También se proporciona en la presente memoria el uso del compuesto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno de los trastornos o enfermedades anteriormente mencionados.

- 20 Un régimen particular del presente procedimiento comprende la administración a un sujeto que padece un trastorno inflamatorio, de una cantidad eficaz del compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación el sujeto, y preferentemente terminar, los procesos responsables de dicha inflamación. Una realización especial del procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un paciente sujeto que padece o es susceptible al 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.
- 25

- Un régimen particular adicional del presente procedimiento comprende la administración a un sujeto que padece enfermedades que implican el deterioro de la renovación de cartílago (por ejemplo, osteoartritis) de una cantidad eficaz del compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir y, preferentemente, terminar los procesos de auto-perpetuación responsables de dicha degradación. Una realización particular del procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un paciente sujeto que padece o que es susceptible del desarrollo de osteoartritis, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación de cartílago en las articulaciones de dicho paciente y, preferentemente, terminar los procesos de auto-perpetuación responsables de dicha degradación. En una realización particular, dicho compuesto puede exhibir propiedades anabólicas y/o anti-catabólicas de cartílago.
- 30
- 35

- Los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 0,1 mg/kg a al menos 10 mg/kg/hora, todo durante aproximadamente 1 a aproximadamente 120 horas y especialmente de 24 a 96 horas. También se puede administrar una inyección intravenosa embolada de pre-carga de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más, para lograr los niveles estacionarios adecuados. No se espera que la dosis total máxima supere aproximadamente 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.
- 40

- Para la prevención y/o tratamiento de trastornos a largo plazo, tales como trastornos degenerativos, normalmente el régimen de tratamiento se amplía durante muchos meses o años, de manera que se prefiere la dosificación oral por motivos de comodidad y tolerancia por parte del paciente. Con la dosificación oral, una a cinco y especialmente dos a cuatro y normalmente tres dosis orales al día son regímenes representativos. Usando estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de compuesto de la invención, proporcionando cada dosis particular de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg y especialmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg.
- 45

Generalmente, las dosis transdérmicas están seleccionadas para proporcionar niveles en sangre similares o más bajos que los que se logran usando dosis de inyección.

- 50 Cuando se usa para prevenir la aparición del trastorno inflamatorio, el compuesto de la invención se administra a un paciente con riesgo de desarrollar el trastorno, normalmente bajo el consejo y supervisión de un médico, en los niveles de dosificación descritos anteriormente. Generalmente, los pacientes con riesgo de desarrollar un trastorno particular incluyen los que tienen un historial familiar del trastorno, o los que se han identificado por medio de ensayo genético o exploración como particularmente susceptibles a desarrollar el trastorno.

- 55 El compuesto de la invención se puede administrar como el único agente activo o se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo otros compuestos que demuestran la misma actividad terapéutica o similar, y que están determinados como seguros y eficaces para dicha administración combinada. En

una realización específica, la co-administración de dos agentes (o más) permite el uso de dosis significativamente más bajas de cada uno, reduciendo de este modo los efectos secundarios observados.

5 En una realización, se co-administra el compuesto de la invención con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de un trastorno inflamatorio; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a, agentes inmunoreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticosteroides (por ejemplo, prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimo, Mycophenolate Mofetil, muromonab-CD3 (OKT3, por ejemplo Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.

10 En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de artritis (por ejemplo, artritis reumatoide); agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a, analgésicos, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS), esteroides, DMARDS sintético (por ejemplo pero sin limitación metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofin, aurotiomalato de sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxicloroquina, azatioprina y ciclosporina) y DMARDS biológicos (por ejemplo pero sin limitación Infiximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab y Abatacept).

15 En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de trastornos proliferativos; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a.: metotrexato, leucovorinan, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluoracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestro, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo Herceptin™), capecitabina, hidrocloreto de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ejemplo, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (por ejemplo, Avastin™), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™), Glivec® e inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Adicionalmente, se puede administrar un compuesto de la invención 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 proliferativa o leucemia.

25 En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunitarias; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a.: 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, antraciclinas de dactinomicina, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OTK3), Atgam® y Thymoglobuline®), ciclosporina, tacrolimo, rapamicina (sirolimo), interferones (por ejemplo, IFN-β), proteínas de unión de TNF (por ejemplo, infliximab (Ramicade®), etanercept (Enbrel™) o adalimumab (Humira™)), micofenolato, Fingolimod y Myriocin.

35 En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención del rechazo de trasplantes; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimo (FK506)), inhibidores de mTOR (por ejemplo, sirolimo, everolimo), agentes anti-proliferación (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales del receptor anti-IL-2Rα, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales de células anti-T (por ejemplo, anti-timocito globulina (ATG), anti-linfocito globulina (ALG)).

40 En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de asma y/o rinitis y/o EPOC; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: agonistas del adrenoreceptor beta₂ (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhalada o en 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 retardada), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ejemplo, fluticasona/salmeterol, budenosido/formoterol), antagonistas de leucotrieno e inhibidores de síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlucast y zileuton), inhibidores de la liberación de mediador (por ejemplo, cromoglicato y cetotifeno), reguladores biológicos de la respuesta de IgE (por ejemplo, omalizumab), antihistaminas (por ejemplo, ceterizina, cinnarizina, fexofenadina) y vasoconstrictores (por ejemplo, oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

50 Adicionalmente, el compuesto de la invención se puede administrar en combinación con terapias de emergencia para asma y/o EPOC, terapias que incluyen la administración de oxígeno o heliox, salbutamol nebulizado o terbutalina (opcionalmente combinada con un anticolinérgico (por ejemplo, ipratropio)), esteroides sistémicos (orales o intravenosos, por ejemplo, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona o hidrocortisona), salbutamol intravenoso, beta-agonistas no específicos, inyectados o inhalados (por ejemplo, epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol), anticolinérgicos (IV o nebulizados, por ejemplo, glicopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina, bamifilina), anestésicos de inhalación que tienen efecto broncodilatador (por ejemplo, isoflurano, halotano, enflurano), cetamina, y sulfato de magnesio intravenoso.

En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de enfermedad intestinal irritable (IBD); agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a:

glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, budenosido), agentes sintéticos inmunomoduladores que modifican la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores biológicos que modifican la enfermedad (infiximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

- 5 En una realización, se co-administra el compuesto de la invención con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de lupus sistémico eritematoso; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: fármacos anti-reuma de modificación de enfermedad (DMARDs) tales como sustancias anti-malaria (por ejemplo, plaquenilo, hidroxicloroquina), inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico; fármacos inmunosupresores y analgésicos, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, opiatos (por ejemplo, dextropropoxifeno y co-codamol), opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona, MS Contin o metadona) y el parche transdérmico duragésico de fentanilo.

- 10 En una realización, el compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de soriasis; agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: tratamientos tópicos tales como disoluciones para baño, humectantes, cremas medicadas y pomadas que contienen alquitrán de carbón, ditanol (antralina), corticosteroides tales como desoximetasona (Topicort™), fluocinonida, análogos de vitamina D₃ (por ejemplo, calcipotriol), aceite de Argan y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanida, hidroxiurea, sulfasalazina, micofenolato mofetilo, azatioprina, tacrolimo, ésteres de ácido fumárico o sustancias biológicas tales como Amevive™, Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ y ustekinumab (un agente de bloqueo de IL-12 y IL-23). Adicionalmente, se puede administrar un compuesto de la invención en combinación con otras terapias incluyendo, pero sin limitarse a, fototerapia, o fotoquimioterapia (por ejemplo, psoraleno y fototerapia ultravioleta A (PUVA)).

- 20 Por co-administración se incluye cualquier medio de administración de dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte de dicho régimen de tratamiento, como resultará evidente para la persona experta. Mientras que se pueden administrar dos o más agentes de forma simultánea en una formulación individual, esto no resulta esencial. Los agentes se pueden administrar en diferentes formulaciones y en diferentes momentos.

Procedimientos sintéticos generales

General

- 30 Se puede preparar el compuesto de la invención a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes procedimientos generales y procedimientos. Se apreciará que cuando se proporcionan condiciones de proceso preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, proporciones molares de reaccionantes, disolventes, presiones, etc.), también se pueden usar otras condiciones de proceso a menos que se afirme lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reaccionantes particulares o el disolvente usado, pero dichas condiciones se pueden determinar por parte de un experto en la técnica por medio de procedimientos rutinarios de optimización.

- 35 Adicionalmente, como resultará evidente para los expertos en la técnica, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para evitar que determinados grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector apropiado para un grupo funcional particular, así como también las condiciones apropiadas para la protección y desprotección, también resultan conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen numerosos grupos, y su introducción y retirada, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Segunda Edición, Wiley, Nueva York, 1991, y las referencias citadas en el mismo.

Se presentan los siguientes procedimientos con detalles sobre la preparación del compuesto de la invención. Se puede preparar el compuesto de la invención a partir de materiales de partida conocidos y comercialmente disponibles y reactivos por parte de un experto en la técnica de la síntesis orgánica.

- 45 Todos los reactivos fueron de calidad comercial y se usaron tal y como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se afirme lo contrario. Se usaron disolventes anhidros comercialmente disponibles para las reacciones llevadas a cabo en atmósfera inerte. Se usaron disolventes de calidad de reactivo en el resto de casos, a menos que se especifique lo contrario. Se llevó a cabo cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (35-70 μm). Se llevó a cabo cromatografía en capa fina usando placas F-254 de gel de sílice pre-revestidas (espesor de 0,25 mm). Se registró el espectro RMN ¹H en un espectrómetro de Bruker DPX 400 RMN (400 MHz). Se registraron los desplazamientos químicos (δ) para el espectro de RMN ¹H en partes por millón (ppm) con respecto a tetrametilsilano (δ 0,00) o el pico de disolvente residual apropiado, es decir, CHCl₃ (δ 7,27), como referencia interna. Se proporcionan las multiplicidades en forma de singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (q), multiplete (m) y ancho (br). Se proporcionan las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Se obtuvieron espectros MS de electropulverización en un espectrómetro LC/MS de plataforma de Micromass. Columnas usadas para todos los análisis de LCMS:
- 55 Waster Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 mm de ID x 50 mm de L (Parte N°. 186002350)). HPLC de preparación: Waters XBridge Prep C18 5 μm de ODB 19 mm ID x 100 mm L (Parte N°. 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de MeCN/H₂O. H₂O contiene bien TFA de 0,1 % o NH₃ de 0,1 %.

ES 2 519 170 T3

A continuación se presenta un listado de las abreviaturas usadas en la sección experimental:

DCM	Diclorometano
DiPEA	N,N-diisopropiletilamina
MeCN	Aceonitrilo
BOC	terc-Butiloxi-carbonilo
MF	N,N-dimetilformamida
Cat.	Cantidad catalítica
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido
LC-MS	Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masas
Ppm	partes por millón
Pd/C	Paladio sobre Carbono 10 %
PMB	Para-metoxi-bencilo
PyBOP	hexafluoroborato de benzotriazol-1-il-oxi-tri-pirrolidino-fosfonio
EtOAc	acetato de etilo
APCI	ionización química a presión atmosférica
Rt	tiempo de retención
s	singlete
brs	singlete ancho
m	multiplete
min	minuto
ml	mililitro
μl	microlitro
g	gramo
mg	miligramo
PdCl ₂ dppf	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloroplatino (II)
TEA	Trietilamina
MMP	Metalo Proteinasa de Matriz
NHAC	Condrocitos Aritculares Humanos Normales
shARN	ARN de horquilla corto
ARN	Ácido ribonucleico
Ad-Si ARN	siARN codificado adenovírico

PBST	Disolución salina tamponada con fosfato con Tween Na ₂ HPO ₄ 3,2 mM, KH ₂ PO ₄ 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, Tween 20 0,05 %, pH 7,4
APMA	acetato 4-aminofenilmercúrico
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
FBS	Suero bovino fetal
hCAR	receptor de adenovirus celular humano
3-MOI	multiplicidad de infección de 3
dNTP	trifosfato de desoxirribonucleosido
QPCR	reacción de cadena de polimerasa cuantitativa
cADN	ácido desoxirribonucleico de copia
GAPDH	deshidrogenasas de gliceraldehído fosfato

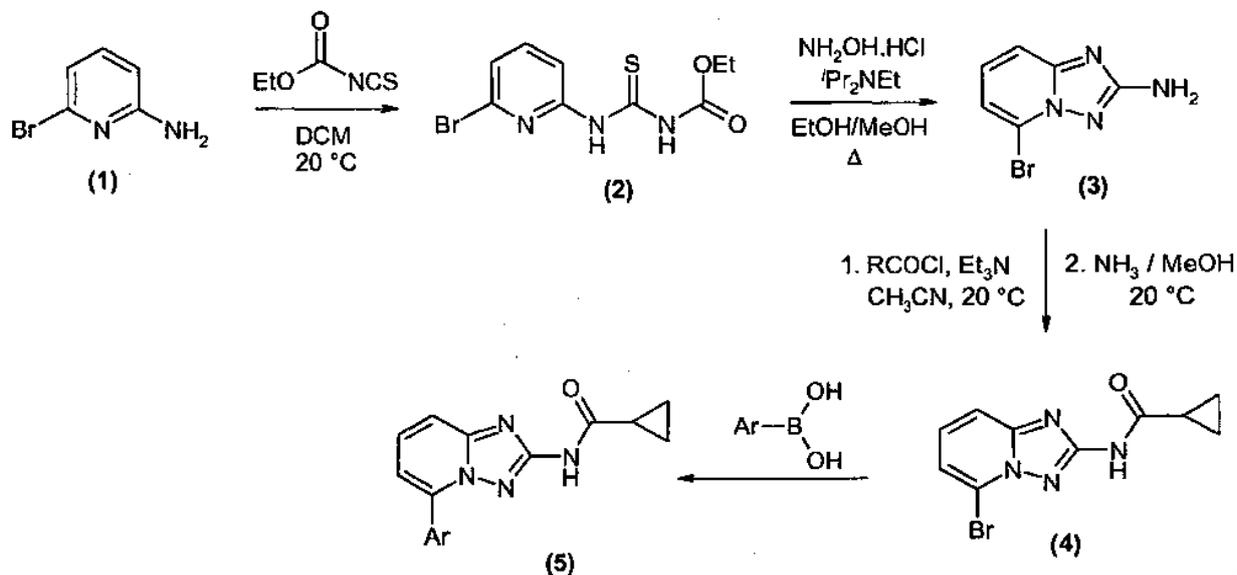
Preparación Sintética del Compuesto de la Invención

El compuesto de acuerdo con la invención se puede producir de acuerdo con el siguiente esquema.

Procedimiento Sintético General

5

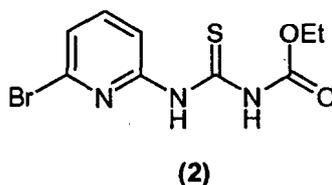
Esquema I



en la que Ar representa 4-(3,3-dimetil-azetidín-1-carbonil)-fenilo.

General

1.1.1 1-(6-Bromo-píridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (2)

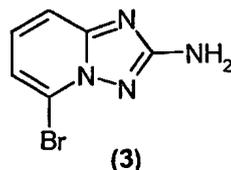


10

Se añade isotiocianato de etoxicarbonilo (173,0 ml, 1,467 mol) gota a gota sobre una disolución de 2-amino-6-

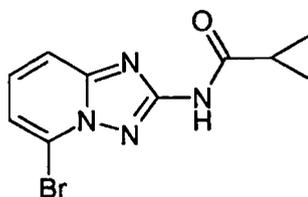
bromopiridina (1) (253,8 g, 1,467 mol) en DCM (2,5 l) enfiada hasta 5 °C, durante 15 min. Posteriormente se permite el calentamiento de la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente (20 °C) y se agita durante 16 h. La evaporación *a vacío* proporciona un sólido que se puede recoger por medio de filtración, se lava de manera abundante con petrol (3 x 600 ml) y se seca al aire para permitir la obtención de (2). Se puede usar tiourea como tal para la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H (400 MHz, CDCl₃) 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, CH₂), 1,35 (3H, t, J 7,1 Hz, CH₃).

1.1.2 5-Bromo[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-ilamina (3)



Se añade N,N-diisopropiletilamina (145,3 ml, 0,879 mol) a una suspensión de hidrocloreto de hidroxilamina (101,8 g, 1,465 mol) en EtOH/MeOH (1:1, 900 ml) y se agita la mezcla a temperatura ambiente (20 °C) durante 1 h. Posteriormente, se añade 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboxietoxi-tiourea (2) (89,0 g, 0,293 mol) y se calienta la mezcla lentamente a reflujo (Nota: se requiere un lavado de blanqueo para inactivar el H₂S desprendido). Tras 3 h a reflujo, se dejar enfriar la mezcla y se filtra para recoger el sólido precipitado. Se recoge el producto por medio de evaporación *a vacío* del filtrado, adición de H₂O (250 ml) y filtración. Se lavaron sucesivamente los sólidos combinados con H₂O (250 ml), EtOH/MeOH (1:1, 250 ml) y Et₂O (250 ml), posteriormente se seca *a vacío* para permitir la obtención del derivado de triazolopiridina (3) en forma de sólido. Se puede usar el compuesto como tal para la próxima etapa sin purificación alguna. ¹H (400 MHz, DMS-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 %).

1.1.3 Ácido ciclopropanocarboxílico (5-bromo-[1,2,4]triazolo [1,5-a]piridin-2-il)-amida (4):

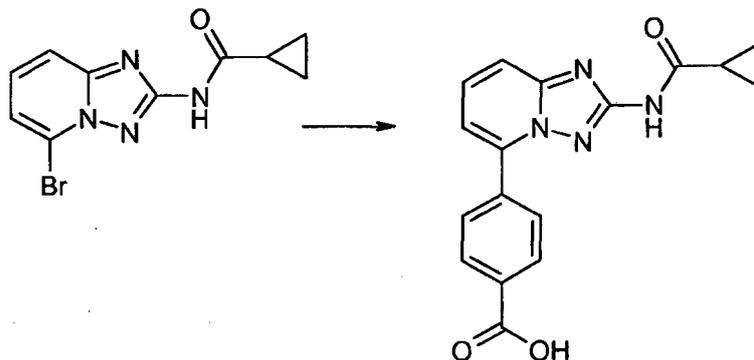


Se añade Et₃N (11,6 ml, 83,3 mol) a una disolución de 2-amino-triazolopiridina (3) (7,10 mg, 33,3 mol) en CH₃CN seco (150 ml) a 5 °C, seguido de cloruro de ciclopropanocarbonilo (83,3 mol). Posteriormente, se deja calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agita hasta que se haya consumido todo el material de partida (3). Si se requiere, se añade Et₃N adicional (4,64 ml, 33,3 mol) y cloruro de ciclopropanocarbonilo (33,3 mol) para garantizar la reacción completa. Tras la evaporación del disolvente *a vacío* se trata el residuo resultante con una disolución de amoníaco metanólico 7N (50 ml) y se agita a temperatura ambiente (durante 1-16 h) para hidrolizar cualquier producto bis-acilado. Se lleva cabo el aislamiento del producto por medio de la retirada de volátiles *a vacío* seguido de trituración con Et₂O (50 ml). Se recogen los sólidos por medio de filtración, se lavan con H₂O (2x50 ml), acetona (50 ml) y Et₂O (50 ml), posteriormente se secan *a vacío* para proporcionar el intermedio (4) de bromo requerido.

35 Procedimiento sintético para la preparación del compuesto de la invención

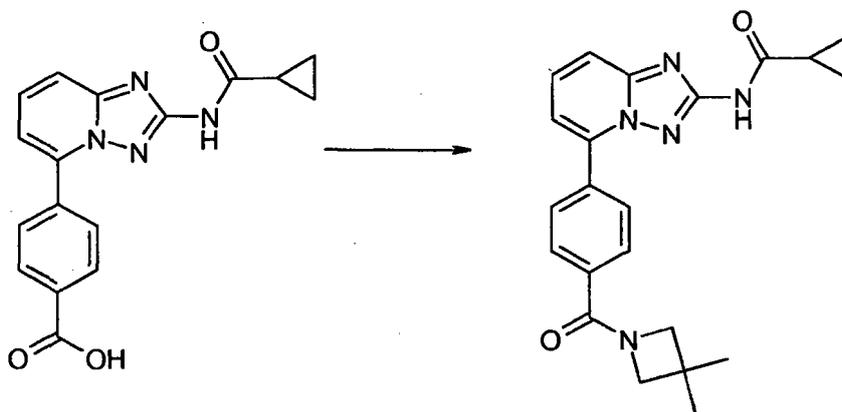
Compuesto 1

Etapas 1: Acoplamiento de Suzuki



5 Se añadió ácido 4-carboxifenilborónico (3,5 g, 0,021 mol) a una disolución (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (Intermedio 4, 5g, 0,018 mol) en 1,4-dioxano/agua (5:1). Se añadió K_2CO_3 (5,0 g, 0,036 mol) y $PdCl_2dppf$ (5 %) a la disolución. Posteriormente, se calentó la mezcla resultante por medio de calentamiento tradicional en un baño de aceite a 90 °C durante 16 h. Se añadió una disolución de HCl de 1M y se formó un precipitado en la disolución ácida. Se filtró el precipitado, se secó a vacío para proporcionar el compuesto del título usado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

10 *Etapa 2:* {5-[4-(3,3-dimetil-azetidín-1-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (Compuesto 1).



15 Se añadieron EDCI (3,59 g, 0,019 mol), HOBt (2,53 g, 0,019 mol) y DIPEA (4,48 ml) a una disolución de ácido 4-[2-(ciclopropanocarbonil-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il]benzoico (4 g, 0,012 mol) en DCM (150 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla resultante durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió una sal de hidrocloreuro de dimetilazetidina (1,64 g, 0,013 mol) a la disolución y se agitó la disolución durante 16 h. Se añadió agua a la mezcla de reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con una disolución de NaOH 2N, disolución de HCl 2 N y agua. Se secó la fase orgánica sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó a vacío. La purificación por medio de cromatografía instantánea (eluyente: petrol/EtOAc 1:1 hasta EtOAc puro) permitió la obtención de {5-[4-(3,3-dimetil-azetidín-1-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico.

20 La Tabla I siguiente muestra el compuesto de la invención que se ha preparado o se puede preparar de acuerdo con el procedimiento sintético descrito en la presente memoria. La Tabla II muestra los datos espectrales de RMN del compuesto de la invención.

25

Tabla I: Datos espectrales de masa del Compuesto de la invención

Cpd #	Estructura	Nombre	PM	MS Mes'd
1		{5-[4-(3,3-dimetil-azetidín-1-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	389,46	390,0

Tabla II: Datos de RMN del Compuesto de la Invención

Cpd #	Datos de RMN (δ)
1	(¹ H, DMSO-d ₆) 11,01 (1H, b, NH), 8,08 (2H, d, ArH), 7,79 (2H, d, ArH), 7,73 (1H, d, ArH), 7,72 (1H, s, ArH), 7,35 (1H, dd, ArH), 4,04 (2H, b, CH ₂), 3,77 (2H, b, CH ₂), 2,02 (1H, b, CH), 1,27 (6H, s, 2xCH ₃), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂)

5 Ejemplos Biológicos

Ejemplo 1 - ensayos in vitro

Ejemplo 1.1 Ensayo de inhibición de JAK1

Se adquirió JAK1 recombinante humano (dominio catalítico, amino ácidos 866-1154; número de catálogo PV4774) en Invitrogen. Se incubó 1 ng de JAK1 con péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) 20 nM (Perkin Elmer número de catálogo TRF0121) en tampón de reacción de quinasa (MOPS 25 mM pH 6,8, Brie-35 de 0,016 %, MgCl₂ 8,33 mM, DTT 3,33 mM, ATP 7 μ M) con o sin 4 μ l que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final de 1 %), en un volumen total de un 20 μ l, en una placa Luminotrac 200 384 blanca (Greiner, número de catálogo 781075). Tras 60 min a temperatura ambiente, se detuvieron las reacciones por medio de la adición de 20 μ l/pocillo de mezcla de detección (1 x tampón de detección (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), Europio-anti-fosfotirosina 0,5 nM (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), EDTA 10 mM). Se llevó a cabo la lectura usando Envision con una excitación a 320 nm y medición de la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa restando las unidades de fluorescencia relativa (RFU) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μ M estaurosporina) de RFU obtenida en presencia del vehículo. Se determinó la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir esta actividad como:

Inhibición en porcentaje = ((RFU determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente - RFU determinada para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido entre (RFU determinado en presencia del vehículo - RFU determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo JAK1 y el cálculo de IC₅₀ para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto de forma rutinaria a una concentración de 20 μ M seguido de una dilución seriada 1/5, 8 puntos (20 μ M - 4 μ M - 800 nM - 160 nM - 6,4 nM - 1,28 nM - 0,26 nM) en una concentración final de DMSO de 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 μ M, 1 μ M). Los datos se expresan como el valor de IC₅₀ medio a partir de los ensayos \pm el error estándar de la media.

Tabla III: Valores de IC₄₀ de JAK1 del Compuesto

Cpd #	JAK1 (nM)
1	6,6 \pm 0,7

Ejemplo 1.2 Ensayo de determinación Ki de JAK1

Para la determinación de K_i , se mezclaron cantidades diferentes de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de K_i por medio de representación recíproca doble de K_m vs la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usó JAK1 (Invitrogen, PV4774) a una concentración final de 500 ng/ml. El sustrato fue sal de Poli(Glu, Tyr)sodio (4:1), PM 20 000 - 50 000 (Sigma, P0275). Se llevó a cabo la reacción en Hepes 25 mM pH 7,5; Tween 20 0,01 %, $MgCl_2$ 10 mM con concentraciones variables de ATP y compuesto y se detuvo por medio de la adición de ácido fosfórico 150 mM. Se llevó a cabo la medición de fosfato incorporado en el sustrato poliGT colocando las muestras en una placa filtrante (usando un dispositivo de recogida, Perkin Elmer) y posterior lavado. Se mide ^{33}P incorporado en poliGT en un contador de centelleo Topcount tras la adición de líquido de centelleo a las placas filtrantes (Perkin Elmer).

10 Cuando se sometió a ensayo el Compuesto 1 en este ensayo, se midió un valor de K_i de 6,9 mM.

Alternativamente, para la determinación de K_i , se mezclaron diferentes cantidades de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de K_i por medio de representación recíproca doble de K_m vs a la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usó 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774) en el ensayo. El sustrato fue Peptido Ulight-JAK-a 50 nM (Tyr1023) (Perkin Elmer, TRF0121). Se llevó a cabo la reacción en MOPS 25 mM, pH 6,8, 0,01 %, DTT 2 mM, $MgCl_2$ 5 mM Brij-35 con concentraciones variables de ATP y compuesto. Se midió el sustrato fosforilado usando una anticuerpo PT66 anti-fosfotirosina marcado con Eu (Perkin Elmer, AD0068). Se llevó a cabo la lectura en el envión (Perkin Elmer) con excitación a 320 nm y emisión seguido a 615 nm y 665 nm.

Cuando se sometió a ensayo el compuesto 1 en este ensayo, se midió un valor de K_i de 5,6 nM.

20 **Ejemplo 1.3 Ensayo de inhibición de JAK2**

Se adquirió JAK2 recombinante humano (dominio catalítico, amino ácidos 866-1154; número de catálogo PV4210) en Invitrogen. Se incubó 0,0125 mU de JAK2 con péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) 25 nM (Perkin Elmer número de catálogo TRF0121) en tampón de reacción de quinasa (HEPES 41,66 mM pH 7,0, Triton X-100 0,016 %, $MgCl_2$ 12,5 mM, DTT 3,33 mM, ATP 7,5 μ M) con o sin 4 μ l que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final de 1 %), en un volumen total de un 20 μ l, en una placa Luminotrac 200 384 blanca (Greiner, número de catálogo 781075). Tras 60 min a temperatura ambiente, se detuvieron las reacciones por medio de la adición de 20 μ l/pocillo de mezcla de detección (1 x tampón de detección (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), Europio-anti-fosfotirosina 0,5 nM (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), EDTA 10 mM). Se llevó a cabo la lectura usando Envision con una excitación a 320 nm y medición de la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa restando las unidades de fluorescencia relativa (RFU) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μ M estaurosporina) de RFU obtenida en presencia del vehículo. Se determinó la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir esta actividad como:

Inhibición en porcentaje = ((RFU determinado para la muestra con el compuesto de ensayo presente - RFU determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido entre (RFU determinado en presencia del vehículo - RFU determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para el compuesto, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo JAK2 y el cálculo de IC_{50} para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto de forma rutinaria a una concentración de 20 μ M seguido de una dilución seriada 1/5, 8 puntos (20 μ M - 4 μ M - 800 nM - 160 nM - 6,4 nM - 1,28 nM - 0,26 nM) en una concentración final de DMSO de 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 μ M, 1 μ M). Los datos se expresan como el valor de IC_{50} medio a partir del ensayo \pm el error estándar de la media.

Tabla IV: Valores de IC_{50} de JAK2 del Compuesto

Cpd #	JAK2 (nM)
1	67 \pm 5

Ejemplo 1.4 Ensayo de determinación K_i de JAK2

45 Para la determinación de K_i , se mezclaron cantidades diferentes de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de K_i por medio de representación recíproca doble de K_m vs la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usaron 0,025 mU de JAK2 (Invitrogen, PV4210) en el ensayo. El sustrato fue sal de Poli(Glu, Tyr)sodio (4:1), PM 20 000 - 50 000 (Sigma, P0275). Se llevó a cabo la reacción en MOPS 10 mM pH 7,5; EDTA 0,5 mM, 0,01 % Brij-35, 1 mM DTT, 15 mM de $MgAc$ con concentraciones variables de ATP y compuesto y se detuvo por medio de la adición de ácido fosfórico 150 mM. Se llevó a cabo la medición de fosfato incorporado en el sustrato poliGT colocando las muestras en una placa filtrante (usando un dispositivo de recogida, Perkin Elmer) y posterior lavado. Se mide ^{33}P incorporado en poliGT en un contador de centelleo Topcount tras la adición de líquido de centelleo a las placas filtrantes (Perkin

Elmer).

Cuando se sometió a ensayo el Compuesto 1 en este ensayo, se midió un valor de K_i de 126 nM.

Alternativamente, para la determinación de K_i , se mezclaron diferentes cantidades de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de K_i por medio de representación recíproca doble de K_m vs a la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usó 0,0125 mU de JAK2 (Invitrogen, PV4210) en el ensayo. El sustrato fue Peptido Ulight-JAK-1 50 nM (Tyr1023) (Perkin Elmer, TRF0121). Se llevó a cabo la reacción en HEPES 25 mM, pH 7,0, 0,01 % Triton X-100, DTT 2 mM, $MgCl_2$ 7 mM con concentraciones variables de ATP y compuesto. Se midió el sustrato fosforilado usando un anticuerpo PT66 anti-fosfotirosina marcado con Eu (Perkin Elmer, AD0068). Se llevó a cabo la lectura en el envión (Perkin Elmer) con excitación a 320 nm y emisión seguida a 615 nm y 665 nm.

Cuando se sometió a ensayo el compuesto 1 en este ensayo, se midió un valor de K_i de 35 nM.

Ejemplo 1.5 Ensayo de inhibición de JAK3

Se adquirió JAK3 recombinante humano (amino ácidos 781-1124; número de catálogo PV3855) en Invitrogen. Se incubó 0,025 mU de JAK3 con 2,5 μ g de sustrato de poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (25 mM Tris pH 7,5, EGTA 0,5 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, g-glicerolfosfato 5 mM, Tritón X-100 0,01 %, ATP no radioactivo 1 μ M, gamma-ATP- ^{33}P 0,25 μ Ci (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales), con o sin 5 μ l que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final de 1 %), en un volumen total de un 25 μ l, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, V-bottom). Tras 105 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones por medio de la adición de 25 μ l/pocillo de ácido fosfórico 15 mM. Se transfirió toda la reacción de quinasa terminada a placas filtrantes de 96 pocillos pre-lavadas (ácido fosfórico de 75 mM) (Perkin Elmer número de catálogo 6005177) usando un dispositivo de recogida de células (Perkin Elmer). Se lavaron las placas 6 veces con 300 μ l por pocillo de una disolución de ácido fosfórico de 75 mM y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 μ l/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y se llevó a cabo la lectura usando un Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μ M estaurosporina) de cpm obtenido en presencia del vehículo. Se determinó la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir esta actividad como:

Inhibición en porcentaje = ((cpm determinado para la muestra con el compuesto de ensayo presente - cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido entre (cpm determinado en presencia del vehículo - cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para el compuesto, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo JAK3 y el cálculo de IC_{50} para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto de forma rutinaria a una concentración de 20 μ M seguido de una dilución seriada 1/3, 8 puntos (20 μ M - 6,67 μ M - 2,22 μ M - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de DMSO de 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 μ M, 1 μ M). Los datos se expresan como el valor de IC_{50} medio a partir del ensayo \pm el error estándar de la media.

Tabla V: Valores de IC_{50} de JAK3 del Compuesto

Cpd #	JAK3 (nM)
1	408 \pm 62

Ejemplo 1.6 Ensayo de determinación K_i de JAK3

Para la determinación de K_i , se mezclaron cantidades diferentes de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de K_i por medio de representación recíproca doble de K_m vs la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usó JAK3 (Carna Biosciences, 09CBS-0625B) a una concentración final de 10 ng/ml. El sustrato fue sal de Poli(Glu, Tyr)sodio (4:1), PM 20 000 - 50 000 (Sigma, P0275). Se llevó a cabo la reacción en Tris 25 mM pH 7,5; Triton X-100 0,01 %, EGTA 0,5 mM, DTT 2,5 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, b-glicerolfosfato 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM con concentraciones variables de ATP y compuesto y se detuvo por medio de la adición de ácido fosfórico 150 mM. Se llevó a cabo la medición de fosfato incorporado en el sustrato poliGT colocando las muestras en una placa filtrante (usando un dispositivo de recogida, Perkin Elmer) y posterior lavado. Se mide ^{33}P incorporado en poliGT en un contador de centelleo Topcount tras la adición de líquido de centelleo a las placas filtrantes (Perkin Elmer).

Cuando se sometió a ensayo el Compuesto 1, se midió un valor de K_i de 188 nM.

Ejemplo 1.7 Ensayo de inhibición de TYK2

- Se adquirió dominio catalítico de TYK2 recombinante humano (amino ácidos 871-1187; número de catálogo 08-147) en Carna biosciences. Se incubaron 5 ng de TYK2 con 12,5 µg de sustrato de poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (25 mM Hepes pH 7,5, NaCl 100 mM, Na₃VO₄ 0,2 mM, NP-40 0,1 %, ATP no radioactivo 0,1 µM, gamma-ATP-³³P 0,125 µCi (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales), con o sin 5 µl que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final de 1 %), en un volumen total de un 25 µl, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, V-bottom). Tras 90 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones por medio de la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. Se transfirió toda la reacción de quinasa terminada a placas filtrantes de 96 pocillos pre-lavadas (ácido fosfórico de 75 mM) (Perkin Elmer número de catálogo 6005177) usando un dispositivo de recogida de células (Perkin Elmer). Se lavaron las placas 6 veces con 300 µl por pocillo de una disolución de ácido fosfórico de 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 llevó a cabo la lectura usando un Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µM estaurosporina) de cpm obtenido en presencia del vehículo. Se determinó la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir esta actividad como:
- Inhibición en porcentaje = ((cpm determinado para la muestra con el compuesto de ensayo presente - cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido entre (cpm determinado en presencia del vehículo - cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo TYK2 y el cálculo de IC₅₀ para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto de forma rutinaria a una concentración de 20 µM seguido de una dilución seriada 1/3, 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 DMSO de 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Tabla VI: Valores de IC₅₀ de TYK2 del Compuesto

Cpd #	TYK2 (nM)
1	219 ± 37

25

Ejemplo 2. Ensayos celulares

Ejemplo 2.1. Ensayo de generación de señal de JAK-STAT:

Se mantuvieron células HeLa en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía un 10 % de suero de ternero fetal inactivado térmicamente de 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se usaron las células HeLa a una confluencia de 70 % para la transfección. Se sometieron a transfección de manera transitoria 20 000 células en un medio de cultivo celular de 87 µl con 40 ng de indicador de pSTAT1(2)-luciferasa (Panomics), 8 ng de indicador LacZ como indicador de control interno y 52 ng de pBSK usando 0,32 µl de Jet-PEI (Polypus) como reactivo de transfección por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos. Tras incubación durante la noche a 37 °C, 10 % de CO₂, se retiró el medio de transfección, se añadieron 75 µl de DMEM 1° 1,5 % de suero de ternero inactivado térmicamente. Se añadieron 15 µl de compuesto a una concentración de 6,7 veces durante 60 min y posteriormente se 10 µl de OSM humano (Peprotech) a 33 ng/ml de concentración final.

Se sometieron a ensayo todos los compuestos por duplicado comenzando desde 20 µM seguido por una dilución seriada de 1/3, 8 dosis en total (20 µM - 6,6 µM - 2,2 µM - 740 nM - 250 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de DMSO de 0,2 %.

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

Se usaron 40 µl de lisato celular para leer la actividad de β-galactosidasa por medio de la adición de 180 µl de disolución de βGal (30 µl de ONPG 4 mg/ml + 150 µl de tampón de β-galactosidasa (Na₂HPO₄ 0,06 M, NaH₂PO₄ 0,04 M, MgCl₂ 1 mM)) durante 20 min. Se detuvo la reacción por medio de la adición de 50 µl de Na₂CO₃ 1M. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

Se midió la actividad de luciferasa usando 40 µl de lisato celular más 40 µl de Steadlyte® como se describe por medio del fabricante (Perkin Elmer), en el Envision (Perkin Elmer).

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

50

Inhibición en porcentaje = ((fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente) dividido entre (fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra sin estimulación))*100

5 Se representaron los valores de PIN para los compuestos sometidos a ensayo en dosis-respuesta y se derivaron los valores de EC₅₀.

Tabla VII: Valores de IC₅₀ de generación de señal de STAT del Compuesto

Cpd #	EC ₅₀ (nM)
1	539 ± 130

Ejemplo 2.2. Ensayo de generación de señal de OSMIL-1β

10 Se observó que OSM y IL-1β sobre-regulaban de forma sinérgica los niveles de MMP13 en estirpes celulares de condrosarcoma humano SW1353. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo en un volumen de 120 μl DMEM (Invitrogen) que contenía FBS de 10 % (v/v) y penicilina 1 %/estreptomycina (Invitrogen) incubado a 37 °C, 5 % de CO₂. Se preincubaron las células con 15μl de compuesto en medio M199 con 2 % de DMSO 1 h antes de la estimulación con 15 μl de OSM y IL-1β para alcanzar 25 ng/ml de OSM y 1 ng/ml de IL-1β, y se midieron los niveles de MMP13 en medio acondicionado 48 h tras la estimulación. Se midió la actividad de
15 MMP13 usando un ensayo de actividad de captura de anticuerpos. Para este fin, se revistieron placas de 384 pocillos (NUNC, 460518, negro de MaxiSorb) con 35 μl de una disolución de anticuerpo MMP13 anti-humano de 1,5 μg/ml (R&D Systems, MAB511) durante 24 h a 4 °C. Tras el lavado de los pocillos 2 veces con PBS + Tween 0,05 %, se bloquearon los sitios de unión restantes con 100 μl de leche en polvo desnatada de 5 % (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) en PBS durante 24 h a 4 °C. A continuación, se lavaron los pocillos 2 veces con PBS + Tween de 0,05 % y se añadieron 35 μl de dilución 1/10 de sobrenadante de cultivo que contenía MMP13 en un tampón de bloqueo diluido
20 100 veces y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los pocillos dos veces con PBS + Tween de 0,05 % seguido de activación de MMP13 por medio de adición de 35 μl de disolución de acetato aminofenilmercúrico 1,5 mM (APMA) (Sigma, A9563) e incubación a 37 °C durante 1 h. Se lavaron los pocillos de nuevo con PBS + Tween 0,05 % y se añadieron 35 μl de sustrato MMP13 (Blomol, P-126, sustrato fluorogénico
25 OmniMMP). Tras incubación durante 24 horas a 37 °C se midió la fluorescencia del sustrato convertido en un Perkin Elmer Wallac Envision 2102 Multilabel Reader (longitud de onda de excitación: 320 nm, longitud de onda de emisión: 405 nm)

30 Inhibición en porcentaje = ((fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente) dividido entre (fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra sin estimulación))*100

Los datos se expresan como EC₅₀ medio de los ensayos ± erros estándar de la media.

Inhibición en porcentaje = ((fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente) dividido entre (fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra sin estimulación))*100

35 **Tabla VIII: Valores de IC₅₀ de MMP13 del Compuesto**

Cpd #	EC ₅₀ (nM)
1	4196 ± 2370

Ejemplo 2.3. Ensayo de proliferación de PBL

40 Se estimulan linfocitos sanguíneos periféricos humanos (PBL) con IL-2 y se mide la proliferación usando un ensayo de incorporación de BrdU. En primer lugar, se estimula el PBL durante 72 h con PHA para inducir el receptor IL-2, de prolongó durante 24 h para detener la proliferación celular seguido de estimulación de IL-2 durante otras 72 h (incluyendo 24 h de marcaje BrdU). Se preincubaron las células con compuestos de ensayo 1 h antes de la adición de IL-2. Se sometieron las células a cultivo en RPMI 1640 que contenía 10 % (v/v) de PBS.

Ejemplo 2.4. Ensayos Sangre Total (WBA)

2.4.1. Protocolo de estimulación de IFN α

45 Para predecir la selectividad de los compuestos de ensayo para inhibir JAK1 sobre los mecanismos de generación

de señal dependientes de JAK2 *in vivo*, se desarrolló un modelo *in vitro* fisiológicamente relevante usando sangre humana. En el ensayo WBA, se extrajo sangre de voluntarios humanos con consentimiento, se trató *ex vivo* con compuesto (1 h) y posteriormente se estimuló durante 30 min con interferón α (IFN α , mecanismo dependiente de JAK1) o durante 2 h con factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocito (GM-CSF, mecanismo dependiente de JAK2).

2.4.1.1 Ensayo de fosfo-STAT1

Para la estimulación IFN α , se midió el aumento de la fosforilación de Transductores de Señal y Activadores de Transcripción 1 (pSTAT1) por parte de IFN α en extractos celulares de leucocitos usando un ensayo de ELISA pSTAT1. La fosforilación del Transductor de Señal y Activador de Transcripción 1 (STAT1) tras la estimulación con interferon alfa (IFN α) es un evento con mediación de JAK1. El ensayo de fosfo-STAT1, que se usó para medir los niveles de fosfo-STAT1 en extractos celulares, se desarrolló para evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir los mecanismos de generación de señales dependientes de JAK1.

Se trató *ex vivo* sangre humana, extraída a voluntarios con consentimiento, con el compuesto (1 h) y posteriormente se estimuló durante 30 min con IFN α . Se midió el aumento de la fosforilación de STAT1 por parte de IFN α en extractos celulares de leucocitos usando ELISA fosfo-STAT1.

El tampón de lisis ACK consistió en NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM. El pH del tampón fue de 7,3.

Se diluyó 10 veces un concentrado de tampón de lisis celular x 10 (parte del estuche de ELISA intercalado PathScan Phospho-STAT1 (Tyr701) de Cell Signalling) en H₂O. Se añadieron inhibidores de proteínasa al tampón antes de su uso.

Se disolvieron 20 μ g de IFN α en 40 μ l de H₂O para obtener una disolución de reserva de 500 μ g/ml. Se almacenó la disolución de reserva a -20 °C.

Se preparó una serie de dilución de 3 veces del compuesto en DMSO (concentración más elevada: 10 mM). Posteriormente, se diluyó el compuesto de forma adicional en el medio (factor de dilución dependiente de la concentración final de compuesto deseada).

2.4.1.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con IFN α

Se recogió sangre humana en tubos tratados con heparina. Se dividió la sangre en alícuotas de 392 μ l. Posteriormente, se añadieron 4 μ l de dilución de compuesto a cada alícuota y se incubaron las muestras de sangre durante 1 h a 37 °C. Se diluyó la disolución de reserva de IFN α 1000 veces en medio de RPMI para obtener una disolución de trabajo de 500 ng/ml. Se añadieron 4 μ l de disolución de trabajo de 500 ng/ml a las muestras de sangre (concentración final de IFN α : 5 ng/ml). Se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 min.

2.4.1.1.2 Preparación de extractos celulares

Al final del período de estimulación, se añadieron 7,6 ml de tampón de ACK a las muestras de sangre para producir la lisis de los eritrocitos. Se mezclaron las muestras invirtiendo los tubos cinco veces y se incubó la reacción en hielo durante 5 min. La lisis de RBC debería ser evidente durante esta incubación. Se sometieron las células a formación de microgránulos por medio de centrifugación a 300 g, 4 °C durante 7 min y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de PBS a cada tubo y se resuspendió el microgránulo celular. Se centrifugaron las muestras de nuevo durante 7 min a 300 g, 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el microgránulo en 500 μ l de 1 x PBS. Posteriormente, se transfirió la suspensión celular a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Se sometieron las células a formación de microgránulos por medio de centrifugación a 700 g durante 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se disolvió el microgránulo en 150 μ l de tampón de lisis celular. Se incubaron las células en hielo durante 15 min. Después de eso, se almacenaron las células a -80 °C hasta el procesado posterior.

2.4.1.1.3 Medición de la fosforilación de STAT1 por medio de ELISA

Se usó el estuche Pathscan Phospho-STAT1 (Tyr701) Sandwich ELISA de Cell Signalling (Nº. Cat. #7234) para determinar los niveles de Fosfo-STAT1.

Se descongelaron extractos celulares en hielo. Se centrifugaron los tubos durante 5 min a 16.000 g, 4 °C y se recogieron los lisatos limpios. Al mismo tiempo, se equilibraron tiras de micropocillo procedentes del estuche a temperatura ambiente y se preparó tampón de lavado por medio de dilución de 20 x tampón de lavado en H₂O. Se diluyeron las muestras 2 veces en diluyente de muestra y se añadieron 100 μ l a las tiras de micropocillo. Se incubaron las tiras durante la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se lavaron las tiras 3 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo de detección a los pocillos. Se incubaron las tiras a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3 veces con tampón de lavado de nuevo. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario con unión de HRP a cada pocillo y se incubaron

las muestras a 37 °C. Trascurridos 30 min, se lavaron los pocillos 3 veces de nuevo y se añadieron 100 µl de sustrato de TMB a todos los pocillos. Cuando las muestras se volvieron azules, se añadieron 100 µl de disolución STOP para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm.

2.4.1.2. ELISA IL-8

- 5 Para la estimulación de GM-CSF, se midió el aumento de los niveles de interleucina-8 (IL-8) en plasma usando un ensayo ELISA IL-8. La expresión de interleucina 8 (IL-8) inducida por factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocito (GM-CSF) es un evento con mediación de JAK2. Se desarrolló ELISA IL-8, que se puede usar para medir los niveles de IL-8 en muestras de plasma, para evaluar la capacidad del compuesto para inhibir los mecanismos de generación de señales dependientes de JAK2.
- 10 Se trató *ex vivo* sangre humana, extraída a voluntarios con consentimiento, con el compuesto (1 h) y posteriormente se estimuló durante 2 h con GM-CSF. Se midió el aumento de los niveles de IL-8 en plasma usando un ensayo de ELISA IL-8.

Se disolvieron 10 µg de GM-CSF en 100 µl de H₂O para obtener una disolución de reserva de 100 µg/ml. Se almacenó la disolución de reserva a -20 °C.

- 15 Se preparó una serie de dilución de 3 veces del compuesto de ensayo en DMSO (concentración más elevada: 10 mM). Posteriormente, se diluyó de manera adicional en medio (factor de dilución dependiente de la concentración final de compuesto deseada)

2.4.1.2.1 Incubación de sangre con compuesto y estimulación con GM-CSF

- 20 Se recogió sangre humana en tubos tratados con heparina. Se dividió la sangre en alícuotas de 245 µl. Posteriormente, se añadieron 2,5 µl de compuesto de ensayo a cada alícuota y se incubaron las muestras de sangre durante 1 h a 37 °C. Se diluyó la disolución de reserva de GM-CSF 100 veces en medio de RPMI para obtener una disolución de trabajo de 1 µg/ml. Se añadieron 2,5 µl de disolución de trabajo de 1 µg/ml a las muestras de sangre (concentración final GM-CSF: 10 ng/ml). Se incubaron las muestras a 37 °C durante 2 h.

2.4.1.2.2 Preparación de las muestras de plasma

- 25 Se centrifugaron las muestras durante 15 min a 1.000 g, 4 °C. Se recogieron 100 µl de plasma y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

2.4.1.2.3 Medición de niveles de IL-8 por medio de ELISA

Se usó el estuche de Inmunoensayo Quimioluminiscente IL-8 Humano de R&D Systems (Nº. Cat. Q8000B) para determinar los niveles de IL-8.

- 30 Se preparó tampón de lavado por medio de dilución de 10 x tampón de lavado en H₂O. Se preparó reactivo de trabajo glo por medio de la adición de 1 parte de Reactivo Glo 1 a 2 partes de Reactivo glo B de 15 min a 4 h antes de su uso.

- 35 Se añadieron 100 µl de RD1-86 diluyente de ensayo a cada pocillo. Después de eso, se añadieron 50 µl de muestra (plasma). Se incubó la placa de ELISA durante 2 h a temperatura ambiente, 500 rpm. Se lavaron todos los pocillos con tampón de lavado y se añadieron 200 µl de conjugado de IL-8 a cada pocillo. Tras la incubación durante 3 h a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos 4 veces con tampón de lavado y se añadieron 100 µl de reactivo de trabajo glo a cada pocillo. Se incubó la placa de ELISA durante 5 min a temperatura ambiente (protegida de la luz). Se midió la luminiscencia (tiempo de lectura 0,5 s/pocillo).

2.4.1.3. Resultados

- 40 El pIC₅₀ del Compuesto 1 para inhibir el aumento de los niveles de pSTAT1 inducido de INF α fue de $6,32 \pm 0,07$ (SEM), al tiempo que pIC₅₀ para la inhibición del aumento de IL-8 inducido por GM-CSF de $4,87 \pm 0,13$ (SEM) (resultados obtenidos usando 6 donantes de sangre). Esto demuestra que el Compuesto 1 es 28 veces más selectivo para el mecanismo JAK2 frente al mecanismo JAK1. Por tanto, en una configuración celular, está claro que el Compuesto 1 exhibe selectividad para JAK1 con respecto a JAK2. Parece que el compuesto 1 exhibe una selectividad mayor para JAK1 y JAK2 en comparación con los compuestos relacionados conocidos, u otros inhibidores de JAK conocidos.

2.4.1.3. Tratamiento de administración de datos y resultados

- 50 Con el fin de refinar los resultados, se representaron la inhibición de la inducción de fosfoSTAT1 por medio de extractos celulares INF α o la inhibición de la inducción de IL-8 por parte de GM-CSF en plasma frente a la concentración de compuesto y se extrajeron los valores de IC₅₀ usando un soporte lógico de Graphpad. Se conservaron los datos si R² fuer mayor de 0,8 y la pendiente de hill fue menor de 3 y únicamente se conservaron los

donantes para los cuales se obtuvieron datos válidos para ambos ensayos.

Por ejemplo, cuando se sometieron a este protocolo de análisis de datos adicional, el valor medido de pIC_{50} para el Compuesto 1 para inhibir el aumento de los niveles de pSTAT1 inducido por $INF\alpha$ fue de $6,21 \pm 0,09$ (SEM), mientras que pIC_{50} para la inhibición del aumento de IL-8 inducido por GM-CSF fue de $4,97 \pm 0,14$ (SEM) (resultados obtenidos usando 6 donantes de sangre). Esto confirma que el Compuesto 1 es 17,6 veces más selectivo para el mecanismo de JAK1 que para el mecanismo de JAK2. Por tanto, en una configuración celular es evidente que el Compuesto 1 exhibe selectividad para JAK1 con respecto a JAK2. Parece que el Compuesto 1 exhibe una selectividad mayor para JAK1 que para JAK2, en comparación con los compuestos estructuralmente relacionados conocidos, u otros inhibidores de JAK conocidos.

10 2.4.2. Protocolo de estimulación IL-6

También se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo para establecer la selectividad del compuesto para JAK1 con respecto a JAK2, *ex vivo* usando sangre humana. Por tanto, se extrajo sangre a voluntarios humanos con consentimiento. Posteriormente se equilibró la sangre durante 30 min a 37 °C bajo oscilación moderada, posteriormente se separó en alícuotas en tubos de Eppendorf. Se añadió el compuesto a diferentes concentraciones y se incubó a 37 °C durante 30 min bajo agitación moderada y posteriormente se estimuló durante 20 min a 37 °C bajo agitación moderada con interleucina 6 (IL-6) para la estimulación de mecanismo dependiente de JAK-1 o la estimulación del mecanismo dependiente de GM-CSF o JAK2. A continuación, se evaluaron fosfo-STAT1 y fosfo-STAT5 usando análisis de FACS.

2.4.2.1 Ensayos de fosfo-STAT1

20 Para el aumento de fosforilación de Transductores de Señal y Activadores de Transcripción 1 (pSTAT1) estimulados por IL-6 en leucocitos, se extrajo sangre humana a voluntarios con consentimiento, se trató *ex vivo* con el compuesto durante 30 min y posteriormente se estimuló durante 20 min con IL-6. Se midió el aumento de fosforilación de STAT1 por medio de linfocitos IL-6 usando un anticuerpo anti fosfo-STAT1 por medio de FACS.

25 Se diluyó el tampón 5 X de lisis/fijación (BD PhosFlow, N°.Cat. 558049) 5 veces con agua destilada y se pre-calentó a 37 °C. Se descartó el tampón de lisis/fijación diluido restante.

Se disolvieron 10 µg de rhIL-6 (R&D Systems, N°. Cat. 206-IL) en 1 ml de PBS 0,1 % BSA para obtener una disolución de reserva de 10 µg/ml. Se almacenó la disolución de reserva en forma de alícuotas a -80 °C.

30 Se prepararon series de dilución de 3 veces del compuesto en DMSO (disolución de reserva de 10 mM). Las muestras tratadas con el control recibieron DMSO en lugar del compuesto. Se incubaron todas las muestras con una concentración final de DMSO de 1 %.

2.4.2.1.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con IL-6

35 Se recogió sangre humana en tubos tratados con heparina. Se dividió la sangre en alícuotas de 148 µl. Posteriormente, se añadieron 1,5 µl de dilución de compuesto a cada alícuota y se incubaron las muestras de sangre durante 30 min a 37 °C bajo oscilación moderada. Se añadió la disolución de reserva IL-6 (1,5 µl) a las muestras de sangre (concentración final de 10 ng/ml) y se incubaron las muestras a 37 °C durante 20 min bajo oscilación moderada.

2.4.2.1.2 Preparación de muestras de leucocitos y marcaje CD4

40 Al final del período de estimulación, se añadieron de forma inmediata 3 ml de 1 x tampón de lisis/fijación pre-calentado a las muestras de sangre, se sometió a agitación vorticial brevemente y se incubó durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de someter a lisis los eritrocitos y fijar los leucocitos, posteriormente se congeló a -80 °C hasta su uso posterior.

45 Para las etapas siguientes, se descongelaron los tubos a 37 °C durante aproximadamente 20 min y se centrifugaron durante 5 min a 400 g a 4 °C. Se lavó el microgránulo celular con 3 ml de 1 X PBS frío, y tras la centrifugación del microgránulo celular, se re-suspendió en 100 µl de PBS que contenía BSA 3 %. Se añadieron anticuerpo anti-CD4 conjugado-FITC o anticuerpo de isotipo conjugado-FITC de control y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, en oscuridad.

2.4.2.1.3 Permeabilización de células y marcaje con anticuerpo anti Phospho-STAT1

50 Tras lavar las células con 1 X PBS, se re-suspendió el microgránulo celular en 100 µl de 1 x PBS enfriado en hielo y se añadieron 900 µl de metanol de 100 % enfriado en hielo. Posteriormente, se incubaron las células a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

A continuación, se lavaron las células permeabilizadas con 1 x PBS que contenía BSA 3 % y finalmente se re-suspendieron en 80 µl de 1 X PBX que contenía BSA 3 %.

Se añadieron 20 µl de anti-STAT1 de ratón PE (pY701) o anticuerpo de control de isotipo IgG2aκ de ratón PE (BD Biosciences, N°. Cat. 612564 y 559319, respectivamente) y se mezcló, posteriormente se incubó durante 30 min a 4 °C, en oscuridad.

5 A continuación, se lavaron las células una vez con 1 x PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

2.4.2.1.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

10 Se contaron 50 000 eventos totales y se midieron células positivas Phospho-STAT1 tras colocación sobre células CD4+, en la ventana de linfocito. Se analizaron los datos usando el soporte lógico de FACSDiva y correspondiendo al porcentaje de inhibición de estimulación de IL-6 calculado sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 sobre células CD4+.

2.4.2.2 Ensayo de Fosfo-STAT5

15 Para el aumento de fosforilación de Transductores de Señal y Activadores de Transcripción 1 (pSTAT5) estimulados por GM-CSF en leucocitos, se extrajo sangre humana a voluntarios con consentimiento, se trató *ex vivo* con el compuesto durante 30 min y posteriormente se estimuló durante 20 min con GM-CSF. Se midió el aumento de fosforilación de STAT5 por medio de monocitos GM-CSF usando un anticuerpo anti fosfo-STAT5 por medio de FACS.

Se diluyó el tampón 5 X de lisis/fijación (BD PhosFlow, N°.Cat. 558049) 5 veces con agua destilada y se pre-calentó a 37 °C. Se descartó el tampón de lisis/fijación diluido restante.

20 Se disolvieron 10 µg de rhGM-CSF (AbCys S.A., N°. Cat. P300-03) en 100 µl de PBS 0,1 % BSA para obtener una disolución de reserva de 100 µg/ml. Se almacenó la disolución de reserva en forma de alícuotas a -80 °C.

Se prepararon series de dilución de 3 veces del compuesto en DMSO (disolución de reserva de 10 mM). Las muestras tratadas con el control recibieron DMSO sin ningún compuesto de ensayo. Se incubaron todas las muestras con una concentración final de DMSO de 1 %.

2.4.2.2.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con GM-CSF

25 Se recogió sangre humana en tubos tratados con heparina. Se dividió la sangre en alícuotas de 148,5 µl. Posteriormente, se añadieron 1,5 µl de dilución de compuesto a cada alícuota y se incubaron las muestras de sangre durante 30 min a 37 °C bajo oscilación moderada. Se añadió la disolución de reserva GM-CSF (1,5 µl) a las muestras de sangre (concentración final de 20 pg/ml) y se incubaron las muestras a 37 °C durante 20 min bajo oscilación moderada.

30 2.4.2.2.2 Preparación de muestras de leucocitos y marcaje CD14

Al final del período de estimulación, se añadieron de forma inmediata 3 ml de 1 x tampón de lisis/fijación pre-calentado a las muestras de sangre, se sometió a agitación vorticial brevemente y se incubó durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de someter a lisis los eritrocitos y fijar los leucocitos, posteriormente se congeló a -80 °C hasta su uso posterior.

35 Para las etapas siguientes, se descongelaron los tubos a 37 °C durante aproximadamente 20 min y se centrifugaron durante 5 min a 400 g a 4 °C. Se lavó el microgránulo celular con 3 ml de 1 X PBS frío, y tras la centrifugación del microgránulo celular, se re-suspendió en 100 µl de PBS que contenía BSA 3 %. Se añadieron anticuerpo anti-CD4 de ratón FITC (BD Biosciences, N°. Cata. 345784) o anticuerpo de isotipo IgG2bκ de ratón FITC de control (BD Biosciences, N°. Cat. 555057) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, en oscuridad.

40 2.4.2.2.3 Permeabilización de células y marcaje con anticuerpo anti Phospho-STAT5

Tras lavar las células con 1 X PBS, se re-suspendió el microgránulo celular en 100 µl de 1 x PBS enfriado en hielo y se añadieron 900 µl de metanol de 100 % enfriado en hielo. Posteriormente, se incubaron las células a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

45 A continuación, se lavaron las células permeabilizadas con 1 x PBS que contenía BSA 3 % y finalmente se re-suspendieron en 80 µl de 1 X PBS que contenía BSA 3 %.

Se añadieron 20 µl de anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o anticuerpo de control de isotipo IgG1κ de ratón PE (BD Biosciences, N°. Cat. 612567 y 554680, respectivamente) y se mezcló, posteriormente se incubó durante 30 min a 4 °C, en oscuridad.

50 Posteriormente, se incubaron las células una vez con 1 x PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

2.4.2.2.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

Se contaron 50 000 eventos totales y se midieron células positivas Phospho-STAT5 tras colocación sobre células CD14+. Se analizaron los datos usando el soporte lógico de FACSDiva y correspondiendo al porcentaje de inhibición de estimulación de GM-CSF calculado sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT5 sobre células CD14+.

2.4.2.3. Resultados

Cuando se sometió a este protocolo, se determinó el porcentaje de inhibición (PIN) obtenido a partir de la media de 3 voluntarios sanos para el compuesto de la invención. Por ejemplo, se sometió a ensayo el Compuesto 1 y se volvió a $pIC_{50} = 6,61$ en la inhibición de la fosforilación de STAT1 y $pIC_{50} = 5,37$ en la inhibición de la fosforilación de STAT5.

Cuando se compara el efecto del Compuesto 1 sobre STAT1 (mecanismo dependiente de JAK1) y STAT5 (mecanismo dependiente de JAK-2), se midió una selectividad de 17,6 veces para JAK1 vs JAK2.

Ejemplo 3. Modelos in vivo

Ejemplo 3.1. Modelo CIA

3.1.1 Materiales

Se adquirió adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA) en Difco. Se obtuvieron colágeno de tipo II bovino (CII), lipopolisacárido (LPS) y Enbrel en Chondrex (Isle d'Abeau, Francia); Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, Francia), Whyett (jeringa inyectable de 25 mg, Francia), Acros Organics (Palo Alto, CA), respectivamente. Los reactivos usados fueron de calidad de reactivo y todos los disolventes fueron de calidad analítica.

3.1.2. Animales

Se obtienen ratas de Dark Agouti (macho, de 7-8 semanas) en Harlan Laboratories (Maison-Alfort, Francia). Se obtienen ratones DBA/1J (macho, 7 semanas) en Centre d'Elevage et de Reproduction JANVIER (CERJ) (Laval, Francia). Se mantuvieron las ratas y los ratones en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (0700-1900). Se mantuvo la temperatura en 22 °C, y se proporcionaron agua y alimenta según demanda.

3.1.3 Artritis inducida por colágeno (CIA)

Un día antes del experimento, se preparó una disolución 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 por medio de un dispositivo de homogeneización en una botella de vidrio pre-enfriada en un baño de agua con hielo. Se podría requerir adyuvante extra y homogeneización prolongada si no se formara ninguna emulsión.

Ratones: se inyectaron 0,1 ml de emulsión por vía intradérmica en la base de la cola de cada ratón en el día 1, y se llevó a cabo una segunda inyección intradérmica de refuerzo (disolución CII a 1 mg/ml de CFA en 0,1 ml de disolución salina) en el día 21. Se modificó este procedimiento de inmunización a partir de los procedimientos publicados (David D Brand Kary A Latham, & Edward R Rosloniec. Collagen-induce arthritis, Nature Methods 2 (5): 1269-1275, 2007).

Rata: se inyectaron 0,2 ml de emulsión por vía intradérmica en la base de la cola de cada rata en el día 1, y se llevó a cabo una segunda inyección intradérmica de refuerzo (disolución CII a 2 mg/ml en CFA en 0,1 ml de disolución salina) en el día 9. Se modificó este procedimiento de inmunización a partir de los procedimientos publicados (Sims NA et al., (2004). Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induce arthritis, Arthritis Rheum. 50 2338-2346; Jou et al, 2005).

3.1.4. Diseño de estudio

Se sometieron a ensayo los efectos terapéuticos de los compuestos de ensayo en el modelo de rata y ratón CIA. Se dividieron aleatoriamente los animales en grupos iguales, conteniendo cada grupo 10 animales. Se inmunizaron todas las ratas en el día 1 y se reforzaron en el día 9. Se inmunizaron todos los ratones en el día 1 y se reforzaron en el día 9. La dosificación terapéutica duró desde el día 16 hasta el día 30. Se trató el grupo de control negativo con vehículo (MC 0,5 %) y el grupo de control positivo con Enbrel (10 mg/kg, 3 x semanas, s.c.). Normalmente, se sometió a ensayo un compuesto de interés en 3 dosis, por ejemplo, 3, 10, 30 mg/kg, p.o.

3.1.5. Evaluación clínica de artritis

Se clasificó la artritis de acuerdo con el procedimiento de Khachigian 2006, Lin et al 2007 y Nishida et al 2004. Se clasificó el hinchamiento de cada uno de las cuatro patas con la puntuación artrítica siguiente: 0 - sin síntomas; 1 - enrojecimiento moderado pero definitivo e hinchamiento de un tipo de articulación tal como tobillo o muñeca, o

enrojecimiento aparente e hinchamiento limitado hasta dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados; 2 - enrojecimiento moderado e hinchamiento de dos o más tipos de articulaciones; 3 - enrojecimiento severo e hinchamiento de toda la pata incluyendo los dedos; 4 - extremidad con inflamación máxima con afectación de múltiples articulaciones (puntuación máxima acumulada de artritis clínica de 16 por cada animal) (Nishida et al., 2004).

Para permitir el meta-análisis de estudios múltiples se normalizaron los valores de puntuación clínica como se muestra a continuación:

AUC de la puntuación clínica (puntuación AUC): Se calculó el área bajo la curva (AUC) desde el día 1 al día 14 para cada rata individual. Se dividió el AUC de cada animal entre la el AUC medio obtenido para el vehículo en el estudio a partir del cual se obtuvieron los datos de ese animal y se multiplicó por 100 (es decir, el AUC se expresó como porcentaje de AUC medio del vehículo por estudio).

Aumento de puntuación clínica desde el día 1 hasta el día 14 (puntuación de punto final): Se dividió la diferencia de puntuación clínica de cada animal entre la diferencia de puntuación clínica media obtenida para el vehículo en el estudio a partir del cual se obtuvieron los datos para ese animal y se multiplicó por 100 (es decir, la diferencia se expresa como un porcentaje de la diferencia de puntuación clínica media para el vehículo por estudio).

3.1.6 Cambio de peso corporal (%) tras la aparición de artritis

Clínicamente, la pérdida de peso corporal se asocia a artritis (Shelton et al., 2005; Argiles et al., 1998; Rall, 2004; Walsmith et al., 2004). Además, se podrían usar los cambios en el peso corporal tras la aparición de artritis como punto final no específico para evaluar el efecto de las sustancias terapéuticas en el modelo de ratas. Se calculó el cambio en el peso corporal (%) tras la aparición de artritis como se muestra 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 Puntuación de Larsen

Se obtuvo la puntuación de Larsen, después de la muerte, para ambas patas posteriores de todas las ratas por parte de la menos 2 científicos. Se calculó la media de estas puntuaciones para obtener un puntuación de Larsen por rata. Para permitir la comparación entre estudios de puntuaciones de Larsen, se dividió la puntuación de Larsen de cada rata entre la puntuación de Larsen obtenida para el vehículo en el estudio al cual pertenece la rata y se multiplicó por 100 (es decir, se expresa la puntuación de Larsen como el porcentaje de puntuación de Larsen media de vehículo por estudio). Se calcula y se compara la puntuación de Larsen media de los diferentes grupos de tratamiento.

3.1.8 Radiología

Se tomaron fotografías de rayos X de las patas posteriores de cada animal individual. Se asignó un número de identidad aleatorio con anonimato a cada una de las fotografías, y se puntuó la gravedad de la erosión ósea por parte de dos evaluadores independientes con el sistema de puntuación de Larsen radiológico que se muestra a continuación: 0 - normal con contorno óseo intacto y espacio articular normal; 1 - ligera anomalía con uno o dos huesos metatarsianos exteriores que muestran ligera erosión ósea; 2 - anomalía preliminar definida con cualquiera de los tres a cinco huesos metatarsianos exteriores mostrando erosión ósea; 3 - anomalía destructiva media con todos los huesos metatarsianos exteriores así como uno o dos de los huesos metatarsianos interiores mostrando erosiones óseas definidas; 4 -a anomalía destructiva grave con todos los huesos metatarsianos que muestran erosión ósea definida y al menos una de las articulaciones metatarsianas internas completamente erosionada dejando parte del contorno óseo de la articulación parcialmente conservada; 5 - anomalía mutilante sin contornos óseos. Este sistema de puntuación es una modificación del de Salvemini et al., 2001; Bush et al., 2002; Sims et al., 2004; Jou et al., 2005.

3.1.9 Histología

Tras los análisis radiológicos, se fijaron las patas posteriores en formalina tamponada con fosfato 10 % (pH 7,4), se descalcificaron con agente de descalcificación ósea rápida para llevar a cabo la histología fina (Laboratories Eurobio) y se intercalaron en parafina. Para garantizar la evaluación amplia de las articulaciones con artritis, se cortaron al menos cuatro sección en serie (de espesor de 5 µm) y se cada una de las series de secciones estuvieron separadas 100 µm. Se tiñeron las secciones con hematoxilina y eosina (H&E). Se llevaron a cabo exámenes histológicos, dobles con anonimato, para evaluar la inflamación sinovial y el daño óseo y sobre el cartílago. En cada pata, se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron infiltración celular, gravedad de granulación sinovial, erosión del cartílago y erosión ósea. Se llevó a cabo la puntuación como se muestra a continuación: 1 - normal, 2 - suave, 3 - moderada, 4 - marcada. Se sumaron estas cuatro puntuaciones

5 juntas y se representaron como una puntuación adicional, concretamente la "puntuación total RA". Para permitir la comparación de las lecturas histológicas entre estudios, se dividió la puntuación histológica total de cada rata entre la puntuación histológica total media obtenida para el vehículo en el estudio al cual pertenece esa rata y se multiplicó por 100 (es decir, se expresa la puntuación histológica total como el porcentaje de la puntuación histológica total media del vehículo por estudio). Se calculó y se comparó la puntuación histológica total media de los diferentes grupos de tratamiento.

3.1.10 Análisis de tomografía micro-computerizada (μ C) de calcáneo

10 La degradación ósea observada en RA tiene lugar especialmente en el hueso cortical y puede revelarse por medio de análisis μ CT U(Sims NA et al., 2004; Oste L et al., ECTC Montreal 2007). Tras la evaluación y la reconstrucción de volumen 3D del calcáneo, se midió la degradación ósea como el número de objetos discretos presentes por cada corte, se aisló *in silico* perpendicular al eje longitudinal del hueso. Cuanto más se degradó el hueso, más objetivos discretos se midieron. Se analizaron 1000 cortes, distribuidos de manera uniforme a lo largo del calcáneo (separados aproximadamente 10,8 μ m).

3.1.11. Resultados

15 Se sometió a ensayo el Compuesto 1 en el estudio CIA de ratón a 30 mg/kg y en el estudio CIA de rata a 30, 10, 3 y 1 mg/kg. El compuesto 1 fue eficaz en todas las lecturas llevadas a cabo en el estudio CIA de rata, con significancia estadística en varias de las lecturas, en particular se observaron mejoras significativas para: el AUC de la puntuación clínica (de 10 mg/kg), la puntuación clínica de punto final (a partir de 1 mg/kg), la puntuación de Larsen (desde 30 mg/kg) y el hinchamiento de las patas (desde 1 mg/kg).

20 **Ejemplo 3.2. Modelo de choque séptico**

La inyección de lipopolisacárido (LPS) induce una liberación rápida del factor de necrosis tumoral soluble (TNF-alfa) en la periferia. Se usa este modelo para analizar los agentes de bloqueo prospectivos de liberación de TNF *in vivo*.

25 Se tratan seis ratones hembra BALB/cJ (20 g) por grupo con la dosis deseada de una vez, po. Treinta minutos más tarde, se inyecta LPS (15 μ g/kg; serotipo E-Coli 0111:B4) ip. Noventa minutos después, se sacrifica a los ratones y se recoge la sangre. Se determinan los niveles de TNF alfa circulantes usando estuches de ELISA disponibles comercialmente. Se usa dexametasona (5 μ g/kg) como compuesto anti-inflamatorio de referencia. Se someten a ensayo los compuestos seleccionados a una dosis o a dosis múltiples, por ejemplo, 3 y/o 10 y/o 30 mg/kg. po.

El Compuesto 1 exhibió una reducción estadísticamente significativa de la liberación de TNF (> 50 %) a 30 mg/kg po.

30 **Ejemplo 3.3. Modelo MAB**

El modelo MAB permite una evaluación rápida de la modulación de una respuesta inflamatoria de tipo RA por medio de sustancias terapéuticas (Kachigian LM. Nature Protocols (2006) 2512-2516: Collagen antibody-induced arthritis). Se inyectó por vía intravenosa un cóctel de mABs a ratones DBA/J dirigido contra colágeno II. Un día después, se inicia el tratamiento del compuesto (vehículo: 10 % (v/v) HP β CD). Tres días después, los ratones recibieron inyección LPS i.p. (50 μ g/ratón), dando como resultado la aparición rápida de la inflamación. Se continúa el tratamiento del compuesto hasta 10 días después de la inyección de mAb. Se lee la inflamación por medio de medición del hinchamiento de las patas y registrando la puntuación clínica de cada pata. Se presenta la puntuación acumulada clínica de artritis de las cuatro extremidades para mostrar la gravedad de la inflamación. Se aplica un sistema de puntuación a cada extremidad usando una escala 0-4, siendo el 4 la inflamación más grave.

40 0 Libre de síntomas

1 Enrojecimiento moderado pero definitivo e hinchamiento de un tipo de articulación tal como tobillo o muñeca, o enrojecimiento aparente e hinchamiento limitado hasta dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados

2 Enrojecimiento moderado e hinchamiento de dos o más tipos de articulaciones

45 3 Enrojecimiento severo e hinchamiento de toda la pata incluyendo los dedos

4 Extremidad con inflamación máxima con afectación de múltiples articulaciones

Ejemplo 3.4. Modelos oncológicos

50 Se describen modelos *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas frente a enfermedades mieloproliferativas accionadas por JAK2 por parte de Wernig et al. Cancer Cell 13, 311, 2008 y Geron et al. Cancer Cell 13, 321, 2008.

Ejemplo 3.5 Modelo IDB de ratón

Los modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas frente a IBD se describen por parte de

Wirtz et al., 2007.

Ejemplo 3.6 Modelo de asma animal

Los modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas frente a asma se describen por parte de Niels et al., 2008; Ip et al., 2006; Pernis et al., 2002; Kudlacz et al., 2008.

5 Ejemplo 4 Modelos de Seguridad, DMPK y Toxicidad

Ejemplo 4.1. Solubilidad termodinámica

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

10 Se hacen rotar las muestras en un Rotator drive STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) a una velocidad de 3,0 a temperatura ambiente durante 24 h.

Trascurridas 24 h, se transfieren 800 μ l de la muestra a un tubo de Eppendorf y se centrifuga 5 min a 14000 rpm. Posteriormente, se transfieren 200 μ l del sobrenadante de la muestra a una MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50) y se filtra el sobrenadante (33,7-40,4 kPa) con ayuda de un colector de vacío al interior de una placa limpia de 96 pocillos con parte inferior con forma de V de polipropileno de Greiner (Nº. Cat. 651201). Se diluyen 5 μ l del filtrado en 95 μ l (F20) del mismo tampón usado para incubar en la placa que contenía la curva estándar (Greiner, Nº. Cat. 651201).

15 Se prepara de nuevas la curva estándar para el compuesto en DMSO partiendo de una disolución de reserva de DMSO 10 mM, diluida con factor 2 en DMSO (5000 μ M) y posteriormente se diluye en DMSO hasta 19,5 μ M. Posteriormente, se transfieren 3 μ l de las series de dilución desde 5000 μ M hasta una mezcla de acetonitrilo-tampón de 97 μ l (50/50). El intervalo de concentración final es de 2,5 a 150 μ M.

20 Se sella la placa con superficies de sellado (MA96RD-045, www.kinesis.co.uk) y se miden las muestras a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) en condiciones optimizadas usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

25 Se analizan las muestras en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A es amoníaco 12 mM y el disolvente B es acetonitrilo. Se analiza la muestra por pulverización iónica positiva en una columna XBridge C18 3,5 μ M (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo total de análisis de 2 min y varía de 5 % B a 95 % de B.

Se analizan las áreas con ayuda de un paquete de soporte lógico de Masslynx y se representan las áreas de las muestras frente a la curva estándar para obtener la solubilidad del compuesto.

Los valores de solubilidad se presentan en μ M o μ g/ml.

30 Ejemplo 4.2 Solubilidad acuosa

Partiendo de una reserva de 10 mM en DMSO, se prepara una dilución seriada del compuesto en DMSO. Se transfieren las series de dilución a una placa Maxisorb NUNC 96 con parte inferior con forma de F (Nº. Cat. 442404) y se añade un tampón de fosfato 0,2 M pH 7,4 o tampón de citrato 0,1 M pH 3,0 a temperatura ambiente.

35 La concentración final varía desde 200 μ M hasta 2,5 μ M en 5 etapas de dilución iguales. La concentración final de DMSO no superó 2 %. Se añade pireno 200 μ M a los puntos de las esquinas de cada placa de 96 pocillos y sirve como punto de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

40 Se sellan las placas de ensayo y se incuban durante 1 h a 37 °C al tiempo que se agita a 230 rpm. Posteriormente, se detectan las placas bajo un microscopio de luz blanca, dando lugar a dibujos individuales de precipitado por concentración. Se analiza el precipitado y se convierte en un número que se representa sobre un gráfico. La primera concentración a la cual aparece el compuesto completamente disuelto es la concentración presentada, no obstante la concentración real se encuentra en algún punto entre esta concentración y una etapa de dilución superior.

Se presentan los valores de solubilidad en μ g/ml

Ejemplo 4.3 Unión de Proteína de Plasma (Diálisis de Equilibrio)

45 Se diluye una disolución de reserva de 10 mM del compuesto en DMSO con un factor de 5 en DMSO. Se diluye posteriormente esta disolución en plasma nuevo descongelado de perro, ratón, rata o humano (BioReclamation INC) con una concentración final de 10 μ M y una concentración de DMSO final de 0,5 % (5,5 μ l en 1094,5 μ l de plasma en una placa de 96 pocillos de PP-Masterblock (Greiner, Nº. Cat. 780285).

Se prepara una placa Pierce Red Device con insertos (ThermoScientific, Nº. Cat. 89809) y se llena con 750 μ l de PBS en la cámara de tampón y 500 μ l de plasma marcado en la cámara de plasma. Se incuba la placa durante 4 h a

37 °C al tiempo que se agita a 230 rpm. Tras la incubación, se transfieren 120 µl de ambas cámaras a 360 µl de acetonitrilo en placas de pocillos profundos PP, de parte inferior redondeada, de 96 pocillos (Nunc, N°. Cat. 278743) y se sellan con un borde de papel metalizado de aluminio. Se mezclan las muestras y se colocan sobre hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifuga esta placa 30 min a 1200 rcf a 4 °C y se transfiere el sobrenadante a una placa de PP de parte inferior con forma de v de 96 pocillos (Greiner, 651201) para análisis en LCMS.

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

Se analizan las muestras sobre LCMS con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A fue amoníaco 15 mM y el disolvente B fue acetonitrilo. Se analiza la muestra por pulverización iónica positiva en una columna XBridge C18 3,5µM (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo total de análisis de 2 min y varía de 5 % B a 95 % de B.

Se considera que el área de pico del compuesto en la cámara de tampón y en la cámara de plasma es 100 % del compuesto. El porcentaje unido a plasma se calcula a partir de estos resultados y se presenta el LIMS en forma de porcentaje unido a plasma.

Se inspecciona la solubilidad del compuesto en la concentración final de ensayo en PBS por medio de microscopio para indicar si se observa precipitación o no.

Ejemplo 4.4 Propensión a la prolongación QT

Se evalúa el potencial de prolongación QT en el ensayo de fijación de parche hERG.

4.4.1 Fijación convencional de parche de células completas

Se llevan a cabo registros de fijación de parche de células completas usando un amplificador EPC10 controlado por un soporte lógico Pulse v8,77 (HEKA). Normalmente, la resistencia de la serie es menor de 10 MΩ y se compensa en más de un 60 %, a los registros no se les han restado las fugas. Se fabrican los electrodos a partir de pipetas de vidrio GC150TF (Harvard).

La disolución de baño externo contiene: NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, Glucosa 5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4.

La disolución de pipeta de parche interno contiene: Kgluconato 100 mM, KCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂ATP 5 mM, Glutación 2 mM, EGTA 11 mM, HEPEs 10 mM, pH 7,2.

Se someten los fármacos a perfusión usando un sistema de perfusión rápida Biologic MEV-9/EVH-9.

Se llevan a cabo todos los registros sobre células HEK293 que expresan canales hERG. Se someten las células a cultivo en cubreobjetos redondos de 12 mm (German glass, Bellco) fijados en la cámara de registro usando dos rodillos de platino (Goofellow). Se suscitan corrientes de hERG usando un pulso de activación hasta + 40 mV durante 1000 ms seguido de un pulso de corriente de cola hasta -50 mV durante 2000 ms, siendo el potencial de retención de -80 mV. Se aplican los pulsos cada 20 s y se llevan a cabo todos los experimentos a temperatura ambiente.

4.4.2 Análisis de datos

Se calculan los valores de IC₅₀ y IC₂₀ para cada compuesto sometido a ensayo. Se calculan la diferencia en número entre IC₂₀ y las concentraciones C_{max} no ligadas del compuesto de ensayo obtenidas a dosis terapéuticas relevantes, como viene determinado por medio de los resultados obtenidos para el modelo CIA de rata.

Para las curvas de respuesta y concentración, se mide la amplitud de corriente de cola máxima durante la etapa de voltaje de -50 mV. Se lleva a cabo el ajuste de la curva de concentración-respuesta usando la ecuación:

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

en la que a es la respuesta mínima, b es la respuesta máxima y d es la pendiente de Hill. Esta ecuación se puede usar para calcular tanto IC₅₀ (en la que y = 50 y c es el valor de IC₅₀) como IC₂₀ (en la que y = 20 y c es el valor de IC₂₀). Se usó un soporte lógico GraphPad® Prism® (Graphpad® Software Inc.) para todo el ajuste de la curva. Una diferencia de 100 o mayor indica un bajo potencial para la prolongación de QT.

Ejemplo 4.5 Estabilidad microsomal

Se diluyó una disolución de reserva de 10 mM de compuesto en DMSO 1000 veces en un tampón de fosfato de 182

mM pH 7,4 en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, N°. Cat. 780285) y se pre-incubó a 37 °C.

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

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

Se preparó una disolución de trabajo final que contenía microsomas de hígado (Xenotech) de una especie de interés (humano, ratón, rata, perro) G6PDH previamente descrita y co-factores y se incubó esta mezcla durante no más de 20 min a temperatura ambiente.

- 10 Se añadieron 30 µl de la dilución de compuesto pre-calentada a 40 µl de agua pre-calentada en tubos Matrix y se añadieron 30 µl de mezcla microsomal. Las concentraciones finales de reacción fueron compuesto 3 µM, 1 mg de microsomas, 0,4 U/ml de GDPH, 3,3 mM de MgCl₂, 3,3 mM de glucosa-6-fosfato y 1,3 mM de NADP⁺.

- 15 Para medir el porcentaje restante de compuesto en el tiempo cero, se añadió MeOH o ACN (1:1) al pocillo antes de la adición de la mezcla microsomal. Se sellaron las placas con sellados TM Matrix Septra (Matrix. N°. Cat. 4464) y se agitaron durante unos pocos segundos para garantizar la mezcla completa de todos los componentes.

Se incubaron las muestras que no se detuvieron a 37 °C, 300 rpm y, después de 1 h de incubación, se detuvo la reacción con MeOH o ACN (1:1).

- 20 Tras detener la reacción, se mezclaron las muestras y se colocaron sobre hielo durante 30 min para precipitar las proteínas. Posteriormente, se centrifugaron las placas 30 min a 1200 rcf a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un placa PP 96 con parte inferior con forma de V (Greiner, 651201) para análisis en LCMS.

Se sellaron estas placas con superficies sellantes (MA96RD-04S) de www.kinesis.co.uk y se miden las muestras a temperatura ambiente en un LCMS (ZQ 1525 de Waters) en condiciones optimizadas usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

- 25 Se analizaron las muestras sobre LCMS con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A fue amoníaco 15 mM y el disolvente B fue metanol o acetonitrilo, dependiendo de la disolución de detención usada. Se analizan las muestras por pulverización iónica positiva en una columna XBridge C18 3,5µM (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo total de análisis de 2 min y varía de 5 % B a 95 % de B.

- 30 Se considera que el área de pico del compuesto parental en el tiempo 0 es 100 %. El porcentaje que queda tras 1 h de incubación se calcula a partir del tiempo 0 y se calcula como porcentaje que queda. Se inspecciona la solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en el tampón, al microscopio y se presentan los resultados.

Los datos de estabilidad microsomal se expresan en forma de porcentaje de la cantidad total de compuesto que queda tras 60 min.

TABLA IX - Estabilidad Microsomal

Compuesto #	Humano	Rata
1	76-100 %	76-100 %

35 **Ejemplo 4.6 Permeabilidad Caco2**

Se llevaron a cabo ensayos Caco-2 bidireccionales como se describe a continuación. Se obtuvieron células Caco-2 a partir de European Collection of Cell Cultures (ECAC, cat. 86010202) y se usaron tras 21 de cultivo celular en placas de Transwell de 24 pocillos (Fisher TKT-545-020B).

- 40 Se sembraron 2x10⁵ células/pocillo en un medio de preparación que consistía en DMEM + GlutaMAXI + 1 % de NEAA + 10 % de FBS (FetalClone II) + 1 % de Pen/Strep. Se modificó el medio cada 2-3 días.

Se prepararon compuestos de ensayo y referencia (propranolol y rodamina 123 o vinblastina, todos ellos adquiridos por Sigma) en Disolución de Sal Equilibrada de Hank que contenía 25 mM de HEPES (pH 7,4) y se añadió a las cámara apical (125 µl) y basolateral (600 µl) del conjunto de la placa de Transwell a una concentración de 10 µM con una concentración final de DMSO de 0,25 %.

- 45 Se añadió Lucifer Yellow 50 µM (Sigma) al tampón de donante en todos los pocillos para evaluar la integridad de las capas celulares por medio del control de la permeabilidad de Lucifer Yellow. Debido a que Lucifer Yellow (LY) no puede permear libremente a través de las barreras lipófilas, un elevado grado de transporte de LY indica una pobre

integridad de la capa de células.

Tras 1 h de incubación a 37 °C al tiempo que se agitaba en un agitador orbital a 150 rpm, se tomaron alícuotas de 70 µl a partir de las cámaras apical (A) y basal (B) y se añadieron a 100 µl de disolución de acetonitrilo:agua 50:50 que contenía un patrón interno analítico (carbamazepina 0,5 µM) en una placa de 96 pocillos.

- 5 Se midió Lucifer Yellow con un Spectramax Gemini XS (Ex 426 nm y Em 538 nm) en una placa limpia de 96 pocillos que contenía 150 µl de líquido procedente de lado basolateral y apical.

Se midieron las concentraciones del compuesto en las muestras por medio de cromatografía de líquidos de alto rendimiento/espectroscopia de masas (LC-MS/MS).

Se calcularon los valores de permeabilidad aparente (P_{app}) a partir de la relación:

- 10
$$P_{app} = \frac{[\text{compuesto}]_{\text{aceptor final}} \times V_{\text{aceptor}}}{([\text{compuesto}]_{\text{donante inicial}} \times V_{\text{donante}})} \times \frac{1}{T_{\text{inc}} \times V_{\text{donante}} / \text{área superficial} \times 60 \times 10^{-6}} \text{ cm/s.}$$

V = volumen de la cámara

T_{inc} = tiempo de incubación

Área superficial = 0,33 cm²

- 15 Se calcularon las proporciones de descarga, como indicación de la descarga activa desde la superficie de la célula apical, usando la proporción de $P_{app} B > A / P_{app} A > B$.

Se usaron los siguientes criterios de aceptación de ensayo:

Propanolol: valor $P_{app} (A > B) \geq 20 (x 10^{-6} \text{ cm/s})$

- 20 Rodamina 123 o Vinblastina: valor de $P_{app} (A > B) < 5 (x 10^{-6} \text{ cm/s})$ con proporción de descarga ≥ 5 .

Permeabilidad de Lucifer Yellow: $\leq 100 \text{ nm/s}$.

TABLA X - Tasa de descarga de Caco2

Compuesto #	$P_{app} A > B (x 10^{-6} \text{ cm/s})$	Proporción de descarga
1	7,8 ± 0,8	6,1 ± 0,6

Ejemplo 4.7 Estudio farmacocinético

- 25 **4.7.1 Estudio farmacocinético en roedores**

Se formulan los compuestos en mezclas de PEG2000/disolución salina fisiológica o PEG400/DMSO/disolución salina fisiológica para ruta intravenosa y en 0,5 % de metilcelulosa o 10-30 % de hidroxipropil-β-ciclodextrina pH 3 o pH 7,4 para ruta oral. Los compuestos de ensayo se dosifican por vía oral en forma de alimentación esofágica a 5-10 mg/kg y se dosifican por vía intravenosa en forma de inyección intravenosa rápida con un caudal de vena de 1 mg/kg. Cada grupo consiste en 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre bien por medio de la vena yugular usando ratas dotadas con una cánula o en la cavidad retro-orbital con heparina de litio como anti-coagulante en los momentos del siguiente intervalo: de 0,05 a 8 h (ruta intravenosa) y de 0,25 a 6 ó 24 h (ruta oral). Se centrifugaron las muestras de sangre a 5000 rpm durante 10 min y se almacenaron las muestras de plasma resultantes a -20 °C hasta el análisis.

- 35 **4.7.2. Estudio farmacocinético en perros**

Se formulan los compuestos en mezclas de PEG2000/disolución salina fisiológica para ruta intravenosa y en 0,5 % de metilcelulosa o mezclas de PEG400/hidroxipropil-β-ciclodextrina acidificada con ácido cítrico hasta pH 2-3 para la ruta oral. Los compuestos de ensayo se dosifican por vía oral en forma de alimentación esofágica a 5-30 mg/kg y se dosifican por vía intravenosa en forma de inyección intravenosa rápida o por medio de venoclisis de 10 min a través de la vena encefálica a 1 mg/kg. Cada grupo consiste en 3 perros Beagle hembra. Se recogieron muestras de sangre bien por medio de la vena yugular con heparina de litio como anti-coagulante en los momentos entre 0,083 y 24 h después de la dosis. Se centrifugaron las muestras de sangre a 5000 rpm durante 10 min y se almacenaron las muestras de plasma resultantes a -20 °C hasta el análisis.

4.7.3 Cuantificación de los niveles de compuesto en plasma

- 45 Se determinan las concentraciones de plasma de cada compuesto de ensayo por medio de un procedimiento de LCMS/MS en el que se opera el espectrómetro de masas en modo de electropulverización positiva.

4.7.4 Determinación de parámetros farmacocinéticos

Se calculan los parámetros farmacocinéticos usando Winnonlin® (Pharsight®, United).

Ejemplo 4.8. Estudio de toxicidad en ratas de 7 días

5 Se lleva a cabo un estudio de toxicidad oral en ratas de 7 días con los compuestos de ensayo en ratas macho de Sprague-Dawley para evaluar su potencial tóxico y los parámetros toxico-cinéticos, a dosis diarias de 100, 300 y 500 mg/kg/día, por medio de alimentación por sonda nasogástrica, a una dosis-volumen constante de 5 ml/kg/día.

10 Se formulan los compuestos de ensayo en HPβCD de 30 % (v/v) en agua pura. Cada grupo incluye 5 ratas macho principales así como también 3 animales satélite para los parámetros toxico-cinéticos. Se proporciona HPβCD de 30 % (v/v) en agua a un cuarto grupo, con la misma frecuencia, volumen de dosificación y por medio de la misma ruta de administración, y actúa como grupo de control de vehículo.

El objetivo del estudio es determinar la dosis más baja que tiene como resultado la ausencia de eventos adversos (nivel de efectos adversos no observable - NOAEL).

Ejemplo 4.9 Estabilidad de hepatocito

15 Se describen modelos para el depuración metabólica en hepatocito por parte de McGinnity et al. Drug Metabolism and Disposition 2008, 32, 11, 1247.

20 Se apreciará por parte de los expertos en la técnica que las descripciones anteriores son de naturaleza ejemplar y explicativa, y se pretende que ilustren la invención y sus realizaciones preferidas. A través de la experimentación rutinaria, un experto reconocerá modificaciones y variaciones evidentes. De este modo, la invención no está concebida para que quede definida por la descripción anterior, sino por el contrario por las reivindicaciones siguientes y sus equivalentes.

REFERENCIAS

- 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.
- Choy EH, Panayi GS. (2001). N Engl J Med 344: 907-16.
- 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.
- Constantinescu et al., 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3): 122-131.
- Firestein GS. (2003). Nature. 423:356-61.
- Geron et al. (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors Cancer Cell 13 (4), 321-30.
- 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.
- Jou IM, Shiao 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.
- Kachigian LM. (2006) Collagen antibody-induced arthritis, Nature Protocols 2512-2516.
- Khachigian, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. (2006) Nature Protocols 1, 2512-6.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Willman CL; (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *PNAS* May 22. [Epub ahead of print].
- Nials et al. (2008) Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge, Disease Models & Mechanisms, 213-220.
- 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.
- O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., *Nature Reviews*, 2004, 555-564.
- 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-conatining 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.
- 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.
- Pemis et al. (2002) JAK-STAT signaling in asthma *J. Clin. Invest.* 1279.
- Rall LC, Roubenoff R. (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology*; 10:1219-23.
- 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.
- 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.
- Sims NA et al., (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum* 50 2338-2346.
- 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.
- Smolen JS, Steiner G. (2003). *Nat Rev Drug Discov*. 2: 473-88.
- Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R, Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383.
- Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadamitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (suppl 3):S233-S242.
- 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.
- 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.

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, 1073-1083.

McGinnity, D.F. (2004) Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. Drug Metabolism and Disposition, 32, 11, 1247.

5 Todas las publicaciones incluyendo, pero sin limitarse a, las patentes y solicitudes de patente, citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por referencia en la presente memoria, como si cada publicación individual estuviera indicada específica e individualmente para incorporarse por referencia en la presente memoria tal y como se explica de forma completa.

A partir de la memoria descriptiva anterior, a los expertos en la técnica se les pueden ocurrir diversas modificaciones y cambios en las composiciones y procedimientos de la invención. Se pretende que todas las modificaciones que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas queden incluidas en la presente memoria.

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

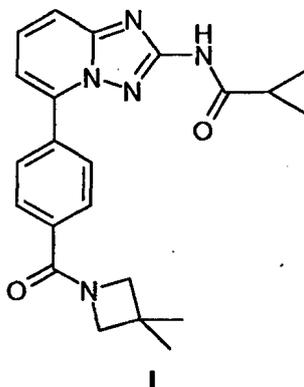
15 Los nombres químicos del compuesto de la invención que se proporcionan y se explican en la presente solicitud, pueden haberse generado de manera automática por medio del uso de un programa de soporte lógico de nomenclatura química disponible a nivel comercial, y no haberse verificado de manera independiente. Los programas representativos que desempeñan esta función incluyen la herramienta de nomenclatura Lexichem comercializada por Open Eye Software, Inc. y la herramienta de soporte lógico Autonom comercializada por MDL, Inc.. En el ejemplo en el que el nombre químico difiere de la estructura mostrada, se otorga prioridad a la estructura representada.

20 Se prepararon estructuras químicas mostradas en la presente memoria usando bien ChemDraw® o ISIS®/DRAW. Cualquier valencia abierta que aparezca en un átomo de carbono, oxígeno o nitrógeno en las estructuras de la presente memoria indica la presencia de un átomo de hidrógeno. Cuando exista un centro quiral en la estructura, pero no se muestre una estereoquímica específica para dicho centro quiral, ambos enantiómeros asociados a la estructura quiral quedan englobados por la estructura.

25

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 2.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que está en forma de una base libre.
- 3.- Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.
- 4.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para administración oral.
- 10 5.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para administración inyectable.
- 6.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para administración tópica.
- 7.- Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 que comprende un agente terapéutico adicional.
- 15 8.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso como un medicamento.
- 9.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago, enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, soriasis, sarcoma de Kaposi o glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- 20 10.- Un uso de un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago, enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, soriasis, sarcoma de Kaposi o glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- 25 11.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el tratamiento, prevención o profilaxis de un trastorno inflamatorio.
- 12.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el trastorno es artritis reumatoide.
- 30 13.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el tratamiento, prevención o profilaxis de lupus sistémico eritematoso.
- 14.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el tratamiento, prevención o profilaxis de soriasis.
- 35 15.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.

5 16.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento, prevención o profilaxis de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago, enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, soriasis, sarcoma de Kaposi o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

10 17.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento, prevención de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro en la renovación de cartílago, malformaciones congénitas de cartílago, enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, soriasis, sarcoma de Kaposi o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

18.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de lupus sistémico eritematoso.

15 19.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de soriasis.

20.- Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de artritis reumatoide.

20