

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 908**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/541** (2006.01)

**C07D 471/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2010 PCT/EP2010/059064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10149769**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10724881 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2445911**

54 Título: **5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il-carboxamidas como inhibidores jak**

30 Prioridad:

**26.06.2009 US 220688 P**

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

**26.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MENET, CHRISTEL JEANNE MARIE y  
SMITS, KOEN KURT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 626 908 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

5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il-carboxamidas como inhibidores jak

5 La presente invención se refiere a un compuesto que es un inhibidor de JAK, una familia de tirosina quinasas que participan en afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En particular, el compuesto de la invención inhibe JAK1 y JAK2. La presente invención además provee métodos para la producción del compuesto de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención, métodos para la prevención y el tratamiento de enfermedades que involucran afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, por medio de la administración del compuesto de la invención.

15 Las quinasas Janus (JAK, por sus siglas en inglés) son tirosina quinasas citoplásmicas que transducen la señalización de citoquinas desde receptores de membrana hasta factores de transcripción de tipo STAT (siglas en inglés de: transductores de señal y activadores de la transcripción). Se han descrito cuatro miembros de la familia JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Con la unión de la citoquina a su receptor, los miembros de la familia JAK se autofosforilan o se transfosforilan entre sí; a continuación, se produce la fosforilación de STAT, que entonces migran al núcleo a fin de modular la transcripción. La transducción de señales intracelulares de JAK-STAT es apropiada para los interferones, la mayoría de las interleuquinas, al igual que una diversidad de citoquinas y factores endocrinos tales como EPO (eritropoyetina), TPO (trombopoyetina), GH (siglas en inglés de: hormona de crecimiento), OSM (oncostatina M), LIF (siglas en inglés de: factor inhibidor leucémico), CNTF (siglas en inglés de: factor neurotrófico ciliar), GM-CSF (siglas en inglés de: factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos) y PRL (prolactina) (Vainchenker W. *et al.* (2008)).

25 La combinación de modelos genéticos y la investigación del inhibidor de JAK de molécula pequeña revelaron el potencial terapéutico de varias JAK. JAK3 es validada por la genética humana y de ratón, como un blanco de supresión inmunitaria (O'Shea J. *et al.* (2004)). Los inhibidores de JAK3 fueron trasladados con éxito al desarrollo clínico, inicialmente para el rechazo de trasplante de órganos, aunque también, más adelante, para otras indicaciones inmunoinflamatorias tales como artritis reumatoide (AR), psoriasis y enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

30 TYK2 es un blanco potencial para las enfermedades inmunoinflamatorias, y es validado por la genética humana y por estudios de noqueo de ratones (Levy D. y Loomis C. (2007)).

35 JAK1 es un nuevo blanco en el área de las enfermedades inmunoinflamatorias. JAK1 se heterodimeriza con las otras JAK para transducir la señalización proinflamatoria impulsada por citoquinas. Por lo tanto, se espera que la inhibición de JAK1 y otras JAK sea de beneficio terapéutico para un abanico de afecciones inflamatorias, al igual que para otras enfermedades impulsadas por la transducción de señales mediada por JAK.

## Antecedentes de la invención

40 La degeneración de cartílago es el sello distintivo de diversas enfermedades, entre las cuales, la artritis reumatoide y la artrosis son las más predominantes. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad degenerativa crónica de las articulaciones, caracterizada por la inflamación y la destrucción de las estructuras articulares. Cuando la enfermedad no se controla, conduce a la discapacidad sustancial y al dolor debido a la pérdida de funcionalidad articular, e incluso, a la muerte prematura. Por lo tanto, la meta de un tratamiento para la AR es no solo disminuir la enfermedad, sino, además, lograr la remisión a fin de detener la destrucción de las articulaciones. Además de la gravedad de las consecuencias de la enfermedad, la alta incidencia de AR (~ 0.8% de los adultos afectados en todo el mundo) significa un alto efecto socioeconómico (para reseñas sobre AR, referirse a los trabajos de Smolen y Steiner (2003); Lee y Weinblatt (2001); Choy y Panayi (2001); O'Dell (2004) y Firestein (2003)).

La artrosis (también denominada AT, o artritis de desgaste y rotura) es la forma más común de artritis, y se caracteriza por la pérdida de cartílago articular, lo que a menudo se asocia con la hipertrofia del hueso, y con dolor. Para una reseña vasta sobre la artrosis, referirse al trabajo de Wieland *et al.* (2005).

50 La artrosis es difícil de tratar. Actualmente no existe cura, y el tratamiento se centra en el alivio del dolor y en la prevención de la deformación de la articulación afectada. Los tratamientos comunes incluyen el uso de fármacos antiinflamatorios no corticoesteroides (AINE). Si bien los suplementos dietarios tales como condroitina y sulfato de glucosamina han sido defendidos como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la artrosis, un ensayo clínico reciente reveló que ambos tratamientos no reducían el dolor asociado con la artrosis (Clegg *et al.*, 2006).

55 La estimulación de los procesos anabólicos, el bloqueo de los procesos catabólicos, o una combinación de estos dos, puede lograr la estabilización del cartílago, y tal vez, incluso la reversión del daño, para, de ese modo, prevenir el avance posterior de la enfermedad. Se han desarrollado métodos terapéuticos para la corrección de las lesiones del cartílago articular que aparecen durante la enfermedad artrósica, si bien, hasta la fecha, ninguno de ellos ha

podido mediar la regeneración de cartilago articular *in situ* e *in vivo*. En conjunto, no se encuentra disponible ningún fármaco contra la artrosis que modifique la enfermedad.

Vandeghinste *et al.* (WO 2005/124342) descubrieron JAK1 como un blanco, cuya inhibición podría tener importancia terapéutica para varias enfermedades, entre ellas, la AT. El noqueo del gen JAK1 en ratones demostró que JAK1 cumple funciones esenciales y necesarias durante el desarrollo: los ratones JAK1<sup>-/-</sup> murieron dentro de las 24 h después del nacimiento, y el desarrollo de linfocitos fue gravemente dañado. Además, las células JAK1<sup>-/-</sup> fueron no reactivas o menos reactivas para las citoquinas que utilizan receptores de citoquinas clase II, receptores de citoquinas que utilizan la subunidad gamma-c para la señalización y la familia de receptores de citoquinas que utilizan la subunidad gp130 para la señalización (Rodig *et al.*, 1998).

Diversos grupos han implicado la señalización de JAK-STAT en la biología de los condrocitos. Li *et al.* (2001) mostraron que la oncostatina M induce la expresión de genes MMP y TIMP3 en condrocitos primarios, mediante la activación de las vías de señalización JAK/STAT y MAPK (sigla en inglés de "proteína quinasa activada por mitógeno"). Osaki *et al.* (2003) mostraron que la inhibición de colágeno II mediada por interferón gamma en condrocitos involucra la señalización de JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo de cartilago mediante la reducción de la expresión de componentes de matriz, y mediante la inducción de la expresión de colagenasas y sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2), que media la producción de óxido nítrico (NO). Otero *et al.*, (2005) mostraron que leptina e IL1-beta indujeron sinérgicamente la producción de NO o la expresión de ARNm de NOS2 en condrocitos, y que esto fue bloqueado por un inhibidor de JAK. Legendre *et al.* (2003) mostraron que IL6/receptor IL6 indujeron la regulación descendente de genes de matriz específicos de cartilago de colágeno II, núcleo de agrecano y proteína de unión en condrocitos articulares bovinos, y que esto era mediado por la señalización de JAK/STAT. Por lo tanto, estas observaciones sugieren una función para la actividad de quinasa JAK en la homeostasis del cartilago, y oportunidades terapéuticas para los inhibidores de la quinasa JAK.

Los miembros de la familia JAK han sido implicados en otras afecciones, que incluyen trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan *et al.*, 2007, *Mol. Immunol.*, 44 (10): 2497-506), donde se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular, JAK2, también pueden ser de utilidad en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Además, la familia JAK, en particular, JAK1, JAK2 y JAK3, se ha ligado al cáncer, en especial, a leucemias tales como 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*, prepublicada en Internet el 26 de diciembre de 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) y leucemia linfoblástica aguda (Mullighan *et al.*, 2009), o a tumores sólidos, por ejemplo, liomiosarcoma uterino (Constantinescu *et al.*, 2007, *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (3): 122-131), cáncer de próstata (Tam *et al.*, 2007, *British Journal of Cancer*, 97, 378 - 383). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular, de JAK1 y JAK2, pueden también tener utilidad en el tratamiento de tipos de cáncer (leucemias y tumores sólidos, por ejemplo, liomiosarcoma uterino, cáncer de próstata).

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

El documento WO 2009/047514 revela compuestos de tipo [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina y [1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidina que, inter alia, inhiben la función tirosina quinasa del receptor AXL.

El documento WO 2009/017954 revela inhibidores de tipo [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina de la quinasa JAK2.

El documento WO 2010/010190 revela compuestos de tipo [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina que inhiben las quinasas JAK.

El documento WO 03/010167 revela derivados de 8-metoxi-(1,2,4)triazolo(1,5-a)piridina y su uso como ligandos del receptor de adenosina.

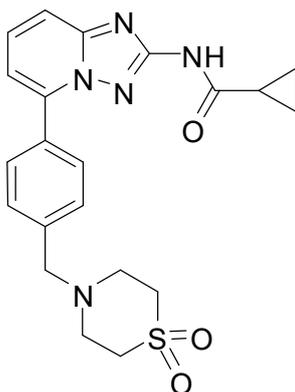
Las terapias actuales no son satisfactorias, y por lo tanto, continúa la necesidad de identificar otros compuestos que puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades articulares degenerativas, por ejemplo, artrosis, artritis reumatoide y osteoporosis, en particular, la artrosis. La presente invención, por lo tanto, provee un compuesto, métodos para su elaboración y composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención junto con un portador farmacéutico adecuado. La presente invención además provee el uso del compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades articulares degenerativas. Específicamente, la presente invención provee un nuevo inhibidor de JAK que exhibe potencia *in vivo* drásticamente mayor.

Resumen de la invención

La presente invención se sustenta en el descubrimiento de que el compuesto de la invención es capaz de actuar como inhibidor de JAK, y de que es útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades

autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En un aspecto específico, el compuesto es un inhibidor de JAK1 y JAK2. La presente invención además provee métodos para la producción de este compuesto, una composición farmacéutica que comprende este compuesto y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 mediante la administración del compuesto de la invención.

Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención, se provee un compuesto de la invención que tiene la fórmula (I):



El compuesto de la invención es un nuevo inhibidor de JAK que parece exhibir una potencia *in vivo* drásticamente mayor, en comparación con compuestos estructuralmente similares. En una modalidad particular, el compuesto de la invención es un inhibidor de JAK1 y JAK2. En particular, parece exhibir este incremento en la potencia con menores niveles de exposición *in vivo* en comparación con compuestos estructuralmente similares. Se espera que el uso de un compuesto con estos perfeccionamientos logre menores requerimientos de dosificación (y por lo tanto, mejor programa de dosificación).

En un aspecto adicional, la presente invención provee composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención y un portador farmacéutico, excipiente o diluyente. Además, el compuesto de la invención, útil en las composiciones farmacéuticas y en los métodos de tratamiento que se revelan en esta solicitud, es farmacéuticamente aceptable en términos de su preparación y uso. En este aspecto de la invención, la composición farmacéutica además puede comprender otros ingredientes activos adecuados para el uso en combinación con el compuesto de la invención.

En otro aspecto de la invención, esta invención provee un método de tratamiento de un mamífero sensible a una afección, o afectado con una afección de aquellas citadas en esta solicitud, y en particular, donde dicha afección se asocia con la actividad anormal de JAK, por ejemplo, afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o del compuesto de la invención como se describe en esta solicitud. En una modalidad específica, la afección se asocia con la actividad anormal de JAK1 y JAK2.

En un aspecto adicional, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de aquellas citadas en esta solicitud, en particular, donde dichas afecciones se asocian con la actividad anormal de JAK, por ejemplo, afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6.

Aun en otro aspecto de método de tratamiento, esta invención provee un método de tratamiento de un mamífero sensible a una afección, o afectado con una afección que se relaciona causalmente con la actividad anormal de JAK como se describe en esta solicitud, y comprende la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección o para la prevención de la afección, de la composición farmacéutica o del compuesto de la invención como se describe en esta solicitud. En un aspecto específico, la afección está causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK1 y JAK2.

En un aspecto más, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento o la prevención de una afección causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK.

En aspectos adicionales, esta invención provee métodos para la síntesis del compuesto de la invención, donde los protocolos y las vías de síntesis representativos se describen más adelante en la presente solicitud.

5 En consecuencia, un objeto principal de esta invención consiste en la provisión de un nuevo compuesto que puede modificar la actividad de JAK y, en consecuencia, prevenir o tratar cualquier enfermedad que pueda estar causalmente relacionada con dicha actividad. En un aspecto específico, el compuesto de la invención modula la actividad de JAK1 y JAK2.

10 Además, es un objeto de esta invención la provisión de un compuesto que puede tratar o aliviar enfermedades o síntomas de enfermedades, tales como afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, que pueden estar causalmente relacionadas con la actividad de JAK, en particular, JAK1 y JAK2.

15 Aun otro objeto de esta invención consiste en la provisión de una composición farmacéutica que puede usarse en el tratamiento o la prevención de una diversidad de enfermedades, que incluyen las enfermedades asociadas con la actividad de JAK, tales como afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En una modalidad específica, la enfermedad se asocia con la actividad de JAK1 y JAK2.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en el arte a partir de la consideración de la descripción detallada que sigue.

20 Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

Los siguientes términos tienen el propósito de tener los significados que se presentan a continuación, y son útiles en la comprensión de la descripción y el alcance propuesto de la presente invención.

25 En la descripción de la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos, y métodos de uso de dichos compuestos y composiciones, cuando se presentan los siguientes términos, estos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse además que cuando se describen en esta solicitud, cualquiera de las porciones definidas a continuación puede ser sustituida con una diversidad de sustituyentes, y que las respectivas definiciones tienen el propósito de incluir dichas porciones sustituidas, dentro de su alcance, como se expone a continuación. A menos que se establezca lo contrario, el término “sustituido” debe definirse conforme a lo expuesto a continuación. Asimismo, debe entenderse que los términos “grupos” y “radicales” pueden considerarse intercambiables, cuando se emplean en la presente solicitud.

30 El artículo “un” o “una” puede emplearse en esta solicitud a fin de hacer referencia a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un análogo” significa un análogo o más de un análogo.

35 De acuerdo con la presente solicitud, el término “JAK” se refiere a la familia de quinasas Janus (JAK), que son tirosina quinasas citoplásmicas que transducen la señalización de citoquina desde receptores de membrana hasta factores de transcripción STAT. Se han descrito cuatro miembros de la familia JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, y el término JAK puede referirse a todos los miembros de la familia JAK en forma colectiva, o a uno o más de los miembros de la familia JAK, según lo indique el contexto.

40 El término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado o capaz de ser aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal de los Estados Unidos de América, o de un gobierno de estado, o la correspondiente agencia en países diferentes de los Estados Unidos; o citado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, y más en particular, en humanos.

45 El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal del compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable, y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. En particular, dichas sales no son tóxicas, y pueden ser sales orgánicas o inorgánicas de adición de ácidos y de adición de bases. 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 benzoico, ácido 3-(4-hidroxi-benzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido canfenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón

- ácido presente en el compuesto original o bien es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion metálico alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Las sales además incluyen, solo a modo de ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares; y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. El término "cati6n farmacéuticamente aceptable" se refiere a un contra6n cati6nico aceptable de un grupo funcional ácido. Dichos cationes se ejemplifican por medio de cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares.
- El término "veh6culo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el cual se administra el compuesto de la invenci6n.
- El término "solvato" se refiere a formas del compuesto que se asocian con un solvente, habitualmente, por medio de una reacci6n de solv6lisis. Esta asociaci6n f6sica incluye el enlace de hidr6geno. Los solventes convencionales comprenden agua, etanol, ácido acético y similar. El compuesto de la invenci6n puede prepararse, por ejemplo, en forma cristalina, y puede solvatare o hidratarse. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, y además, comprenden solvatos tanto estequiométricos como no estequiométricos. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo, cuando se incorporan una o más moléculas de solvente en la red cristalina del sólido cristalino. El término "solvato" abarca solvatos tanto en fase de soluci6n como capaces de aislamiento. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.
- El término "sujeto" incluye humanos. Los términos "humano", "paciente" y "sujeto" se usan de modo indistinto en la presente solicitud.
- Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar de acuerdo con el compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, etc., del sujeto tratado.
- "Prevenir" o "prevenci6n" se refiere a una reducci6n del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o un trastorno (es decir, evitar que por lo menos uno de los s6ntomas cl6nicos de la enfermedad se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o que puede ser predispuesto a la enfermedad antes del inicio de la enfermedad).
- El término "profilaxis" se relaciona con la "prevenci6n", y se refiere a una medida o un procedimiento cuyo prop6sito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Ejemplos, sin limitaci6n, de medidas profilácticas pueden incluir la administraci6n de vacunas; la administraci6n de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalarios en riesgo de trombosis debido a, por ejemplo, la inmovilizaci6n; y la administraci6n de un agente contra la malaria tal como cloroquina, antes de la visita a una regi6n geográfica en donde la malaria sea endémica, o donde el riesgo de contraer la malaria sea alto.
- "Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una modalidad, al alivio de la enfermedad o el trastorno (es decir, la detenci6n de la enfermedad o la reducci6n de la manifestaci6n, el alcance o la gravedad de por lo menos uno de sus s6ntomas cl6nicos). En otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere al alivio de por lo menos un parámetro f6sico, que puede no ser discernible por el sujeto. Aun en otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulaci6n de la enfermedad o el trastorno, ya sea f6sicamente (por ejemplo, la estabilizaci6n de un s6ntoma discernible), ya sea fisiológicamente (por ejemplo, la estabilizaci6n de un parámetro f6sico), o ambos. En una modalidad adicional, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la disminuci6n del avance de la enfermedad.
- De acuerdo con la presente solicitud, el término "afecciones inflamatorias" se refiere al grupo de afecciones que incluyen artritis reumatoide, artrosis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), enfermedades intestinales inflamatorias (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), enfermedades inducidas por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones luego de la cirug6a de derivaci6n o enfermedades crónicas por endotoxinas que contribuyen, por ejemplo, a la insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas con el cart6lago, tales como aquellas de las articulaciones. En particular, el término se refiere a artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.
- De acuerdo con la presente solicitud, el término "enfermedades autoinmunitarias" se refiere al grupo de enfermedades que incluyen enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, que abarcan aquellas afecciones tales como EPOC, asma (por ejemplo, asma intrínseca, asma extrínseca, asma de polvo, asma infantil), en particular, asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tard6a e hipersensibilidad de las vías respiratorias), bronquitis, que incluye asma bronquial, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, diabetes sacarina tipo I y complicaciones asociadas con ella; eccema atópico (dermatitis atópica), dermatitis de contacto y otras dermatitis eczematosas, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. En particular, el término se refiere a EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes sacarina tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.

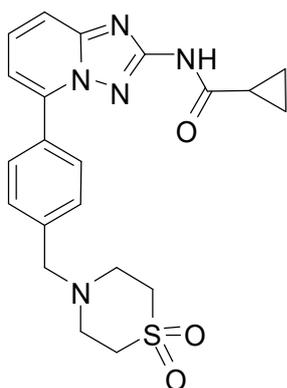
- De acuerdo con la presente solicitud, el término “enfermedades proliferativas” se refiere a afecciones tales como el cáncer (por ejemplo, liomiosarcoma uterino o cáncer de próstata), trastornos mieloproliferativos (por ejemplo, policitemia verdadera, trombocitosis esencial y mielofibrosis), leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda), mieloma múltiple, psoriasis, restenosis, esclerodermatitis o fibrosis. En particular, el término se refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.
- De conformidad con esta solicitud, el término “cáncer” se refiere al crecimiento maligno o benigno de células en la piel o en órganos del cuerpo, por ejemplo, sin limitación, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Un tipo de cáncer tiende a infiltrarse en tejido adyacente y diseminarse (metástasis) en órganos distantes, por ejemplo, en los huesos, el hígado, pulmón o cerebro. De acuerdo con esta invención, el término cáncer incluye tanto tipos de células tumorales metastásicas, tales como, sin limitación, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y mastocitoma, como tipos de carcinoma de tejido, por ejemplo, sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de hígado primario, cáncer de ovario, cáncer de próstata y liomiosarcoma uterino.
- De acuerdo con esta solicitud, el término “leucemia” se refiere a enfermedades neoplásicas de la sangre y de órganos formadores de sangre. Dichas enfermedades pueden causar la disfunción de la médula ósea y del sistema inmunitario, lo que torna al huésped altamente sensible a la infección y la hemorragia. En particular, el término leucemia se refiere a leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA).
- De acuerdo con la presente solicitud, el término “rechazo de trasplantes” se refiere al rechazo agudo o crónico de células, tejido o aloinjertos o xenoinjertos de órganos sólidos de, por ejemplo, islotes pancreáticos, células madre, médula ósea, piel, músculo, tejido corneal, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón y pulmón combinados, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago, o enfermedades de rechazo de injerto contra huésped.
- Conforme a esta solicitud, el término “enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago” incluye afecciones tales como artrosis, artritis sorriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurogénica o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis, como artrosis deformante endémica, enfermedad de Mseleni y enfermedad de Handigodu; degeneración resultante de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante.
- Conforme a esta invención, el término “malformaciones congénitas del cartílago” incluye afecciones tales como condrólisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria y trastornos relacionados.
- Conforme a esta invención, el término “enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6” incluye afecciones tales como la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- El “compuesto de la presente invención” y expresiones equivalentes tienen el propósito de abarcar el compuesto de la Fórmula descrita en esta solicitud con anterioridad, donde dicha expresión incluye las sales farmacéuticamente aceptables y los solvatos, por ejemplo, hidratos, y los solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables cuando el contexto lo permite. Asimismo, la referencia a intermediarios, por sí mismos reivindicados o no, tiene la intención de contemplar sus sales y solvatos, cuando el contexto lo permite.
- Otros derivados del compuesto de esta invención tienen actividad tanto en su forma de ácido como de derivado ácido, si bien en la forma sensible de ácido, a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad de tejido, o liberación demorada en el organismo mamífero (ver la referencia de Bundgard, H., *Design of Prodrugs*, pp. 7–9, 21–24, Elsevier, Ámsterdam 1985).
- De acuerdo con esta invención, el término “variante isotópica” se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una “variante isotópica” de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos tales como, por ejemplo, deuterio ( $^2\text{H}$  o D), carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), nitrógeno-15 ( $^{15}\text{N}$ ), o similares. Se entenderá que, en un compuesto donde se realiza dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando se presentan, pueden variar, de modo que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser  $^2\text{H}/\text{D}$ , cualquier carbono puede ser  $^{13}\text{C}$ , o cualquier nitrógeno puede ser  $^{15}\text{N}$ , y que la presencia y el desplazamiento de dichos átomos pueden ser determinados por el experto en la técnica. Asimismo, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, en el caso, por ejemplo, donde los compuestos resultantes pueden usarse para estudios de fármacos o distribución de tejido de sustrato. Los isótopos radiactivos tritio, es decir,  $^3\text{H}$ , y carbono-14, es decir,  $^{14}\text{C}$ , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y fácil medio de detección. Además, pueden prepararse compuestos sustituidos con isótopos de emisión de positrones, tales como  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{13}\text{N}$ , que serán útiles en estudios de topografía por emisión de positrones (TEP) para la examinación de la ocupación de receptores de sustrato.
- Todas las variantes isotópicas del compuesto provisto en esta solicitud, radiactivas o no, tienen la intención de ser contempladas dentro del alcance de la invención.

- Los "tautómeros" se refieren a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto particular, y que varían en el desplazamiento de electrones y átomos de hidrógeno. En consecuencia, dos estructuras pueden encontrarse en equilibrio a través del movimiento de electrones  $\pi$  y un átomo (habitualmente, H). Por ejemplo, los enoles y las cetonas son tautómeros debido a que son rápidamente interconvertidos mediante el tratamiento con ácido o base. Otro ejemplo de tautomerismo comprende las formas aci- y nitro- de fenilnitrometano, que son formadas, asimismo, mediante el tratamiento con ácido o base.

Las formas tautómeras pueden ser importantes para el logro de la reactividad química óptima y la actividad biológica de un compuesto de interés.

#### El compuesto

- La presente invención se basa en el descubrimiento de que el compuesto de la invención es un inhibidor de JAK, y de que es útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. La presente invención además provee métodos para la producción del compuesto de la invención; composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención; y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, mediante la administración del compuesto de la invención. En una modalidad específica, el compuesto de la invención es un inhibidor de JAK1 y JAK2.
- Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención, se revela el compuesto de la invención que tiene la fórmula (I):



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

El compuesto de la invención es un nuevo inhibidor de JAK. En particular, el compuesto es un potente inhibidor de JAK1 y JAK2; sin embargo, también inhibe TYK2 y JAK3, con menor potencia.

- El compuesto de la invención exhibe una potencia *in vivo* drásticamente mayor. Este perfeccionamiento se observa específica y sorprendentemente aun sobre compuestos estructuralmente similares. El uso de un compuesto con estos perfeccionamientos puede lograr un menor requerimiento de dosificación (y por lo tanto, un mejor programa de dosificación).

#### Composiciones farmacéuticas

- Cuando se emplea como un agente farmacéutico, el compuesto de esta invención habitualmente se administra en forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones pueden prepararse de manera conocida en la técnica farmacéutica, y comprenden por lo menos un compuesto activo. En general, el compuesto de esta invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad del compuesto administrada realmente, en general, será determinada por el médico, en vista de las circunstancias pertinentes que incluyen la afección por tratar, la vía seleccionada de administración, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y factores similares.

- Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas por una diversidad de vías, que incluyen la vía oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, intravenosa, intramuscular e intranasal. De acuerdo con la vía propuesta de suministro, el compuesto de esta invención, preferentemente, se formula como composiciones inyectables u orales o como bálsamos, lociones o parches, todos ellos, para administración transdérmica.

Las composiciones para la administración oral pueden adoptar la forma de suspensiones o soluciones líquidas voluminosas, o polvos voluminosos. Sin embargo, más comúnmente, las composiciones se presentan en formas farmacéuticas unitarias, a fin de facilitar la dosificación exacta. El término "formas farmacéuticas unitarias" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto con un excipiente, vehículo o portador farmacéutico adecuado. Las formas farmacéuticas unitarias típicas incluyen jeringuillas o ampollas premedidas, prellenadas, de las composiciones líquidas; o pastillas, comprimidos, cápsulas, o similares, en el caso de las composiciones sólidas. En dichas composiciones, el compuesto de la invención habitualmente es un componente menor (de alrededor de 0.1 a alrededor de 50% en peso; o preferentemente, de alrededor de 1 a alrededor de 40% en peso), donde el resto lo constituyen diversos vehículos o portadores y auxiliares de procesamiento útiles para la formación de la forma farmacéutica deseada.

Las formas líquidas adecuadas para la administración oral pueden comprender un vehículo adecuado acuoso o no acuoso, con reguladores del pH, agentes de suspensión y dispersión, colorantes, saborizantes y similares. Las formas sólidas pueden comprender, 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 alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como menta piperita, metil salicilato o saborizante de naranja.

Las composiciones inyectables típicamente son a base de solución salina estéril inyectable o solución salina regulada con fosfato, u otros portadores inyectables conocidos en la técnica. Como anteriormente, el compuesto activo en dichas composiciones habitualmente es un componente menor, a menudo, de alrededor de 0.05 a 10% en peso, donde el resto lo constituyen el portador inyectable e ingredientes similares.

Las composiciones transdérmicas habitualmente se formulan como una crema o un ungüento tópico que contiene los ingredientes activos, en general, en una cantidad que varía de alrededor de 0.01 a alrededor de 20% en peso; preferentemente, de alrededor de 0.1 a alrededor de 20% en peso; preferentemente, de alrededor de 0.1 a alrededor de 10% en peso; y aún más preferentemente, de alrededor de 0.5 a alrededor de 15% en peso. Cuando se formulan como un ungüento, los ingredientes activos habitualmente serán combinados con una base de ungüento parafínica o miscible con agua. Alternativamente, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con, por ejemplo, una base de crema de aceite en agua. Las formulaciones transdérmicas de este tipo son bien conocidas en la técnica, y en general, incluyen ingredientes adicionales para aumentar la penetración dérmica de estabilidad de los ingredientes activos o de la formulación. Todas dichas formulaciones transdérmicas conocidas e ingredientes se incluyen dentro del alcance de esta invención.

El compuesto de la invención además puede administrarse por medio de un dispositivo transdérmico. En consecuencia, la administración transdérmica puede lograrse usando un parche del tipo reservorio o de tipo membrana porosa, o de una variedad de matriz sólida.

Los componentes descritos con anterioridad para las composiciones de administración oral, inyectables o de administración tópica son puramente representativos. Otros materiales, al igual que las técnicas de procesamiento y similares se exponen en la Parte 8 de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.<sup>a</sup> edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, incorporado en la presente solicitud a modo de referencia.

El compuesto de la invención además puede administrarse en formas de liberación sostenida, o desde sistemas de suministro de fármacos de liberación sostenida. Una descripción de materiales de liberación sostenida representativos puede hallarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas que pueden prepararse de acuerdo con esta invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a las siguientes composiciones farmacéuticas.

#### Formulación 1 – Comprimidos

El compuesto de la invención puede mezclarse como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Puede agregarse una cantidad menor de estearato de magnesio como un lubricante. Pueden formarse con la mezcla comprimidos de 240–270 mg (80–90 mg de compuesto activo de amida por comprimido) en una prensa formadora de comprimidos.

#### Formulación 2 – Cápsulas

El compuesto de la invención puede mezclarse como un polvo seco con un diluyente de almidón en una relación en peso aproximada de 1:1. Con la mezcla pueden llenarse cápsulas de 250 mg (125 mg de compuesto activo de amida por cápsula).

Formulación 3 – Líquido

El compuesto de la invención (125 mg) puede mezclarse con sacarosa (1.75 g) y goma de xantano (4 mg), y la mezcla resultante puede combinarse, pasarse a través de un tamiz U. S. malla N.º 10, y luego mezclarse con una solución previamente formada de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa de sodio (11:89, 50 mg) en agua.  
 5 Pueden diluirse con agua benzoato sódico (10 mg), saborizante y colorante, y agregarse con agitación. Entonces puede agregarse suficiente agua, con agitación. A continuación, puede agregarse una cantidad adicional de agua suficiente a fin de producir un volumen total de 5 ml.

Formulación 4 – Comprimidos

El compuesto de la invención puede mezclarse como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Puede agregarse una cantidad menor de estearato de magnesio, como lubricante. Con la mezcla pueden formarse comprimidos de 450–900 mg (150–300 mg de compuesto activo de amida) en una prensa formadora de comprimidos.  
 10

Formulación 5 – Inyección

El compuesto de la invención puede disolverse o suspenderse en un medio acuoso inyectable de solución salina estéril regulada hasta una concentración de aproximadamente 5 mg/ml.  
 15

Formulación 6 – Tópica

Pueden fusionarse alcohol estearílico (250 g) y vaselina blanda (250 g) a aproximadamente 75°C, y luego puede agregarse una mezcla del compuesto de la invención (50 g), metilparabeno (0.25 g), propilparabeno (0.15 g), lauril sulfato de sodio (10 g) y propilenglicol (120 g) disuelta en agua (alrededor de 370 g), y la mezcla resultante puede agitarse hasta la coagulación.  
 20

Métodos de tratamiento

El compuesto de la invención puede usarse como agente terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos que están causalmente relacionadas o son atribuibles a la actividad anormal de JAK. En particular, las afecciones están relacionadas con la actividad anormal de JAK1 y JAK2. Por lo tanto, el compuesto y las composiciones farmacéuticas encuentran uso como agentes terapéuticos para la prevención y el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartilago, malformaciones congénitas del cartilago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, en mamíferos, que incluyen humanos.  
 25

En aspectos adicionales de método de tratamiento, esta invención provee métodos de tratamiento de un mamífero sensible a una afección inflamatoria, o afectado con una afección inflamatoria. Los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección o para la prevención de la afección, de una o más de las composiciones farmacéuticas o del compuesto de la invención, como se describen en esta solicitud. En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.  
 30

En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una afección inflamatoria. En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.  
 35

En aspectos adicionales de método de tratamiento, esta invención provee métodos de tratamiento de un mamífero sensible a una enfermedad autoinmunitaria, o afectado con una enfermedad autoinmunitaria. Los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección o para la prevención de la afección, de una o más de las composiciones farmacéuticas o del compuesto de la invención descritos en esta solicitud. En una modalidad específica, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes sacarina tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.  
 40

En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria. En una modalidad específica, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes sacarina tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.  
 45

En aspectos adicionales de método de tratamiento, esta invención provee métodos de tratamiento de un mamífero sensible a una enfermedad proliferativa, o afectado con una enfermedad proliferativa, en particular, cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como liomiosarcoma uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, LMA o LLA), mieloma múltiple y psoriasis.  
 50

- En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una enfermedad proliferativa, en particular, cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como liomiosarcoma uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, LMA o LLA), mieloma múltiple y psoriasis.
- 5 En aspectos adicionales de método de tratamiento, esta invención provee métodos de tratamiento de un mamífero sensible al rechazo de trasplante, o afectado con rechazo de trasplante. En una modalidad específica, la invención provee métodos de tratamiento de rechazo de trasplante de órganos.
- En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis del rechazo de trasplante. En una modalidad específica, la invención provee métodos de tratamiento de rechazo de trasplante de órganos.
- 10 En un aspecto de método de tratamiento, esta invención provee un método de tratamiento, prevención o profilaxis en un mamífero sensible a enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, o afectado con dichas enfermedades, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o de una o más de las composiciones farmacéuticas que se describen en esta solicitud.
- 15 En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago.
- La presente invención provee además un método de tratamiento de malformaciones congénitas del cartílago, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de una o más de las composiciones farmacéuticas o del compuesto de la invención, descritos en esta solicitud.
- 20 En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de malformaciones congénitas del cartílago.
- En aspectos adicionales de método de tratamiento, esta invención provee métodos de tratamiento de un mamífero sensible a enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, o afectado con dichas enfermedades, en particular, la enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- 25 En otro aspecto, la presente invención provee el compuesto de la invención para el uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, en particular, la enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- Como un aspecto más de la invención, se provee el compuesto de la invención para el uso como un agente farmacéutico, en especial, en el tratamiento o la prevención de las afecciones y enfermedades que se mencionan con anterioridad. Además se provee en esta solicitud el uso de los presentes compuestos en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una de las afecciones o enfermedades que se mencionan anteriormente.
- 30 Un régimen particular del presente método comprende la administración a un sujeto que sufre de una enfermedad que conlleva inflamación, de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, durante un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación en el sujeto, y preferentemente, terminar con los procesos responsables de dicha inflamación. Una modalidad especial del método comprende la administración de una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un paciente sujeto que sufre de artritis reumatoide, o que es sensible a su desarrollo, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la inflamación en las articulaciones de dicho paciente, y preferentemente, terminar con los procesos responsables de dicha inflamación.
- 35 Otro régimen particular del presente método comprende la administración a un sujeto que sufre de una enfermedad caracterizada por la degradación del cartílago o de la articulación (por ejemplo, artritis reumatoide o artrosis), de una cantidad eficaz del compuesto de la invención, durante un período de tiempo suficiente para reducir, y preferentemente, terminar los procesos autoperpetuantes responsables de dicha degradación. Una modalidad particular del método comprende la administración de una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un sujeto que sufre de artrosis, o que es sensible a su desarrollo, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación de cartílago en las articulaciones de dicho paciente, y preferentemente, terminar con los procesos autoperpetuantes responsables de dicha degradación. En una modalidad particular, el compuesto puede exhibir propiedades anabólicas o anticatabólicas de cartílago.
- 40 Las concentraciones de las dosis de inyección varían de alrededor de 0.1 mg/kg/hora a por lo menos 10 mg/kg/hora, todas ellas, durante desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 horas, y en especial, 24 a 96 horas. Además, puede administrarse un bolo de precarga de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más, a fin de lograr concentraciones uniformes adecuadas. Se espera que la dosis máxima total no exceda alrededor de 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.
- 45 Para la prevención y el tratamiento de afecciones de largo plazo, tales como afecciones degenerativas, el régimen de tratamiento habitualmente se extiende durante muchos meses o años, de modo que se prefiere la dosificación
- 50
- 55

oral por razones de conveniencia y tolerancia del paciente. Con la dosificación oral, son regímenes representativos una a cinco, y especialmente, dos a cuatro, y habitualmente, tres dosis orales por día. Con el uso de estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona desde alrededor de 0.01 hasta alrededor de 20 mg/kg del compuesto de la invención, donde las dosis particulares proporcionan, cada una, desde alrededor de 0.1 hasta alrededor de 10 mg/kg, y en especial, alrededor de 1 a alrededor de 5 mg/kg.

Las dosis transdérmicas, en general, se seleccionan de manera que proporcionen concentraciones sanguíneas similares o inferiores a las logradas con el uso de dosis de inyección.

Cuando se usa en la prevención del inicio de una afección inflamatoria, el compuesto de la invención se administrará a un paciente en riesgo de desarrollar la afección, habitualmente, por consejo y bajo supervisión del médico, en las concentraciones de dosificación que se describen anteriormente. Los pacientes en riesgo de desarrollar una afección particular, en general, incluyen aquellos que tienen antecedentes familiares de la afección, o aquellos que han sido identificados por ensayos genéticos o mediante la identificación sistemática, como particularmente sensibles al desarrollo de la afección.

El compuesto de la invención puede administrarse como el único ingrediente activo, o puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, que incluyen otros compuestos que demuestran la misma o similar actividad terapéutica, y que se ha determinado que son seguros y eficaces para dicha administración combinada. En una modalidad específica, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite la utilización de dosis significativamente menores de cada uno, a fin de reducir los efectos secundarios observados.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de una enfermedad que conlleva inflamación; los agentes particulares incluyen, sin limitación, agentes inmunomoduladores, por ejemplo, azatioprina, corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato mofetil, muromonab-CD3 (OKT3, por ejemplo, Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de artritis (por ejemplo, artritis reumatoide); los agentes particulares incluyen, sin limitación, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no corticoesteroides (AINE), esteroides, DMARD (sigla en inglés de "fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad") sintéticos (por ejemplo, sin limitación, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofina, aurotiomalato sódico, penicilamina, cloroquina, hidroxicloroquina, azatioprina y ciclosporina), y DMARD biológicos (por ejemplo, sin limitación, infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab y abatacept).

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de trastornos proliferativos; los agentes particulares incluyen, sin limitación: metotrexato, leucovorina, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluoruracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserrelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (sigla en inglés de "receptor de factor de crecimiento epidérmico") (por ejemplo, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (sigla en inglés de "factor de crecimiento endotelial vascular") (por ejemplo, Avastin™), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™), Glivec® e inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Además, un compuesto de la invención puede administrarse en combinación con otras terapias que incluyen, sin limitación, radioterapia o cirugía. En una modalidad específica, el trastorno proliferativo se selecciona de cáncer, enfermedad mieloproliferativa o leucemia.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias; los agentes particulares incluyen, sin limitación: glucocorticoesteroides, agentes citostáticos (por ejemplo, análogos de purina), agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino y otros), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ejemplo, dactinomicina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OKT3), Atgam® y Thymoglobuline®), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones (por ejemplo, IFN-β), proteínas de unión de TNF (sigla en inglés de "factor de necrosis tumoral") (por ejemplo, infliximab (Remicade™), etanercept (Enbrel™) o adalimumab (Humira™)), micofenolato, fingolimod y miriocina.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de rechazo de trasplantes; los agentes particulares incluyen, sin limitación: inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (sigla en inglés de "blanco mamífero de rapamicina") (por ejemplo, sirolimus, everolimus), antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de receptores anti-IL-2Rα, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-célula T (por ejemplo, globulina antitimocito (ATG, por sus siglas en inglés), globulina antilinfocito (ALG, por sus siglas en inglés)).

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de asma, rinitis o EPOC; los agentes particulares abarcan, sin limitación: agonistas de receptor adrenérgico beta<sub>2</sub> (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (para inhalación o en comprimidos), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio), glucocorticoesteroides (orales o para inhalación), agonistas de β<sub>2</sub> de larga acción (por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol, y albuterol oral de liberación sostenida), combinaciones de corticoesteroides para inhalación y broncodilatadores de larga acción (por ejemplo, fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrieno e inhibidores de la síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlukast y zileutona), inhibidores de la liberación de mediador (por ejemplo, cromoglicato y cetotifeno), reguladores biológicos de la respuesta de IgE (por ejemplo, omalizumab), antihistamínicos (por ejemplo, ceterizina, cinarizina, fexofenadino) y vasoconstrictores (por ejemplo, oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

Asimismo, un compuesto de la invención puede administrarse en combinación con terapias de emergencia para el asma o la EPOC; dichas terapias abarcan la administración de oxígeno o heliox, terbutalina o salbutamol nebulizados (opcionalmente, en combinación 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 para inhalación (por ejemplo, epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol), anticolinérgicos (IV o nebulizados, por ejemplo, glicopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina, bamifilina), anestésicos para inhalación que tienen efecto broncodilatador (por ejemplo, isoflurano, halotano, enflurano), ketamina y sulfato de magnesio intravenoso.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de EI (enfermedad intestinal inflamatoria); los agentes particulares incluyen, sin limitación: glucocorticoesteroides (por ejemplo, prednisona, budesonida), agentes inmunomoduladores sintéticos modificadores de la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores biológicos modificadores de la enfermedad (infiximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de LES (lupus eritematoso sistémico); los agentes particulares incluyen, sin limitación: agentes antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés) tales como antipalúdicos (por ejemplo, plaquenil, hidroxicloquina), inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico; fármacos inmunosupresores y analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no corticoesteroides, opiáceos (por ejemplo, dextropropoxifeno y cocodamol), opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona, MS Contin, o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo Duragesic.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de psoriasis; los agentes particulares incluyen, sin limitación: tratamiento tópicos, tales como soluciones de baño, humectantes, cremas con medicación y ungüentos que contienen alquitrán mineral, ditranol (antralina), corticoesteroides como desoximetasona (Topicort™), fluocinonida, análogos de vitamina D<sub>3</sub> (por ejemplo, calcipotriol), retinoides de aceite de argán (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxíurea, sulfasalazina, micofenolato mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o agentes biológicos tales como Amevive™, Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ y ustekinumab (un bloqueador de IL-12 e IL-23). Asimismo, un compuesto de la invención puede administrarse en combinación con otras terapias que abarcan, sin limitación, fototerapia o fotoquimioterapia (por ejemplo, fototerapia de ultravioleta A (PUVA, por sus siglas en inglés) y psoraleno).

Con la administración conjunta, se incluye cualquier medio para el suministro de dos o más agentes terapéuticos al paciente, como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para el experto. Si bien dos o más agentes pueden administrarse en forma simultánea en una sola formulación, este rasgo no es esencial. Los agentes pueden administrarse en diferentes formulaciones y en momentos diferentes.

#### Procedimientos de síntesis general

##### Aspectos generales.

El compuesto de la invención y los ejemplos comparativos revelados en el documento WO 2010010190 pueden prepararse a partir de materiales iniciales de fácil obtención, usando los siguientes procedimientos y métodos generales. Se apreciará que cuando se proporcionan condiciones típicas o preferidas de proceso (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.), pueden usarse también otras condiciones de proceso, a menos que se establezca lo contrario. Las condiciones óptimas de reacción pueden variar con los reactivos particulares o los solventes utilizados, si bien dichas condiciones pueden ser determinadas por el experto en el arte, mediante experimentos de optimización de rutina.

Asimismo, como será evidente para los expertos en el arte, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales a fin de evitar que ciertos grupos funcionales sufran reacciones indeseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, al igual que las condiciones adecuadas para la protección y

desprotección, son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, se describen numerosos grupos protectores y su introducción y remoción en la referencia de T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis, Second Edition*, Wiley, New York, 1991, y en referencias allí citadas.

5 Los siguientes métodos se presentan con detalle en relación con la preparación del compuesto de la invención, como se define anteriormente, y los ejemplos comparativos. El compuesto de la invención y los ejemplos comparativos se pueden preparar a partir de reactivos y materiales iniciales conocidos o comerciales, por el experto en el arte de la síntesis orgánica.

10 Todos los reactivos eran de grado comercial, y se usaron tal como fueron recibidos, sin purificación adicional, a menos que se establezca lo contrario. Se usaron solventes anhidros comerciales para las reacciones efectuadas en atmósfera inerte. Los solventes de grado reactivo se utilizaron en todos los otros casos, a menos que se indique lo contrario. Se efectuó la cromatografía de columna en gel de sílice 60 (35–70  $\mu\text{m}$ ). La cromatografía de capa delgada se llevó a cabo usando placas F–254 de gel de sílice previamente revestidas (espesor: 0.25 mm). Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se registraron en un espectrómetro Bruker DPX 400 NMR (400 MHz). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) para los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se informan en partes por millón (ppm) en relación con tetrametilsilano ( $\delta$  0.00), o el pico de solvente residual apropiado, es decir,  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta$  7.27), como referencia interna. Las multiplicidades se proporcionan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (q), multiplete (m) y amplio (br). Las constantes de acoplamiento (J) se proporcionan en Hz. Los espectros de MS de electropulverización se obtuvieron en un espectrómetro de LC/MS Micromass de plataforma. Columna utilizada para todos los análisis de LCMS: Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm DI x 50 mm L (Parte N.º 186002350). HPLC preparatoria: Waters XBridge Prep C18, 5  $\mu\text{m}$  ODB 19 mm DI x 100 mm L (Parte N.º 186002978). Todos los métodos se efectuaron usando gradientes de MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$ .  $\text{H}_2\text{O}$  contiene o bien TFA al 0.1%, o  $\text{NH}_3$  al 0.1%.

Lista de abreviaturas utilizadas en la sección experimental:

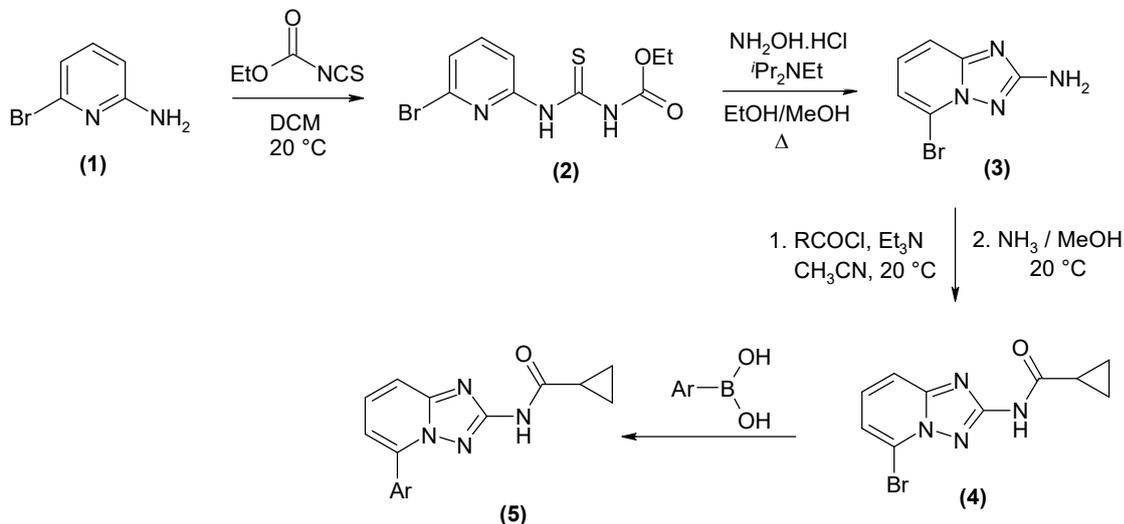
DCM:	Diclorometano
DiPEA:	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
MeCN	Acetonitrilo
BOC	<i>ter</i> -Butiloxi-carbonilo
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPA	Difenilfosforilazida
LC–MS	Cromatografía líquida–Espectrometría de masa
Ppm	partes por millón
EtOAc	acetato de etilo
APCI	Ionización química de presión atmosférica
Rt	tiempo de retención
s	singlete
br s	singlete amplio
m	multiplete
d	doblete
PdCl <sub>2</sub> dppf	[1,1'–Bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaldio (II)
TEA	Trietilamina

Preparación sintética del compuesto de la invención y ejemplos comparativos

El compuesto de la invención y los ejemplos comparativos pueden producirse de acuerdo con el siguiente esquema de reacción.

Método de síntesis general

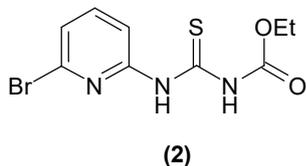
5 Esquema 1



donde Ar representa fenil-L1-heterocicloalquilo, donde L1 es un enlace,  $-CH_2-$  o  $-CO-$ , y el grupo heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido.

Aspecto general.

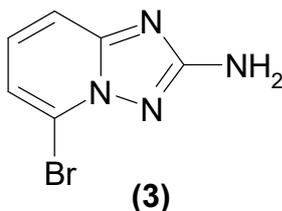
10 1.1.1. 1-(6-Bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (2).



A una solución de 2-amino-6-bromopiridina (1) (253.8 g, 1.467 mol) en DCM (2.5 l), enfriada hasta 5°C, se agrega isotiocianato de etoxicarbonilo (173.0 ml, 1.467 mol), por goteo, en un lapso de 15 min. A continuación, la mezcla de reacción se deja entibiar hasta temperatura ambiente (20°C) y se agita durante 16 h. La evaporación al vacío proporciona un sólido, que puede ser recogido mediante la filtración, lavado por completo con gasolina (3 x 600 ml) y secado al aire, a fin de lograr (2). La tiourea puede usarse como tal para la siguiente etapa, sin ninguna purificación.

<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.03 (1H, br s, NH), 8.81 (1H, d, J 7.8 Hz, H-3), 8.15 (1H, br s, NH), 7.60 (1H, t, J 8.0 Hz, H-4), 7.32 (1H, dd, J 7.7 y 0.6 Hz, H-5), 4.31 (2H, q, J 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.35 (3H, t, J 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>).

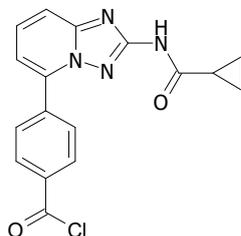
1.1.2. 5-Bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-ilamina (3).



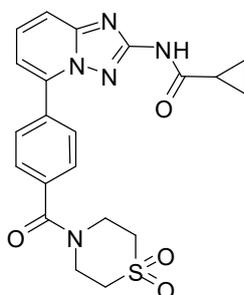
A una suspensión de clorhidrato de hidroxilamina (101.8 g, 1.465 mol) en EtOH/MeOH (1:1, 900 ml) se agrega *N,N*-diisopropiletilamina (145.3 ml, 0.879 mol), y la mezcla se agita a temperatura ambiente (20°C) durante 1 h. A continuación, se agrega 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (2) (89.0 g, 0.293 mol), y la mezcla se calienta lentamente hasta reflujo (observación: se necesita depurador de blanqueo para apagar H<sub>2</sub>S emanado).

Después de 3 h a reflujo, la mezcla se deja enfriar y se filtra de manera de recoger el sólido precipitado. Se recoge

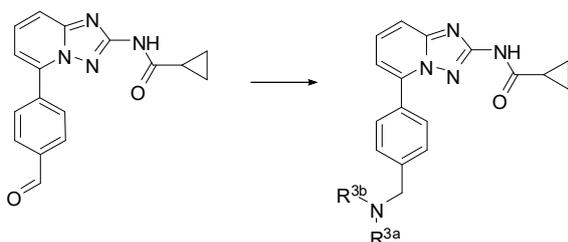


B1. 4 Cloruro de 4-[2-(Ciclopropanocarbonil-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il]-benzoílo.

- 5 Se agregan dos gotas de DMF a una solución de ácido 4-[2-(ciclopropanocarbonil-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il]-benzoico (1 eq.), obtenida por el Método A usando ácido 4-carboxifenilborónico en DCM en atmósfera de N<sub>2</sub>. A continuación, se agrega cloruro de oxalilo (2 eq.) por goteo, a esta solución resultante (liberación de gas). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la finalización de la reacción por LCMS, se elimina el solvente. El cloruro ácido bruto se usa sin otra purificación en la siguiente etapa.

B2. Formación de amida (Método general).

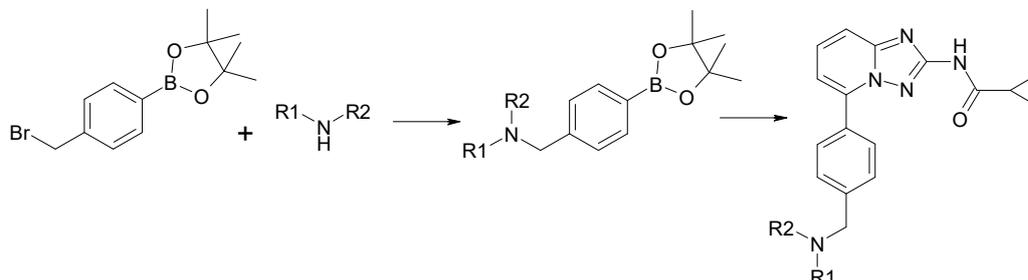
- 10 Una amina apropiada (1.1 eq.) y Et<sub>3</sub>N (5 eq.) se disuelven en DCM en atmósfera de N<sub>2</sub>, y se enfrían a 0°C. El cloruro ácido (B1, 1 eq.) disuelto en DCM se agrega por goteo a esta solución. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este período de tiempo, la reacción se completa. Se extrae el compuesto con EtOAc y agua, se lava con salmuera y se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. Las capas orgánicas se filtran y se evaporan. El compuesto final se aísla por medio de la HPLC preparatoria. HPLC preparatoria: Waters XBridge Prep C18, 5 μm ODB 19 mm DI x 100 mm L (Parte N.º 186002978). Todos los métodos utilizan gradientes de MeCN/H<sub>2</sub>O. El H<sub>2</sub>O contiene o bien 0.1% de TFA o 0.1% de NH<sub>3</sub>.

Método C.

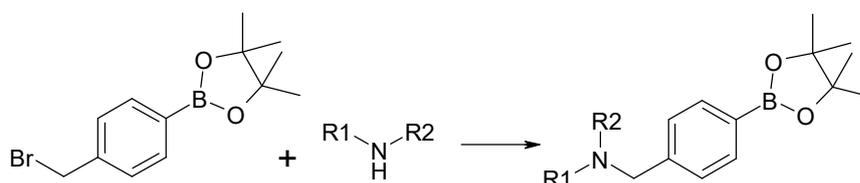
donde R<sup>3a</sup> o R<sup>3b</sup> junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos pueden formar un heterocicloalquilo.

20 Alquilación reductora (método general).

- Se mezclan una amina apropiada (2 eq.), ácido ciclopropanocarboxílico (por ejemplo, [5-(4-formil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico) preparado por el método A (1 eq.) y Ti(OPr)<sub>4</sub> y se agitan a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se diluye en etanol, y se agrega Na(CN)BH<sub>3</sub> (1 eq.). La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se diluye con agua y se filtra. El producto filtrado se lava con etanol. Las fases de solvente combinadas se evaporan al vacío. El compuesto final es aislado por medio de la HPLC preparatoria.

Método D.

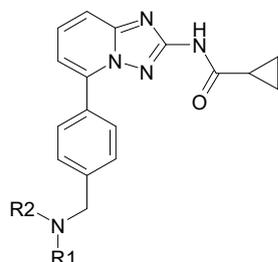
donde  $R^1$  y  $R^2$  junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos pueden formar un heterocicloalquilo.

Reacción de alquilación.

5

Se disuelven 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (1 eq.) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 eq.) (o  $\text{AgCO}_3$ ) en DCM/MeOH (4:1 v:v) en  $\text{N}_2$ , y se agrega una amina (2 eq.) por goteo. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este período de tiempo, la reacción se completa. El solvente se evapora. Se extrae el compuesto con EtOAc y agua, se lava con salmuera y se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Las capas orgánicas se filtran y se evaporan. El compuesto final es aislado por medio de la cromatografía instantánea.

10

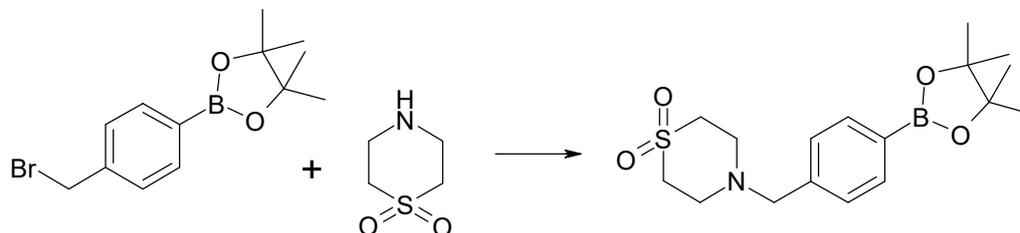
Acoplamiento de Suzuki.

15

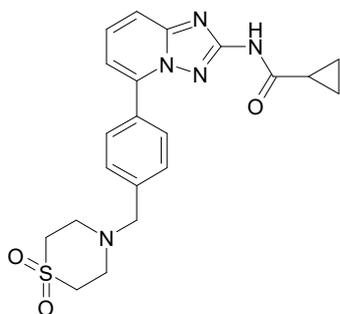
El ácido borónico (2 eq.) obtenido se agrega a una solución de (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (4) en 1,4-dioxano/agua (5:1). Se agregan a la solución  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 eq.) y  $\text{PdCl}_2\text{dppf}$  (5%). La mezcla resultante luego se calienta en un microondas a  $140^\circ\text{C}$  durante 30 min (esta reacción también puede llevarse a cabo mediante el calentamiento tradicional en un baño de aceite a  $90^\circ\text{C}$  durante 16 h en  $\text{N}_2$ ). Se agrega agua, y la solución se extrae con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporan al vacío. El compuesto final se obtiene luego de la purificación por medio de la cromatografía instantánea o la HPLC preparatoria. HPLC: Waters XBridge Prep C18, 5  $\mu\text{m}$  ODB 19 mm DI x 100 mm L (Parte N.º 186002978).

20

Síntesis del compuesto de la invención y ejemplos comparativos.

Compuesto 1 (el compuesto de la invención).*Etapas 1:*

- 5 Se disolvieron 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (1 eq.) y DIPEA (2 eq.) en DCM/MeOH (5:1 v:v) en N<sub>2</sub>, y se agregó en porciones 1,1-dióxido de tiomorfolina (2 eq.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este lapso de tiempo, la reacción se completó. El solvente se evaporó. Se extrajo el compuesto con EtOAc y agua, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. Las capas orgánicas se filtraron y se evaporaron. El compuesto final se aisló sin otra purificación.

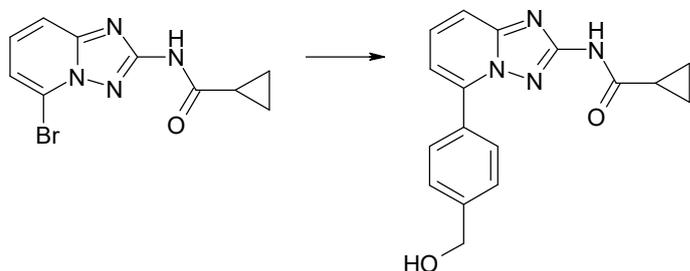
*Etapas 2: Acoplamiento de Suzuki.*

- 10  
15 Se agregó 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-bencil]-tiomorfolina-1,1-dióxido (1,1 eq.) a una solución de (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico en 1,4-dioxano/agua (4:1). Se agregaron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq.) y PdCl<sub>2</sub>dppf (0.03 eq.) a la solución. La mezcla resultante luego se calentó en un baño de aceite a 90°C durante 16 h, en N<sub>2</sub>. Se agregó agua, y la solución se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporaron al vacío. El compuesto final se obtuvo luego de la purificación por medio de la cromatografía instantánea.

- 20 Alternativamente, luego de la finalización de la reacción, se agrega un depurador de paladio, tal como 1,2-bis(difenilfosfino)etano. La mezcla de reacción se deja enfriar, y se lleva a cabo la filtración. La torta filtro se resuspende en un solvente adecuado (por ejemplo, acetona), se separa el sólido mediante la filtración, se lava con una cantidad adicional de acetona, y se seca. El sólido resultante se resuspende en agua; se agrega HCl acuoso, y después de la agitación a T. A., la solución resultante se filtra sobre Celite (Celpure P300). A continuación, se agrega NaOH acuoso al producto filtrado, y la suspensión resultante se agita a T. A., el sólido se separa mediante la filtración, se lava con agua y se seca por medio de la succión. Finalmente, la torta se solubiliza nuevamente en una mezcla de THF/H<sub>2</sub>O, y se trata con un depurador de paladio (por ejemplo, SMOPEX 234) a 50°C. La suspensión se  
25 filtra; los solventes orgánicos se eliminan por medio de la evaporación, y la suspensión resultante se lava con agua y metanol, se seca y se tamiza, a fin de obtener el compuesto del enunciado en forma de una base libre.

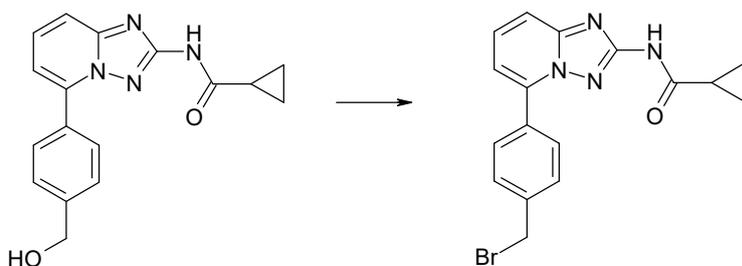
Vía alternativa para el Compuesto 1 (el compuesto de la invención).

Etapa 1:



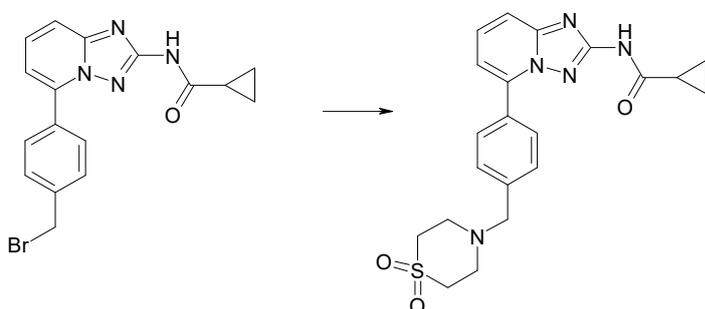
5 Se agregó ácido 4-(hidroximetil)fenilborónico (1.1 eq.) a una solución de (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico en 1,4-dioxano/agua (4:1). Se agregaron  $K_2CO_3$  (2 eq.) y  $PdCl_2dppf$  (0.03 eq.) a la solución. La mezcla resultante luego se calentó en un baño de aceite a  $90^\circ C$  durante 16 h, en  $N_2$ . Se agregó agua, y la solución se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre  $MgSO_4$  anhidro y se evaporaron al vacío. La mezcla resultante se usó sin purificación adicional.

Etapa 2:



10 A una solución de [5-(4-hidroximetil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (1.0 eq.) en cloroformo se agregó lentamente tribromuro de fósforo (1.0 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, se apagó con hielo y agua (20 ml) y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se secó sobre  $MgSO_4$  anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo blanco resultante se trituró con diclorometano/éter dietílico, 2:1, a fin de lograr el producto esperado en forma de un sólido de color blanco.

Etapa 3:



20 Se disolvieron [5-(4-bromometil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (1 eq.) y DIPEA (2 eq.) en DCM/MeOH (5:1, v:v) en  $N_2$ , y se agregó por goteo 1,1-dióxido de tiomorfolina (1.1 eq.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este período de tiempo, la reacción se completó. El solvente se evaporó. El compuesto se disolvió en DCM, se lavó con agua y se secó sobre  $MgSO_4$  anhidro. Las capas orgánicas se filtraron y se evaporaron. El compuesto final se aisló por medio de la cromatografía de columna usando EtOAc a fin de lograr el producto deseado.

25 Ejemplos comparativos.

Compuesto comparativo 2.

Este compuesto se preparó usando el Método General A y 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-bencil]-morfolina.

Compuesto comparativo 3.

5 Este compuesto se preparó usando el método general A y clorhidrato del éster de pinacol del ácido 3-(4-morfolinometil)-fenilborónico.

Compuesto comparativo 4.

Este compuesto se preparó usando el método general A y éster de pinacol del ácido 2-(4-morfolino)piridina-5-borónico.

Compuesto comparativo 5.

10 Este compuesto se preparó usando el método general A y 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]morfolina.

Compuesto comparativo 6.

Este compuesto se preparó usando el método general C y N-metil-piperazina.

Compuesto comparativo 7.

15 Este compuesto se preparó usando el método general C y piperidina.

Compuesto comparativo 8.

Este compuesto se preparó usando el método general C y amida del ácido piperidina-4-carboxílico.

Compuesto comparativo 9.

Este compuesto se preparó usando el método general C y 1-piperazin-1-il-etanona.

20 Compuesto comparativo 10.

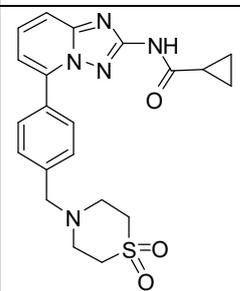
Este compuesto se preparó usando el método general B y 1,1-dióxido de tiomorfolina.

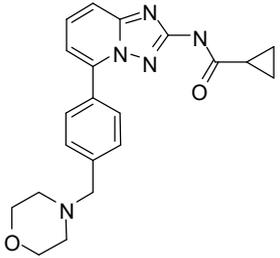
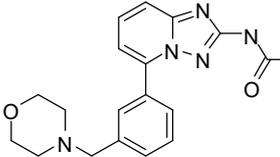
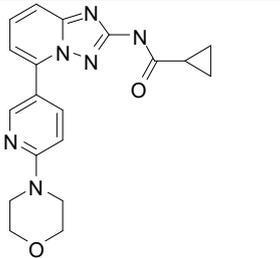
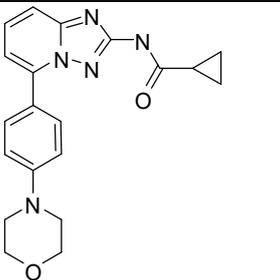
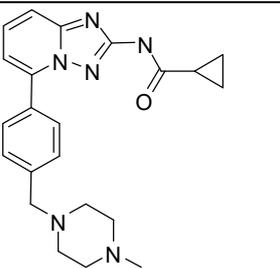
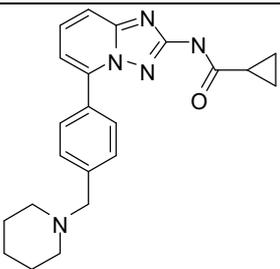
Compuesto comparativo 11.

Este compuesto se preparó usando el método general D y 4,4-difluoropiperidina.

25 El compuesto de la invención y los ejemplos comparativos que se han preparado de acuerdo con los métodos de síntesis que se describen en esta solicitud se citan en la Tabla I que sigue. La información espectral de RMN del compuesto de la invención y de algunos de los ejemplos comparativos se proporciona en la Tabla II.

Tabla I

Comp. #	Estructuras	Denominación	MW	MS Med.
Compuesto ilustrativo 1		{5-[4-(1,1-dioxo-1-tiomorfolin-4-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	425.51	426

Compuesto ilustrativo 2		N-(5-(4-(morfolinometil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	377.45	378.2
Compuesto ilustrativo 3		N-(5-(3-(morfolinometil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	377.45	378.2
Compuesto ilustrativo 4		N-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	364.41	365.1
Compuesto ilustrativo 5		N-(5-(4-morfolinofenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	363.42	364.0
Compuesto ilustrativo 6		N-(5-(4-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	390.49	391.1
Compuesto ilustrativo 7		N-(5-(4-(piperidin-1-il)metil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	375.48	376.1

Compuesto ilustrativo 8		1-(ciclopropanocarboxamido)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)encil)piperidina-4-carboxamida	418.5	419.1
Compuesto ilustrativo 9		N-(5-(4-((4-acetolpiperazin-1-il)metil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	418.5	419.1
Compuesto ilustrativo 10		{5-[4-(1,1-dioxo-1-tiomorfolina-4-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	439.49	440.0
Compuesto ilustrativo 11		{5-[4-(4,4-difluoro-piperidin-1-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	411.46	412.1

Tabla II: Datos de RMN de compuestos representativos de la invención y ejemplos comparativos

Comp. #	( $\delta$ ) Información de RMN
Compuesto ilustrativo 1	( $^1\text{H}$ , DMSO- $d_6$ ) 11.00 (1H, b, NH) 7.99 (2H, d, 2 x ArH) 7.70 (2H, m, 2 x ArH) 7.53 (2H, d, 2 x ArH) 7.30 (1H, dd, ArH) 3.78 (2H, s, CH <sub>2</sub> ) 3.14 (4H, b, 4 x CH) 2.93 (4H, b, 4 x CH) 2.03 (1H, b, CH) 0.82 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> )
Compuesto ilustrativo 2	( $^1\text{H}$ , CDCl <sub>3</sub> ) 10.20 (1H, b, NH), 8.06 (2H, d, ArH), 7.72 (2H, m, ArH), 7.63 (2H, d, ArH), 7.23 (1H, d, ArH), 4.27 (2H, s, CH <sub>2</sub> ), 3.99 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> ), 3.50 (2H, br, CH <sub>2</sub> ), 2.95 (2H, br, CH <sub>2</sub> ), 1.97 (1H, br, CH), 1.17 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.95 (2H, m, CH <sub>2</sub> )
Compuesto ilustrativo 3	( $^1\text{H}$ , CDCl <sub>3</sub> ) 8.32 (1H, s, ArH), 7.96 (1H, m, ArH), 7.79 (1H, m, ArH), 7.66 (3H, m, ArH), 7.32 (1H, d, ArH), 4.31 (2H, s, CH <sub>2</sub> ), 4.05 (4H, b, 2 x CH <sub>2</sub> ), 3.6 (2H, br, CH <sub>2</sub> ), 3.06 (2H, br, CH <sub>2</sub> ), 1.85 (1H, br, CH), 1.12 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.98 (2H, m, CH <sub>2</sub> )

Compuesto ilustrativo 4	( <sup>1</sup> H, CDCl <sub>3</sub> ) 8.71 (1H, s, NH), 8.35 (1H, m, ArH), 8.27 (1H, br, ArH), 7.57 (2H, d, ArH), 7.07 (1H, m, ArH), 6.78 (1H, d, ArH), 3.86 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> ), 3.66 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> ), 1.6 (1H, br, CH), 1.22 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.95 (2H, m, CH <sub>2</sub> )
Compuesto ilustrativo 5	(1H, DMSO-d <sub>6</sub> ) 11.06 (1H, br, NH), 7.98 (2H, d, ArH), 7.67 (1H, m, ArH), 7.59 (1H, d, ArH), 7.25 (1H, m, ArH), 7.08 (2H, m, ArH), 3.67 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> ), 3.25 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> ), 2.02 (1H, br, CH), 0.82 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> )
Compuesto ilustrativo 10	(1H, DMSO-d <sub>6</sub> ) 11.03 (1H, b, NH), 8.11 (2H, d, ArH), 7.73 (1H, d, ArH), 7.72 (1H, s, ArH), 7.68 (2H, d, ArH), 7.36 (1H, dd, ArH), 4.01 (2H, b, CH <sub>2</sub> ), 3.81 (2H, b, CH <sub>2</sub> ), 3.31 (4H, b bajo pico de agua, 2 x CH <sub>2</sub> ), 2.03 (1H, b, CH), 0.81 (4H, m, CH <sub>2</sub> )
Compuesto ilustrativo 11	(1H, DMSO-d <sub>6</sub> ) 10.99 (1H, b, NH), 7.98 (2H, d, 2 x ArH), 7.70 (2H, m, 2 x ArH), 7.50 (2H, d, 2 x ArH), 7.29 (1H, dd, ArH), 3.65 (2H, s, CH <sub>2</sub> ), 2.54 (4H, b, 4 x CH), 1.98 (5H, b, 5 x CH), 0.81 (4H, m, 2 x CH <sub>2</sub> )

## Ejemplos biológicos.

Ejemplo 1. Ensayos *in vitro*

## 1.1 Ensayo de inhibición de JAK1.

5 El dominio catalítico JAK1 humano recombinado (aminoácidos 850–1154; catálogo n.º 08–144) se obtuvo de Carna Biosciences. Se incubaron 10 ng de JAK1 con 12.5 µg de sustrato poliGT (Sigma catálogo n.º P0275) en regulador de reacción de quinasa (Tris, 15 mM–HCl, pH 7.5; DTT, 1 mM; 0.01% de Tween–20; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; 2 µM de ATP no radiactivo; 0.25 µCi <sup>33</sup>P–gamma–ATP (GE Healthcare, catálogo n.º AH9968), concentraciones finales) con o sin 5 µl de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de 96 receptáculos de polipropileno (Greiner, fondo V). Después de 45 min a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante el agregado de 25 µl/receptáculo de ácido fosfórico, 150 mM. La totalidad de la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas filtro de 96 receptáculos prelavadas (ácido fosfórico, 75 mM) (Perkin Elmer catálogo número 6005177) usando una cosechadora de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por receptáculo de una solución de ácido fosfórico, 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se agregaron 40 µl/receptáculo de Microscint–20, se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura usando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa mediante la sustracción de los recuentos por minuto (c. p. m.) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina, 10 µM), de los c. p. m. obtenidos en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

20 Porcentaje de inhibición = ((c. p. m. determinado para la muestra con compuesto de ensayo presente – c. p. m. determinado para la muestra con inhibidor de control positivo), dividido por (c. p. m. determinado en presencia de vehículo – c. p. m. determinado para la muestra con inhibidor de control positivo)) \* 100.

25 Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el ensayo de los efectos de dosis y respuesta en el ensayo de JAK1 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó en forma rutinaria en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución serial de 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 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

30 Los siguientes compuestos se han ensayado a fin de determinar su actividad contra JAK1 y los valores de IC<sub>50</sub>, establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, y que se proporcionan a continuación en la Tabla IIIA.

Tabla IIIA: Valores de JAK1 de los compuestos

Comp. #	JAK1 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto ilustrativo 1	47.07, 55.66, 50.1, 48.29
Compuesto comparativo 2	50.91, 52.11
Compuesto comparativo 3	291
Compuesto comparativo 4	1032
Compuesto comparativo 5	1450

Comp. #	JAK1 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto comparativo 6	3448
Compuesto comparativo 7	504.1
Compuesto comparativo 8	435
Compuesto comparativo 9	334.3
Compuesto comparativo 10	18.16
Compuesto comparativo 11	7.69

### 1.2 Ensayo de determinación de Ki de JAK1.

Para la determinación del Ki, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima, y la reacción enzimática se siguió como una función de la concentración de ATP. El valor Ki se determinó por medio del trazado recíproco doble de Km en comparación con la concentración de compuesto (Lineweaver–Burk plot). Se usó 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774) en el ensayo. El sustrato fue péptido 50 nM Ulight–JAK–1 (Tyr1023) (Perkin Elmer, TRF0121). La reacción se llevó a cabo en MOPS, 25 mM, pH 6.8, 0.01%; DTT, 2 mM; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM; Brij–35, con diversas concentraciones de ATP y compuesto. El sustrato fosforilado se midió usando un anticuerpo antifosfotirosina marcado con Eu, PT66 (Perkin Elmer, AD0068). Se llevó a cabo la lectura en el instrumento Envision (Perkin Elmer), con una excitación a 320 nm seguida de emisión a 615 nm y 665 nm.

Por ejemplo, cuando se ensayó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor Ki de 39 nM.

### 1.3 Ensayo de inhibición de JAK2.

Se obtuvo el dominio catalítico de JAK2 humano recombinado (aminoácidos 808–1132; catálogo número PV4210) de Invitrogen. Se incubaron 0.025 mU de JAK2 con 2.5 µg de sustrato poliGT (Sigma catálogo número P0275) en regulador de reacción de quinasa (MOPS, 5 mM, pH 7.5; MgAc, 9 mM; EDTA, 0.3 mM; Brij al 0.06% y DTT, 0.6 mM; 1 µM ATP no radiactivo; 0.25 µCi <sup>33</sup>P–gamma–ATP (GE Healthcare, catálogo número AH9968), concentraciones finales), con o sin 5 µl de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de 96 receptáculos de polipropileno (Greiner, fondo V). Después de 90 min a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante el agregado de 25 µl/receptáculo de ácido fosfórico, 150 mM. El total de la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas filtro de 96 receptáculos prelavadas (ácido fosfórico, 75 mM) (Perkin Elmer, catálogo n.º 6005177), empleando un cosechador de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron seis veces con 300 µl por receptáculo de una solución de ácido fosfórico, 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se agregaron 40 µl/receptáculo de Microscint–20; se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura empleando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa mediante la sustracción de los recuentos por minuto (c. p. m.) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina, 10 µM) de los c. p. m. obtenidos en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

Porcentaje de inhibición = ((c. p. m. determinados para la muestra con compuesto de ensayo presente – c. p. m. determinados para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (c. p. m. determinados en presencia de vehículo – c. p. m. determinados para la muestra con inhibidor de control positivo)) \* 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el ensayo de los efectos de dosis y respuesta en el ensayo de JAK2 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó en forma rutinaria en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución serial de 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 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Los siguientes compuestos se han ensayado a fin de determinar su actividad contra JAK2 y los valores de IC<sub>50</sub>, establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, y que se proporcionan a continuación en la Tabla IIIB.

#### 40 Tabla IIIB: Valores IC<sub>50</sub> de JAK2 de los compuestos

Comp. #	JAK2 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto ilustrativo 1	31.37; 41.16; 55.49; 167.34

Comp. #	JAK2 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto comparativo 2	38.73; 152.3; 184.7
Compuesto comparativo 3	N/A
Compuesto comparativo 4	N/A
Compuesto comparativo 5	1760
Compuesto comparativo 6	5070
Compuesto comparativo 7	6449
Compuesto comparativo 8	7731; 1355
Compuesto comparativo 9	848.7
Compuesto comparativo 10	65.42
Compuesto comparativo 11	15.51

#### 1.4. Ensayo de determinación de Kd de JAK2.

Se usó JAK2 (Invitrogen, PV4210) en una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se efectuó en Hepes, 50 mM, pH 7.5; Brij-35 al 0.01%; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; EGTA, 1 mM; usando trazador de quinasa 236, 25 nM (Invitrogen, PV5592) y Eu-anti-GST, 2 nM (Invitrogen, PV5594), con diversas concentraciones de compuesto. La detección de trazador se efectuó de acuerdo con el procedimiento de los fabricantes.

Por ejemplo, cuando se ensayó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor Kd de 205 nM.

#### 1.5. Ensayo de inhibición de JAK3.

Se obtuvo el dominio catalítico de JAK3 humano recombinado (aminoácidos 781–1124; catálogo número PV3855) de Invitrogen. Se incubaron 0.025 μM de JAK3 con 2.5 μg de sustrato poliGT (Sigma catálogo número P0275) en regulador de reacción de quinasa (Tris, 25 mM, pH 7.5; EGTA, 0.5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mM; β-glicerolfosfato, 5 mM; 0.01% de Triton X-100; 1 μM de ATP no radiactivo; 0.25 μCi 33P-γ-ATP (GE Healthcare, catálogo número AH9968), concentraciones finales), con o sin 5 μl de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% concentración final), en un volumen total de 25 μl, en una placa de 96 receptáculos de polipropileno (Greiner, fondo V). Después de 105 min a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante el agregado de 25 μl/receptáculo de ácido fosfórico, 150 mM. El total de la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas filtro de 96 receptáculos prelavadas (ácido fosfórico, 75 mM) (Perkin Elmer, catálogo n.º 6005177), empleando un cosechador de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron seis veces con 300 μl por receptáculo de una solución de ácido fosfórico, 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se agregaron 40 μl/receptáculo de Microscint-20; se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura empleando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa mediante la sustracción de los recuentos por minuto (c. p. m.) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina, 10 μM) de los c. p. m. obtenidos en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

Porcentaje de inhibición = ((c. p. m. determinados para la muestra con compuesto de ensayo presente – c. p. m. determinados para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (c. p. m. determinados en presencia de vehículo – c. p. m. determinados para la muestra con inhibidor de control positivo)) \* 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el ensayo de los efectos de dosis y respuesta en el ensayo de JAK3 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó en forma rutinaria en una concentración de 20 μM, seguida de una dilución serial de 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 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuestos aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 μM, 1 μM).

Los siguientes compuestos se han ensayado a fin de determinar su actividad contra JAK3 y los valores de IC<sub>50</sub>, establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, y que se proporcionan a continuación en la Tabla IIIC.

Tabla IIIC: Valores IC<sub>50</sub> de JAK3 de los compuestos

Comp. #	JAK3 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto ilustrativo 1	149.35; 187.3; 189.3; 194.7
Compuesto comparativo 2	2843
Compuesto comparativo 11	194.6

## 1.6. Ensayo de determinación de Ki de JAK3.

5 Para la determinación del Ki, se mezclan diferentes cantidades de compuesto con la enzima, y la reacción enzimática se sigue como una función de la concentración de ATP. El valor Ki se determina por medio del trazado recíproco doble de Km en comparación con la concentración de compuesto (Lineweaver–Burk plot). Se usó JAK3 (Carna Biosciences, 09CBS–0625B) en una concentración final de 10 ng/ml. El sustrato fue la sal sódica de Poli(Glu, Tyr), (4:1), MW 20 000 – 50 000 (Sigma, P0275). La reacción se efectuó en Tris, 25 mM; pH 7.5; 0.01% de Triton X–100; EGTA, 0.5 mM; DTT, 2.5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mM; b–glicerolfosfato, 5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; con diversas concentraciones de ATP y compuesto, y se detuvo mediante el agregado de ácido fosfórico, 150 mM. La medición de fosfato incorporado en el sustrato poliGT se realizó por medio de la carga de las muestras en una placa filtro (usando un cosechador, Perkin Elmer), y el lavado posterior. Se midió el <sup>33</sup>P incorporado en poliGT en un contador de centelleo Topcount luego del agregado de líquido de centelleo a las placas filtro (Perkin Elmer).

Por ejemplo, cuando se ensayó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor Ki de 353 nM.

## 15 1.7. Ensayo de inhibición de TYK2.

20 El dominio catalítico TYK2 humano recombinado (aminoácidos 871–1187; catálogo n.º 08–147) se obtuvo de Carna Biosciences. Se incubaron 5 ng de TYK2 con 12.5 µg de sustrato poliGT (Sigma catálogo n.º P0275) en regulador de reacción de quinasa (Hepes, 25 mM; pH 7.5; NaCl, 100 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.2 mM; 0.1% de NP–40; ATP no radiactivo, 0.1 µM; 0.125 µCi de <sup>33</sup>P–gamma–ATP (GE Healthcare, catálogo n.º AH9968), concentraciones finales), con o sin 5 µl de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de 96 receptáculos de polipropileno (Greiner, fondo V). Después de 90 min a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante el agregado de 25 µl/receptáculo de ácido fosfórico, 150 mM. La totalidad de la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas filtro de 96 receptáculos prelavadas (ácido fosfórico, 75 mM) (Perkin Elmer catálogo número 6005177) usando una cosechadora de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por receptáculo de una solución de ácido fosfórico, 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se agregaron 40 µl/receptáculo de Microscint–20, se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura usando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa mediante la sustracción de los recuentos por minuto (c. p. m.) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina, 10 µM), de los c. p. m. obtenidos en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

Porcentaje de inhibición = ((c. p. m. determinado para la muestra con compuesto de ensayo presente – c. p. m. determinado para la muestra con inhibidor de control positivo), dividido por (c. p. m. determinado en presencia de vehículo – c. p. m. determinado para la muestra con inhibidor de control positivo)) \* 100.

35 Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el ensayo de los efectos de dosis y respuesta en el ensayo de TYK2 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó en forma rutinaria en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución serial de 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 1% de DMSO. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

40 Los siguientes compuestos se han ensayado a fin de determinar su actividad contra TYK2; y los valores de IC<sub>50</sub>, establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, se proporcionan a continuación en la Tabla IIID.

Tabla IIID: Valores IC<sub>50</sub> de TYK2 de los compuestos

Comp. #	TYK2 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto ilustrativo 1	72.7; 73.75; 79.07; 86.77
Compuesto comparativo 2	2096

Comp. #	TYK2 IC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto comparativo 11	125.8

1.8. Ensayo de determinación de Kd de TYK2.

Se usó TYK2 (Carna Biosciences, 09CBS-0983D) en una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se efectuó en Hepes, 50 mM; pH 7.5; 0.01% de Brij-35; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; EGTA, 1 mM; usando trazador de quinasa 236, 50 nM (Invitrogen, PV5592) y Eu-anti-GST, 2 nM (Invitrogen, PV5594) con diversas concentraciones de compuestos. La detección del trazador se efectuó de acuerdo con el procedimiento de los fabricantes.

Por ejemplo, cuando se ensayó el Compuesto 1 en este ensayo, se midió un valor Kd de 376 nM.

Ejemplo 2. Ensayos celulares.

2.1. Ensayo de señalización JAK-STAT.

Se mantuvieron células HeLa en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se usaron células HeLa a 70% de confluencia, para la transfección. Se transfectaron en forma transiente 20 000 células en 87 µl de medio de cultivo celular, con 40 ng de pSTAT1(2)-reportero de luciferasa (Panomics), 8 ng de reportero LacZ como reportero de control interno y 52 ng de pBSK, usando 0.32 µl de Jet-PEI (Polyplus) como reactivo de transfección por receptáculo, en un formato de placa de 96 receptáculos. Después de la incubación durante la noche a 37°C, CO<sub>2</sub> al 10%, se removió el medio de transfección. Se agregaron 75 µl de DMEM + suero de ternero fetal inactivado por calor al 1.5%. Se agregaron 15 µl de compuesto en una concentración de 6.7 x en un período de tiempo de 60 min, y luego, 10 µl de OSM humana (Peprotech) en una concentración final de 33 ng/ml.

Todos los compuestos se ensayaron por duplicado, iniciando a partir de 20 µM, seguido de una dilución serial 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 0.2% de DMSO.

Después de la incubación durante la noche a 37°C, CO<sub>2</sub> al 10%, las células se lisaron en 100 µl de regulador de lisis/receptáculo (PBS, CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM; MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM; 5% de trehalosa; 0.025% de Tergitol NP9; 0.15% de BSA).

Se usaron 40 µl de lisado celular a fin de leer la actividad de β-galactosidasa mediante el agregado de 180 µl de solución de β-Gal (30 µl de ONPG 4 mg/ml + 150 µl de regulador de β-galactosidasa (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.06 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04 M; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM)) durante 20 min. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 M. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

La actividad de luciferasa se midió usando 40 µl de lisado celular más 40 µl de Steadylite<sup>®</sup>, como lo describe el fabricante (Perkin Elmer), en el instrumento Envision (Perkin Elmer).

Se usaron 10 µM de un inhibidor de pan-JAK como un control positivo (100% de inhibición). Como un control negativo, se usó DMSO al 0.5% (0% de inhibición). Los controles positivos y negativos se utilizaron para el cálculo de los valores z' y de "porcentaje de inhibición" (PIN, por sus siglas en inglés).

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

Se trazaron los valores PIN para los compuestos ensayados en dosis y respuesta, y se derivaron los valores EC<sub>50</sub>.

TABLA IV

Comp. #	EC <sub>50</sub> (nM)
Compuesto ilustrativo 1	922.5; 625.6; 987.7; 1767
Compuesto comparativo 2	>10000, 3322, 2492
Compuesto comparativo 11	740.4

Ejemplo 2.2. Ensayo de señalización OSM/IL-1β.

OSM e IL-1β demostraron regular en forma ascendente, sinérgicamente, las concentraciones de MMP13 en la estirpe celular de condrosarcoma humano SW1353. Las células se sembraron en placas de 96 receptáculos, en una

proporción de 15 000 células por receptáculo, en un volumen de 120 µl de DMEM (Invitrogen) que contenía 10% (v/v) de FBS y 1% de penicilina/estreptomina (Invitrogen), y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron preincubadas con 15 µl de compuesto en medio M199 con 2% de DMSO, 1 hora antes del desencadenamiento con 15 µl de OSM e IL-1β, de modo de lograr 25 ng/ml de OSM y 1 ng/ml de IL-1β, y se midieron las concentraciones de MMP13 en medio acondicionado, 48 horas después del desencadenamiento. La actividad de MMP13 se midió usando un ensayo de actividad de captura de anticuerpo. Para este propósito, se revistieron placas de 384 receptáculos (NUNC, 460518, MaxiSorb black) con 35 µl de una solución de anticuerpo MMP13 antihumano, 1.5 µg/ml (R&D Systems, MAB511), durante 24 h a 4°C. Después del lavado de los receptáculos, dos veces con PBS + 0.05% de Tween, los sitios de unión restantes se bloquearon con 100 µl de leche descremada desecada al 5% (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) en PBS, durante 24 h a 4°C. A continuación, los receptáculos se lavaron dos veces con PBS + 0.05% de Tween, y se agregaron 35 µl de una dilución 1/10 de sobrenadante de cultivo que contenía MMP13 en regulador de bloqueo diluido 100 veces; se incubaron los receptáculos durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los receptáculos dos veces con PBS + 0.05% de Tween, y luego se efectuó la activación de MMP13 mediante el agregado de 35 µl de una solución, 1.5 mM, de acetato de 4-aminofenilmercúrico (APMA, por sus siglas en inglés) (Sigma, A9563), y la incubación a 37°C durante 1 h. Los receptáculos se lavaron nuevamente con PBS + 0.05% de Tween, y se agregaron 35 µl de sustrato MMP13 (Biomol, P-126, OmniMMP sustrato fluorógeno). Después de la incubación durante 24 h a 37°C, se midió la fluorescencia del sustrato convertido en un lector Perkin Elmer Wallac EnVision 2102 Multilabel Reader (excitación de longitud de onda: 320 nm; emisión de longitud de onda: 405 nm).

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

Por ejemplo, cuando se ensayó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor EC<sub>50</sub> de 2242.5 (± 1098,5) nM.

Ejemplo 2.3. Ensayo de proliferación de PBL.

Se estimulan linfocitos de sangre periférica humana (PBL, por sus siglas en inglés) con IL-2, y se mide la proliferación usando un ensayo de incorporación de BrdU. Los PBL se estimulan en primer lugar durante 72 h con PHA (fitohemaglutinina), a fin de inducir el receptor IL-2; a continuación, son privados durante 24 h a fin de detener la proliferación de células, y luego se efectúa la estimulación de IL-2 durante otras 72 h (que incluyen 24 h de marcado BrdU). Las células son preincubadas con compuestos de ensayo 1 h antes del agregado de IL-2. Se cultivan las células en RPMI 1640 que contiene 10% (v/v) FBS.

Ejemplo 2.4. Ensayo de sangre completa (WBA, por sus siglas en inglés).

#### 2.4.1. Protocolo de estimulación de IFNα.

Con el objetivo de predecir la potencia de los compuestos de ensayo para inhibir las vías de señalización dependientes de JAK1 o JAK2 *in vivo*, se desarrolló un modelo fisiológicamente pertinente *in vitro* usando sangre completa humana. En el ensayo de WBA, se trató *ex vivo* la sangre extraída de voluntarios humanos, que habían dado consentimiento informado, con compuesto (1 h), y luego se estimuló o bien durante 30 minutos con interferón α (IFNα, vía dependiente de JAK1), o durante 2 h, con factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF, vía dependiente de JAK2).

#### 2.4.1.1. Ensayo de fosfo – STAT1.

Para la estimulación de IFNα, se midió el incremento en la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 1 (pSTAT1) por INFα en extractos leucocitarios, usando un ensayo ELISA de pSTAT1. La fosforilación de transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) luego del desencadenamiento de interferón alfa (IFN α) es un evento mediado por JAK1. El ensayo de Fosfo-STAT1, que se usó para medir las concentraciones de Fosfo-STAT1 en extractos celulares, se desarrolló de modo de evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir las vías de señalización dependientes de JAK1.

Se trató con compuesto sangre completa humana, extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, *ex vivo* (1 h), y posteriormente, se estimuló durante 30 minutos con IFNα. El aumento en la fosforilación de STAT1 por INF α en extractos leucocitarios se midió usando un ensayo ELISA de fosfo-STAT1.

El regulador de lisis de ACK (quinasa asociada con Cdc42) consistió en NH<sub>4</sub>Cl, 0.15 M; KHCO<sub>3</sub>, 10 mM; EDTA, 0.1 mM. El pH del regulador fue 7.3.

Se diluyó un concentrado de regulador de lisis celular, 10 x (parte del equipo ELISA de intercalación PathScan Phospho-STAT1 (Tyr701) de Cell Signaling) 10 veces, en H<sub>2</sub>O. Se agregaron inhibidores de proteinasa al regulador, antes del uso.

Se disolvieron 20 µg de IFNα en 40 µl de H<sub>2</sub>O de modo de obtener una solución de carga de 500 µg/ml. La solución de carga se almacenó a -20°C.

5 Se preparó una serie de dilución de tres veces del compuesto en DMSO (concentración más alta: 10 mM). A continuación, el compuesto se diluyó adicionalmente en medio (factor de dilución dependiente de la concentración deseada de compuesto final).

#### 2.4.1.1.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con IFNα.

10 Se recogió sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 392 µl. A continuación, se agregaron 4 µl de dilución de compuesto a cada alícuota, y las muestras de sangre se incubaron durante 1 h a 37°C. La solución de carga de IFNα se diluyó 1000 veces en medio RPMI de modo de obtener una solución de trabajo de 500 ng/ml. Se agregaron 4 µl de la solución de trabajo de 500 ng/ml a las muestras de sangre (concentración final de IFNα: 5 ng/ml). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min.

#### 2.4.1.1.2. Preparación de extractos celulares.

15 Al final del período de estimulación, se agregaron 7.6 ml de regulador ACK a las muestras de sangre, a fin de lisar los eritrocitos. Las muestras se mezclaron invirtiendo los tubos cinco veces, y la reacción se incubó en hielo durante 5 min. La lisis de los RBC (eritrocitos) debe ser evidente durante esta incubación. Las células se miniesferizaron mediante la centrifugación a 300 g, 4°C, durante 7 min, y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 10 ml de 1 x PBS a cada tubo, y la miniesfera celular se resuspendió. Las muestras se centrifugaron nuevamente durante 7 min a 300 g, 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y la miniesfera se resuspendió en 500 µl de 1 x PBS. A continuación, la suspensión celular se transfirió a un tubo microcentrífugo limpio de 1.5 ml. Las células se miniesferizaron por medio de la centrifugación a 700 g durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y la miniesfera se disolvió en 150 µl de regulador de lisis celular. Las muestras se incubaron en hielo durante 15 min. A continuación, las muestras se almacenaron a -80°C hasta el posterior procesamiento.

#### 2.4.1.1.3. Medición de la fosforilación de STAT1 por ELISA.

25 Se usó el equipo ELISA de intercalación Pathscan Phospho-STAT1 (Tyr701) Sandwich ELISA de Cell Signaling (Cat. n.º # 7234) para la determinación de las concentraciones de Phospho-STAT1.

30 Los extractos celulares se descongelaron en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 16 000 g, a 4°C, y los lisados aclarados se cosecharon. Mientras tanto, se equilibraron franjas de microrreceptáculo del equipo a temperatura ambiente, y se preparó regulador de lavado mediante la dilución, 20 x, de regulador de lavado en H<sub>2</sub>O. Las muestras se diluyeron dos veces en diluyente de muestra, y se agregaron 100 µl a las franjas de microrreceptáculos. Las franjas se incubaron durante la noche a 4°C.

35 Al día siguiente, los receptáculos se lavaron tres veces con regulador de lavado. Se agregaron 100 µl del anticuerpo de detección a los receptáculos. Las franjas se incubaron a 37°C durante 1 h. A continuación, los receptáculos se lavaron tres veces con regulador de lavado, nuevamente. Se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario ligado a HRP a cada receptáculo, y las muestras se incubaron a 37°C. Después de 30 min, los receptáculos se lavaron tres veces nuevamente, y se agregaron 100 µl de sustrato TMB a todos los receptáculos. Cuando las muestras se tornaron azules, se agregaron 100 µl de solución de detención, a fin de detener la reacción. Se leyó la absorbancia a 450 nm.

#### 2.4.1.2. Análisis de la información.

40 La inhibición de la inducción de fosfoSTAT1 por IFNα en extractos celulares se trazó en comparación con la concentración de compuesto, y se derivaron los valores IC<sub>50</sub> usando el programa informático Graphpad. La información se retuvo si R<sup>2</sup> fue mayor que 0.8 y la inclinación hill slope fue menor que 3.

#### 2.4.1.2. ELISA de IL-8.

45 Para la estimulación de GM-CSF, se midió el aumento en las concentraciones de interleuquina-8 (IL-8) en plasma, usando un ensayo ELISA de IL-8. La expresión de interleuquina-8 (IL-8) inducida por el factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF) es un evento mediado por JAK2. El ensayo ELISA de IL-8, que puede usarse para medir las concentraciones de IL-8 en muestras de plasma, se ha desarrollado a fin de evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir las vías de señalización dependientes de JAK2.

50 Se trató con compuesto sangre humana completa extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, *ex vivo* (1 h), y luego se estimuló durante 2 h con GM-CSF. Se mide el aumento en las concentraciones de IL-8 en plasma usando un ensayo ELISA de IL-8.

Se disuelven 10 µg de GM-CSF en 100 µl de H<sub>2</sub>O de modo de obtener una solución de carga de 100 µg/ml. La solución de carga se almacena a -20°C.

Se prepara una serie de dilución de tres veces del compuesto de ensayo en DMSO (concentración más alta: 10 mM). A continuación, el compuesto se diluye adicionalmente 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.

5 Se recoge sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se divide en alícuotas de 245 µl. A continuación, se agregan 2.5 µl de dilución de compuesto de ensayo a cada alícuota, y las muestras de sangre se incuban durante 1 h a 37°C. La solución de carga de GM-CSF se diluye 100 veces en medio RPMI de modo de obtener una solución de trabajo de 1 µg/ml. Se agregan 2.5 µl de la solución de trabajo de 1 µg/ml a las muestras de sangre (concentración final de GM-CSF: 10 ng/ml). Las muestras se incuban a 37°C durante 2 h.

10 2.4.1.2.2. Preparación de muestras de plasma.

Las muestras se centrifugan durante 15 min a 1000 g, a 4°C. Se cosechan 100 µl del plasma y se almacenan a -80°C hasta el uso posterior.

2.4.1.2.3. Medición de las concentraciones de IL-8 por ELISA.

15 Se usa el equipo de inmunoensayo quimioluminiscente de IL-8 humana de R&D Systems (Cat. n.º Q8000B) a fin de determinar las concentraciones de IL-8.

Se prepara regulador de lavado mediante la dilución, 10 x, de regulador de lavado en H<sub>2</sub>O. Se prepara reactivo Glo de trabajo mediante el agregado de 1 parte de reactivo Glo 1 a 2 partes de Reactivo Glo B, 15 min a 4 h antes del uso.

20 Se agregan 100 µl de diluyente de ensayo RD1-86 a cada receptáculo. A continuación, se agregan 50 µl de muestra (plasma). La placa de ELISA se incuba durante 2 h a temperatura ambiente, a 500 r. p. m. Todos los receptáculos se lavan 4 veces con regulador de lavado, y se agregan 200 µl de conjugado de IL-8 a cada receptáculo. Después de la incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, los receptáculos se lavan 4 veces con regulador de lavado, y se agregan 100 µl de reactivo Glo de trabajo, a cada receptáculo. La placa ELISA se incuba durante 5 min a temperatura ambiente (protegida de la luz). Se mide la luminiscencia (0.5 s/receptáculo, tiempo de lectura).

25 2.4.1.3. Resultados.

Por ejemplo, cuando se sometió a este protocolo, el valor pIC<sub>50</sub> del Compuesto 1 para la inhibición del incremento inducido por INFα de las concentraciones de pSTAT1 fue 6.23 ± 0.15 (SEM). Esto demuestra que el Compuesto ilustrativo 1 inhibe potentemente la vía JAK1 en el entorno fisiológico.

2.4.2. Protocolo de estimulación de IL-6.

30 Además, se efectuó un análisis de citometría de flujo a fin de establecer la selectividad de compuesto de JAK1 sobre JAK2, *ex vivo*, usando sangre completa humana. Por lo tanto, se tomó sangre de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado. La sangre luego se equilibró durante 30 minutos a 37°C con oscilación moderada, y luego se dividió en alícuotas en tubos de Eppendorf. Se agregó el compuesto en diferentes concentraciones, y se incubó a 37°C durante 30 minutos con oscilación moderada; a continuación, se estimuló durante 20 minutos a 37°C,  
35 con oscilación moderada, con interleuquina 6 (IL-6), para la estimulación de la vía dependiente de JAK1, o GM-CSF, para la estimulación de la vía dependiente de JAK2. Luego se evaluaron fosfo-STAT1 y fosfo-STAT5 usando el análisis FACS (sigla en inglés de "clasificación celular activada por fluorescencia").

2.4.2.1. Ensayos de fosfo-STAT1.

40 Para el aumento estimulado por IL-6, de la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 1 (pSTAT1) en leucocitos, se trató sangre completa humana extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, *ex vivo*, con el compuesto durante 30 min, y luego se estimuló durante 20 minutos con IL-6. El incremento en la fosforilación de STAT1 por IL-6 en linfocitos se midió usando anticuerpo antifosfo-STAT1 por FACS.

45 Se diluyó el regulador 5 X Lyse/Fix (BD PhosFlow, Cat. N.º 558049) a 5 veces, con agua destilada, y se preentibió a 37°C. El regulador diluido Lyse/Fix restante se desechó.

Se disolvieron 10 µg de rhIL-6 (R&D Systems, Cat N°206-IL) en 1 ml de PBS, BSA al 0.1%, de modo de obtener una solución de carga de 10 µg/ml. La solución de carga se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

50 Se preparó una serie de diluciones de tres veces del compuesto en DMSO (solución de carga de 10 mM). Las muestras tratadas con control recibieron DMSO en lugar de compuesto. Todas las muestras se incubaron con una concentración final de DMSO del 1%.

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

Se recogió sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 148.5 µl. A continuación, se agregaron 1.5 µl de la dilución de compuesto de ensayo a cada alícuota de sangre, y las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37°C, con oscilación moderada. Se agregó una solución de carga de IL-6 (1.5 µl) a las muestras de sangre (concentración final de 10 ng/ml), y las muestras se incubaron a 37°C durante 20 min, con oscilación moderada.

5

#### 2.4.2.1.2. Preparación de leucocitos y marcado de CD4.

Al final del período de estimulación, se agregaron inmediatamente 3 ml de regulador 1 X preentibado Lyse/Fix, a las muestras de sangre, que se sometieron a torbellino brevemente y se incubaron durante 15 min a 37°C en un baño de agua, a fin de lisar los eritrocitos y fijar los leucocitos; luego se congelaron a -80°C hasta el uso posterior.

10 Para las siguientes etapas, los tubos se descongelaron a 37°C durante aproximadamente 20 minutos, y se centrifugaron durante 5 min a 400 x g a 4°C. La miniesfera celular se lavó con 3 ml de PBS frío, 1 X, y después de la centrifugación, la miniesfera celular se resuspendió en 100 µl de PBS que contenía BSA al 3%. Se agregaron anticuerpo anti-CD4 conjugado con FITC o anticuerpo de isotipo conjugado con FITC de control, y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, en la oscuridad.

#### 15 2.4.2.1.3. Permeabilización celular y marcado con anticuerpo antifosfo-STAT1.

Después del lavado de las células con 1 X PBS, la miniesfera celular se resuspendió en 100 µl de PBS helado, 1 X, y se agregaron 900 µl de metanol helado al 100%. Luego las células se incubaron a 4°C durante 30 min para la permeabilización.

20 Las células permeabilizadas luego se lavaron con PBS, 1 X, que contenía BSA al 3%, y finalmente se resuspendieron en 80 µl de PBX, 1 X, que contenía BSA al 3%.

Se agregaron 20 µl de anticuerpo anti-STAT1 de ratón PE (pY701) o anticuerpo de control de isotipo IgG2aK de ratón PE (BD Biosciences, Cat. N.º 612564 y 559319, respectivamente), y se mezclaron; a continuación, se incubaron durante 30 min a 4°C, en la oscuridad.

25 Las células entonces se lavaron una vez con PBS, 1 X, y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

#### 2.4.2.1.4 Análisis de fluorescencia en FACSCanto II.

Se contaron 50 000 eventos totales, y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT1 luego de la entrada en células CD4+, en la entrada linfocítica. Se analizó la información usando el programa informático FACSDiva, y se calculó el porcentaje de inhibición de la estimulación de IL-6 sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 en células CD4+.

30

#### 2.4.2.2. Ensayo de fosfo-STAT5.

Para el aumento estimulado por GM-CSF de la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 5 (pSTAT5) en leucocitos, se trata sangre completa humana extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, con compuesto, *ex vivo*, durante 30 min, y posteriormente, se estimuló durante 20 minutos con GM-CSF. El aumento en la fosforilación de STAT5 por GM-CSF en monocitos se mide usando un anticuerpo antifosfo-STAT5, por FACS.

35

El regulador 5 X Lyse/Fix (BD PhosFlow, Cat. N.º 558049) se diluye 5 veces con agua destilada, y se precalienta a 37°C. El resto del regulador diluido Lyse/Fix se desecha.

40 Se disuelven 10 µg de rhGM-CSF (AbCys S. A., Cat. N.º P300-03) en 100 µl de PBS, 0.1% de BSA, de modo de obtener una solución de carga de 100 µg/ml. La solución de carga se almacena en alícuotas a -80°C.

Se prepara una serie de diluciones de tres veces del compuesto en DMSO (solución de carga, 10 mM). Las muestras tratadas con control reciben DMSO sin compuesto de ensayo. Todas las muestras se incuban con una concentración final de DMSO del 1%.

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

45 Se recoge sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se divide en alícuotas de 148.5 µl. A continuación, se agregan 1.5 µl de dilución de compuesto a cada alícuota, y las muestras de sangre se incuban durante 30 min a 37°C, con oscilación moderada. Se agrega solución de carga de GM-CSF (1.5 µl) a las muestras de sangre (concentración final de 20 pg/ml), y las muestras se incuban a 37°C durante 20 min, con oscilación moderada.

2.4.2.2.2. Preparación de leucocitos y marcado de CD14.

Al final del período de estimulación, se agregan de inmediato 3 ml de regulador preentibado 1 X Lyse/Fix a las muestras de sangre, que se someten a torbellino brevemente y se incuban durante 15 min a 37°C en un baño de agua, a fin de lisar los eritrocitos y fijar los leucocitos; luego se congelan a -80°C hasta el posterior uso.

- 5 Para las siguientes etapas, los tubos se descongelan a 37°C durante alrededor de 20 minutos, y se centrifugan durante 5 min a 400 x g a 4°C. La miniesfera de células se lava con 3 ml de PBS frío, 1 X, y luego de la centrifugación, la miniesfera de células se resuspende en 100 µl de PBS que contiene 3% de BSA. Se agregan anticuerpo anti-CD14 de ratón FITC (BD Biosciences, Cat. N.º 345784) o anticuerpo de isotipo IgG2bK de ratón FITC de control (BD Biosciences, Cat. N.º 555057), y se incuban durante 20 min a temperatura ambiente, en la oscuridad.

2.4.2.2.3. Permeabilización celular y marcado con anticuerpo antifosfo-STAT5.

Después del lavado de las células con 1 X PBS, la miniesfera de células se resuspende en 100 µl de PBS helado 1 X, y se agregan 900 µl de metanol helado al 100%. Luego las células se incuban a 4°C durante 30 min, para la permeabilización.

- 15 Las células permeabilizadas entonces se lavan con 1 X PBS que contiene BSA al 3%, y finalmente, se resuspenden en 80 µl de 1 X PBX que contiene BSA al 3%.

Se agregan 20 µl de anticuerpo anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o anticuerpo de control de isotipo IgG1K de ratón PE (BD Biosciences, Cat. N.º 612567 y 554680, respectivamente), se mezclan y luego se incuban durante 30 min a 4°C, en la oscuridad.

- 20 Las células entonces se lavan una vez con 1 X PBS y se analizan en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

2.4.2.2.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II.

Se cuentan 50 000 eventos totales, y se miden las células positivas para fosfo-STAT5 luego de la entrada en células CD14+. La información se analiza usando el programa informático FACSDiva, y corresponde al porcentaje de inhibición de la estimulación de GM-CSF, calculado sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT5 en células CD14+.

- 25

2.4.2.2. Resultados.

Al someter a este protocolo, se determinó el porcentaje de inhibición (PIN) obtenido a partir de la media de 3 voluntarios sanos, para cada compuesto de ensayo. Por ejemplo, se ensayó el Compuesto ilustrativo 1, y devolvió un valor de  $pIC_{50} = 6.08$  en la inhibición de la fosforilación de STAT1.

- 30

Ejemplo 3. Modelos *in vivo*.Ejemplo 3.1 Modelo CIA.3.1.1. Materiales.

Se obtuvieron coadyuvante de Freund completo (CFA) y coadyuvante de Freund incompleto (IFA) de Difco. Se obtuvieron colágeno bovino tipo II (CII), lipopolisacárido (LPS) y Enbrel de 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. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado reactivo, y todos los solventes fueron de grado analítico.

- 35

3.1.2. Animales.

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

- 40

3.1.3. Artritis inducida por colágeno (CIA, por sus siglas en inglés).

Un día antes del experimento, se preparó solución de CII (2 mg/ml) con ácido acético, 0.05 M, y se almacenó a 4°C. Justo antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes equivalentes de coadyuvante (IFA) y CII con un homogeneizador, en una botella de vidrio previamente enfriada en un baño de agua helada. Pueden ser necesarias una cantidad adicional de coadyuvante y una homogeneización prolongada, en caso de no formarse una emulsión. Se inyectaron 0.2 ml de la emulsión por vía intradérmica en la base de la cola de cada rata, el día 1; se realizó una segunda inyección intradérmica de refuerzo (solución de CII en una concentración de 2 mg/ml en CFA, 0.1 ml

- 45

solución salina), el día 9. Este método de inmunización fue modificado a partir de los métodos publicados (Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005).

#### 3.1.4. Diseño del estudio.

5 Los efectos terapéuticos de los compuestos se ensayaron en el modelo de rata CIA. Las ratas se dividieron en forma aleatoria en grupos iguales, donde cada grupo contenía 10 ratas. Todas las ratas se inmunizaron el día 1 y se reforzaron 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 semana, s. c.). Un compuesto de interés típicamente se ensayó en tres dosis, por ejemplo, 3, 10, 30 mg/kg, p. o.

#### 3.1.5. Evaluación clínica de la artritis.

10 La artritis se clasifica de acuerdo con el método de Khachigian 2006, Lin *et al.*, 2007, y Nishida *et al.*, 2004). La hinchazón de cada una de las cuatro garras se clasifica con el puntaje artrítico de la siguiente manera: 0: sin síntomas; 1: leve, aunque enrojecimiento e hinchazón definidos de un tipo de articulación, tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dedos individuales, sin consideración del número de dedos afectados; 2: moderado enrojecimiento e hinchazón de dos o más tipos de articulaciones; 3: enrojecimiento e hinchazón graves de la garra entera, que incluye los dedos; 4: máxima inflamación de la extremidad, con afectación de múltiples articulaciones (máximo puntaje de artritis clínica acumulativo de 16 por animal) (Nishida *et al.*, 2004).

A fin de permitir el meta análisis de múltiples estudios, los valores de puntajes clínicos se normalizaron de la siguiente manera:

20 *AUC de puntaje clínico (puntaje AUC)*: Se calculó el área bajo la curva (AUC) del día 1 al día 14 para cada rata individual. El AUC de cada animal se dividió por el AUC promedio obtenido para el vehículo en el estudio del cual se obtuvo la información en dicho animal, y se multiplicó por 100 (es decir, el AUC se expresó como un porcentaje del AUC de vehículo promedio por estudio).

25 *Aumento de puntaje clínico del día 1 al día 14 (Puntaje de criterio de valoración)*: La diferencia de puntaje clínico para cada animal se dividió por la diferencia de puntaje clínico promedio obtenida para el vehículo en el estudio del cual se obtuvo la información de dicho animal, y se multiplicó por 100 (es decir, la diferencia se expresó como un porcentaje de la diferencia de puntaje clínico promedio para el vehículo por estudio).

#### 3.1.6. Cambio en el peso corporal (%) luego del inicio de la artritis.

30 Clínicamente, el descenso de peso corporal se asocia con la artritis (Shelton *et al.*, 2005; Argiles *et al.*, 1998; Rall, 2004; Walsmith *et al.*, 2004). En consecuencia, los cambios en el peso corporal luego del inicio de la artritis pueden usarse como un criterio de valoración no específico a fin de evaluar el efecto de los agentes terapéuticos en el modelo de rata. El cambio en el peso corporal (%) luego del inicio de la artritis se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Ratones} &: \frac{\text{Peso corporal}_{(\text{semana } 6)} - \text{Peso corporal}_{(\text{semana } 5)}}{\text{Peso corporal}_{(\text{semana } 5)}} \times 100\% \\ \text{Ratas} &: \frac{\text{Peso corporal}_{(\text{semana } 4)} - \text{Peso corporal}_{(\text{semana } 3)}}{\text{Peso corporal}_{(\text{semana } 3)}} \times 100\% \end{aligned}$$

#### 3.1.7. Radiología.

35 Se tomaron fotos de rayos X de las garras traseras de cada animal individual. Se asignó un número de identidad aleatorio ciego a cada una de las fotos, y la gravedad de la erosión ósea fue clasificada por dos clasificadores independientes con el sistema de puntaje radiológico de Larsen, de la siguiente manera: 0: normal, con contornos óseos intactos y espacio articular normal; 1: leve anomalía, donde cualesquiera uno o dos de los huesos metatarsianos exteriores muestran leve erosión ósea; 2: anomalía temprana definida donde cualesquiera tres a 40 cinco de los huesos metatarsianos exteriores muestran erosión ósea; 3: anomalía destructiva media, donde todos los huesos metatarsianos exteriores, al igual que cualesquiera uno o dos de los huesos metatarsianos interiores muestran erosiones óseas definidas; 4: anomalía destructiva grave, donde todos los huesos metatarsianos muestran erosión ósea definida, y por lo menos una de las articulaciones metatarsianas interiores está completamente erosionada, dejando algunos contornos articulares óseos preservados; 5: anomalía mutilante sin 45 contornos óseos. Este sistema de clasificación es una modificación de aquella de Salvemini *et al.*, 2001; Bush *et al.*, 2002; Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005.

### 3.1.8. Histología.

Después del análisis radiológico, las garras traseras de los ratones se fijaron en formalina regulada con fosfato al 10% (pH 7.4), se descalcificaron con descalcificante óseo rápido para la histología fina (Laboratories Eurobio) y se embutieron en parafina. Con el fin de garantizar la evaluación extensa de las articulaciones artríticas, se cortaron por lo menos cuatro secciones seriales (5 µm de espesor), y cada serie de secciones tenía 100 µm, entre una y otra. Las secciones se mancharon con hematoxilina y eosina (H&E). Las exámenes histológicos para establecer la inflamación sinovial y el daño óseo y de cartílago se efectuaron a doble ciego. En cada garra, se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron la infiltración celular; la gravedad del paño sinovial; la erosión de cartílago; y la erosión ósea. La clasificación se efectuó de la siguiente manera: 1: normal; 2: leve; 3: moderado; 4: notable. Estos cuatro puntajes se suman, y se representan como un puntaje adicional, es decir, el "puntaje total de AR".

### 3.1.9. Análisis de tomografía microcomputada (µCT) de calcáneo(hueso del talón).

La degradación ósea observada en AR se produce especialmente en el hueso cortical, y puede ser revelada por el análisis de µCT (Sims NA *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 50 (2004) 2338–2346: "Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis"; 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"). Luego de la toma de imágenes y de la reconstrucción de volumen tridimensional del hueso calcáneo, se mide la degradación ósea como la cantidad de objetos separados presentes por diapositiva, aislados *in silico* perpendiculares al eje longitudinal del hueso. Cuanto mayor es la cantidad de hueso degradada, más objetos separados se miden. Se analizan 1000 tajadas, distribuidas en forma pareja a lo largo del calcáneo (espaciadas por aproximadamente 10.8 µm).

### 3.1.10. PK de equilibrio.

El día 7 u 11, se recogieron muestras de sangre en el seno retroorbital, con heparina de litio como anticoagulante, en los siguientes tiempos: predosis, 1, 3 y 6 horas. Las muestras de sangre completa se centrifugaron, y las muestras de plasma resultantes se almacenaron a -20°C para el análisis pendiente. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de ensayo por medio de un método de LC-MS/MS, en el cual el espectrómetro de masa se operó en modo de electropulverización positivo. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando Winnonlin® (Pharsight®, Estados Unidos), y se asumió que las concentraciones plasmáticas de predosis eran iguales a las concentraciones plasmáticas de 24 horas.

La Tabla V expuesta a continuación resume los resultados obtenidos para varios parámetros PK, para el compuesto de la invención y un ejemplo comparativo, lo que ilustra las mejores propiedades de PK (por ejemplo, C<sub>max</sub>, T<sub>1/2</sub>) del compuesto de la invención.

Tabla V

		Compuesto ilustrativo 1						Compuesto comparativo 2	
		PO (mg/kg/día)						PO (mg/kg/día)	
		0.1	0.3	1	3	10	30	10	30
C <sub>máx</sub>	(ng/ml)	5.18	19.3	102	363	1.167	3.805	867	2630
T <sub>máx</sub>	(h)	3	1	1	1	1	1	1	1
AUC(0–24h)	(ng.h/ml)	30	163	931	1.932	7.172	27.767	2019	7809
T <sub>1/2</sub>	(h)	NC	NC	3.6	5.6	4.5	3.9	1.17	3.36

### 3.1.11. Resultados.

La Tabla VI a continuación resume los resultados obtenidos para el Compuesto ilustrativo 1 y el Compuesto comparativo 2 en el modelo de rata CIA; un "\*" indica que hubo una mejoría estadísticamente significativa en el puntaje, p 0.05 en comparación con el control sin tratar.

Tabla VI

Compuesto	Dosis (mg/kg/día)	Evaluación clínica <sup>§</sup>		Hinchazón de garra	Puntaje de Larsen
		Puntaje criterio de valoración	Puntaje AUC		
Compuesto ilustrativo 1	0.1	*	*		
	0.3	*	*	*	
	1	*	*	*	
	3	*	*	*	*
Compuesto comparativo 2	10	*			
	30	*		*	*

§ – “Puntaje clínico” se refiere al puntaje AUC normalizado/puntaje de criterio de valoración normalizado obtenido para el Compuesto 1, y el puntaje de AUC/puntaje de criterio de valoración para el Compuesto 2.

- 5 El Compuesto ilustrativo 1 exhibió mejorías estadísticamente significativas en los valores de puntaje clínico normalizado (calculados como AUC o como la diferencia del día 1 al día 14), en una dosis de 0.1 mg/kg. Además, se observó un incremento estadísticamente significativo en la lectura de hinchazón de garra y en el puntaje de Larsen con las dosis de 0.3 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente. En contraste, el Compuesto comparativo 2 exhibió mejorías estadísticamente significativas solo en los valores de puntaje clínico normalizado (el día 14), con una dosis de 10 mg/kg. Asimismo, se observó un incremento estadísticamente significativo en la lectura de hinchazón de garra y en el puntaje de Larsen con las dosis de 30 mg/kg. Por lo tanto, el Compuesto ilustrativo 1 muestra una mejoría de 100 veces en la eficacia, en comparación con el Compuesto comparativo 2, cuando se comparan las dosis orales. En particular, con una dosis de 3 mg/kg para el Compuesto ilustrativo 1, se observaron mejorías estadísticamente significativas en todas las mediciones; sin embargo, una dosis mayor de Compuesto comparativo 2 logró solo una mejoría estadísticamente significativa en el puntaje clínico. Esta mejoría en la potencia *in vivo* no puede ser atribuida a la mayor exposición del compuesto, ya que puede observarse que la AUC(0–24h) es menor para el Compuesto ilustrativo 1 en las dosis de 0.1, 0.3 y 1 mg/kg/día, en comparación con el Compuesto comparativo 2 en la dosis de 10 mg/kg/día.

#### Ejemplo 3.2. Modelo de choque septicémico.

- 20 La inyección de lipopolisacárido (LPS, por sus siglas en inglés) induce una rápida liberación de factor de necrosis tumoral soluble (TNF-alfa) en la periferia. Este modelo se usó para analizar los probables bloqueadores de la liberación de TNF *in vivo*.

25 Se trataron seis ratones hembra BALB/cJ (20 g) por grupo, con la dosis propuesta, una vez, po. Treinta minutos más tarde, se inyectó LPS (15 µg/kg; *E. Coli* serotipo 0111:B4) ip. Después de 90 minutos, los ratones se sometieron a la eutanasia y se recogió la sangre. Se determinaron las concentraciones de TNF alfa en circulación usando equipos comerciales de ELISA. Se utilizó dexametasona (5 µg/kg) como un compuesto antiinflamatorio de referencia. Se ensayaron los compuestos seleccionados en una o múltiples dosis, por ejemplo, 3; 10 ó 30 mg/kg, po.

El Compuesto ilustrativo 1 y los Compuestos comparativos 2 y 10 fueron activos en una dosis de 30 mg/kg, po.

#### Ejemplo 3.3. Modelo MAB.

- 30 El modelo MAB permite una rápida evaluación de la modulación de una respuesta inflamatoria de tipo AR por agentes terapéuticos (Kachigian L. M., *Nature Protocols* (2006), 2512–2516: “Collagen antibody-induced arthritis”). Se inyecta, i. v., a ratones DBA/J un cóctel de mAb dirigidos contra colágeno II. Un día después, se inicia el tratamiento con compuesto (vehículo: 10% (v/v) HPβCD). Después de tres días, los ratones reciben una inyección de LPS, i. p. (50 µg/ratón), que logra un rápido inicio de la inflamación. El tratamiento con compuesto continúa hasta 10 días luego de la inyección de mAb. Se lee la inflamación por medio de la medición de la hinchazón de garra, y el registro del puntaje clínico de cada garra. Se presenta el puntaje artrítico clínico acumulativo de cuatro extremidades a fin de mostrar la gravedad de la inflamación. Se aplica un sistema de puntaje a cada extremidad usando una escala de 0–4, donde 4 es la inflamación más grave.

0 Libre de síntomas

- 1 Leve, aunque enrojecimiento e hinchazón definidos de un tipo de articulación, tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dedos individuales, sin consideración del número de dedos afectados
- 2 Enrojecimiento e hinchazón moderados de dos o más tipos de articulaciones
- 3 Enrojecimiento e hinchazón graves de la garra entera, que incluye los dedos
- 4 Inflamación máxima de la extremidad, con afectación de múltiples articulaciones

Ejemplo 3.4. Modelos oncológicos.

5 Los modelos *in vivo* para la validación de la eficacia de moléculas pequeñas hacia enfermedades mieloproliferativas inducidas por JAK2 son descritos por Wernig *et al.*, *Cancer Cell*, 13, 311, 2008, y Geron *et al.*, *Cancer Cell*, 13, 321, 2008.

Ejemplo 3.5. Modelo de EII (enfermedad intestinal inflamatoria) del ratón.

Los modelos *in vitro* e *in vivo* para la validación de la eficacia de moléculas pequeñas hacia la EII son descritos por Wirtz *et al.* 2007.

Ejemplo 3.6. Modelo de asma del ratón.

10 Los modelos *in vitro* e *in vivo* para la validación de la eficacia de moléculas pequeñas hacia asma son descritos por Nials *et al.*, 2008; Ip *et al.*, 2006; Pernis *et al.*, 2002; Kudlacz *et al.*, 2008.

Ejemplo 4: Farmacocinética, DMPK (sigla en inglés de “metabolismo de fármacos y farmacocinética”) y ensayos de toxicidad

Ejemplo 4.1. Solubilidad termodinámica.

15 Se prepara una solución de 1 mg/ml del compuesto de ensayo en un regulador de fosfato, 0.2 M, pH 7.4, o un regulador de citrato, 0.1 M, pH 3.0, a temperatura ambiente en un vial de vidrio.

Las muestras se hacen rotar en un instrumento Rotator drive STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) a una velocidad de 3.0, a temperatura ambiente durante 24 h.

20 Después de 24 h, se transfieren 800 µl de la muestra a un tubo Eppendorf y se centrifugan 5 min a 14 000 r. p. m. Luego se transfieren 200 µl del sobrenadante de la muestra a una placa de solubilidad MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50), y se filtra el sobrenadante (10–12" Hg) con la ayuda de un colector al vacío, hacia una placa limpia Greiner de polipropileno, de fondo V, de 96 receptáculos (Cat. N.º 651201). Se diluyen 5 µl del producto filtrado en 95 µl (F20) del mismo regulador utilizado para la incubación en la placa que contiene la curva estándar (Greiner, Cat. N.º 651201).

25 Se prepara la curva estándar nuevamente para el compuesto en DMSO, iniciando a partir de una solución de carga de DMSO, 10 mM, diluida, factor 2, en DMSO (5000 µM), y luego diluida adicionalmente en DMSO hasta 19.5 µM. Luego se transfieren 3 µl de la serie de dilución a partir de 5000 µM, a una mezcla de 97 µl de acetonitrilo–regulador (50/50). El rango de concentración final fue de 2.5 a 150 µM.

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

35 Las muestras se analizan en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El solvente A consiste en amoníaco, 15 mM, y el solvente B es acetonitrilo. La muestra se ejecuta en pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3.5 µM (2.1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de solvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 minutos, y varía de 5% B a 95% B.

Se analizan las áreas pico con la ayuda del paquete de programas informáticos Masslynx, y se trazan las áreas pico de las muestras contra la curva estándar, a fin de obtener la solubilidad del compuesto.

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

Ejemplo 4.2. Solubilidad acuosa.

Iniciando a partir de una carga de 10 mM en DMSO, se preparó una dilución serial del compuesto en DMSO. La serie de dilución se transfirió a una placa 96 NUNC Maxisorb de fondo F (Cat. N.º 442404), y se agregó regulador de fosfato, 0.2 M, pH 7.4, o regulador de citrato, 0.1 M, pH 3.0, a temperatura ambiente.

- 5 La concentración final varió de 200 µM a 2.5 µM en 5 etapas de dilución iguales. La concentración final de DMSO no excedió el 2%. Se agregó pireno, 200 µM, a los rincones de cada placa de 96 receptáculos, que sirvió como un punto de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

10 Las placas de ensayo se sellaron y se incubaron durante 1 h a 37°C, mientras se agitaba a 230 r. p. m. A continuación, las placas se exploraron en un microscopio de luz blanca, a fin de obtener imágenes individuales del precipitado por concentración. Se analizó el precipitado y se convirtió en un número, que se trazó en un gráfico. La primera concentración en la cual el compuesto aparece disuelto por completo es la concentración informada a continuación; sin embargo, la concentración verdadera se encuentra en algún punto entre esta concentración y una etapa de dilución más alta.

Los valores de solubilidad se expresan en µg/ml.

15 Tabla VII

Compuesto #	pH 3.0 (µg/ml)	pH 7.4 (µg/ml)
Compuesto ilustrativo 1	>85	>85
Compuesto comparativo 2	>38	>38
Compuesto comparativo 10	>87.9	>87.9

Ejemplo 4.3. Unión de proteína plasmática (diálisis de equilibrio).

20 Una solución de carga, 10 mM, del compuesto en DMSO se diluyó con un factor 5 en DMSO. Esta solución se diluyó adicionalmente en plasma de perro, ratón, rata o humano recién descongelado, (BioReclamation INC), con una concentración final de 10 µM y una concentración final de DMSO de 0.5% (5.5 µl en 1094.5 µl de plasma en una placa de 96 receptáculos PP–Masterblock (Greiner, Cat. N.º 780285)).

25 Se preparó una placa Pierce Red Device con inserciones (ThermoScientific, Cat n.º 89809) y se llenó con 750 µl de PBS en la cámara de regulador y 500 µl del plasma espigado, en la cámara de plasma. La placa se incubó durante 4 h a 37°C, mientras se agitaba a 230 r. p. m. Después de la incubación, se transfirieron 120 µl de ambas cámaras a 360 µl de acetonitrilo en una placa de 96 receptáculos de base redonda, de receptáculos profundos PP (Nunc, Cat. N.º 278743), que se selló con una tapa de papel aluminio. Las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 min. Esta placa luego se centrifugó 30 min a 1200 r. c. f. a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 receptáculos de fondo v PP (Greiner, 651201), para el análisis en LCMS.

30 La placa se selló con esterillas de sellado (MA96RD–04S) de www.kinesis.co.uk, y las muestras se midieron a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525, de Waters), en condiciones optimizadas, empleando Quanoptimize a fin de determinar la masa apropiada de la molécula.

35 Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El solvente A consistió en amoníaco, 15 mM, y el solvente B fue acetonitrilo. La muestra se ejecutó en pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3.5 µM (2.1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de solvente tuvo un tiempo de ejecución total de 2 minutos, y varió de 5% B a 95% B.

El área pico del compuesto en la cámara de regulador y la cámara de plasma se consideró 100% compuesto. El porcentaje ligado a plasma se derivó a partir de estos resultados, y se informó como porcentaje ligado a plasma.

La solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en PBS se examinó por medio de un microscopio, de modo de indicar si se observa precipitación.

40 Tabla VIII

Compuesto #	Humano (%)	Rata (%)
Compuesto ilustrativo 1	76.4	65.7
Compuesto comparativo 2	70.5	64.5

Compuesto comparativo 10	n/a	51
Compuesto comparativo 11	91.25	76.5

#### Ejemplo 4.4. Estabilidad microsómica.

Una solución de carga, 10 mM, de compuesto en DMSO se diluyó 1000 veces en un regulador de fosfato, 182 mM, pH 7.4, en una placa de 96 receptáculos profundos (Greiner, Cat. N.º780285), y se preincubó a 37°C.

- 5 Se agregaron 40 µl de agua desionizada a un receptáculo de un tubo de almacenamiento marcado con código de barras bidimensional Matrix 2D de polipropileno, que se preincubó a 37°C.

Se preparó una solución de carga de trabajo de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) en regulador de fosfato, 182 mM, pH 7.4, y se colocó en hielo antes del uso. Se preparó un cofactor que contenía MgCl<sub>2</sub>, glucosa-6-fosfato y NADP<sup>+</sup> en agua desionizada, y se colocó en hielo antes del uso.

- 10 Se preparó una solución de trabajo final que contenía microsomas hepáticos (Xenotech) de una especie de interés (humana, ratón, rata, perro), G6PDH previamente descrito y cofactores, y esta mezcla se incubó durante no más de 20 minutos a temperatura ambiente.

- 15 Se agregaron 30 µl de la dilución de compuesto precalentada a 40 µl de agua precalentada en los tubos Matrix, y se agregaron 30 µl de la mezcla microsómica. Las concentraciones de reacción finales fueron 3 µM de compuesto, 1 mg de microsomas, 0.4 U/ml de G6PDH, MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM; glucosa-6-fosfato, 3.3 mM; y NADP<sup>+</sup>, 1.3 mM.

A fin de medir el porcentaje restante de compuesto en tiempo cero, se agregó MeOH o ACN (1:1) al receptáculo, antes del agregado de la mezcla microsómica. Las placas se sellaron con sellos Matrix Sepra seals<sup>TM</sup> (Matrix, Cat. N.º4464) y se sacudieron durante algunos segundos, a fin de garantizar la mezcla completa de todos los componentes.

- 20 Las muestras que no se detuvieron se incubaron a 37°C, 300 r. p.m., y luego de 1 hora de incubación, la reacción se detuvo con MeOH o ACN (1:1).

Después de detener la reacción, las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 min, a fin de precipitar las proteínas. Las placas entonces se centrifugaron 30 min a 1200 r. c. f. a 4°C, y se transfirió el sobrenadante a una placa de fondo v de 96 receptáculos PP (Greiner, 651201) para el análisis en LCMS.

- 25 Estas placas se sellaron con esterillas de sellado (MA96RD-04S) de www.kinesis.co.uk, y las muestras se midieron a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525, de Waters) en condiciones optimizadas usando Quanoptimize a fin de determinar la masa apropiada de la molécula original.

- 30 Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El solvente A consistió en amoníaco, 15 mM, y el solvente B fue metanol o acetonitrilo, de acuerdo con la solución de detención utilizada. Las muestras se ejecutaron en pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3.5 µm (2.1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de solvente tuvo un tiempo de ejecución total de 2 minutos, y varió de 5% B a 95% B.

- 35 El área pico del compuesto original en tiempo 0 se consideró 100% restante. El porcentaje restante luego de 1 h de incubación se calculó a partir del tiempo 0, y se calculó como el porcentaje restante. La solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en regulador se examinó por medio de un microscopio, y se informan los resultados.

La información sobre la estabilidad microsómica se expresa como porcentaje de la cantidad total de compuesto restante luego de 60 min.

Tabla IX

Compuesto #	Humano (%)	Rata (%)
Compuesto ilustrativo 1	87.2	65.6
Compuesto comparativo 2	73	38
Compuesto comparativo 10	102	89
Compuesto comparativo 11	51	26

Ejemplo 4.5. Permeabilidad de Caco2.

Se efectuaron ensayos bidireccionales de Caco-2 como se describe a continuación. Se obtuvieron receptáculos Caco-2 de la Colección Europea de Cultivos Celulares (European Collection of Cell Cultures (ECACC, cat. 86010202) y se usaron luego de un cultivo de células de 21 días en placas de 24 receptáculos Transwell (Fisher TKT-545-020B).

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/receptáculo en medio de placa, que consistía en DMEM + GlutaMAXI + 1% NEAA + 10% FBS (FetalClone II) + 1% Pen/Estrep. El medio se cambió cada 2-3 días.

Se prepararon compuestos de ensayo y de referencia (propranolol y rodamina 123, o vinblastina, todos obtenidos de Sigma) en solución salina balanceada de Hanks que contenía HEPES, 25 mM (pH 7.4), y se agregaron o bien a las cámaras apicales (125 µl) o basolaterales (600 µl) del montaje de la placa Transwell en una concentración de 10 µM, con una concentración final de DMSO de 0.25%.

Se agregaron 50 µM de amarillo Lucifer Yellow (Sigma) al regulador donante, en todos los receptáculos, a fin de evaluar la integridad de los estratos celulares mediante el control de la penetración de amarillo Lucifer Yellow. Debido a que Lucifer Yellow (LY) no puede penetrar libremente las barreras lipófilas, un alto grado de transporte LY indica escasa integridad del estrato celular.

Después de 1 h de incubación a 37°C con agitación en una agitadora orbital a 150 r. p. m., se tomaron alícuotas de 70 µl tanto de las cámaras apicales (A) como basales (B), y se agregaron a 100 µl de solución 50:50 de acetonitrilo:agua que contenía estándar interno analítico (carbamazepina, 0.5 µM), en una placa de 96 receptáculos.

Se midió el amarillo Lucifer con un instrumento Spectramax Gemini XS (Ex. 426 nm, y Em. 538 nm) en una placa limpia de 96 receptáculos que contenía 150 µl de líquido de lateral basolateral y apical.

Se midieron las concentraciones de compuesto en las muestras por medio de la cromatografía líquida de alto rendimiento/espectroscopia de masa (LC-MS/MS).

Los valores de permeabilidad aparente ( $P_{ap}$ ) se calcularon a partir de la relación:

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

V = volumen de cámara.

$T_{\text{inc}}$  = tiempo de incubación.

Área de superficie = 0.33 cm<sup>2</sup>.

Las relaciones de Salida, como indicación de la salida activa desde la superficie celular apical, se calcularon usando la relación de  $P_{ap} B/A / P_{ap} A/B$ .

Se usaron los siguientes criterios de aceptación del ensayo:

Propranolol:  $P_{ap} (A>B)$  valor  $\geq 20$  ( $\times 10^{-6}$  cm/s).

Rodamina 123 o Vinblastina:  $P_{ap} (A>B)$  valor  $< 5$  ( $\times 10^{-6}$  cm/s) con relación de Salida  $\geq 5$ .

Permeabilidad de amarillo Lucifer:  $\leq 100$  nm/s.

Tabla X

Compuesto #	$P_{ap} A>B$ ( $\times 10^{-6}$ cm/seg)	Relación de salida
Compuesto ilustrativo 1	3.33	15.7
Compuesto comparativo 2	25	0.95
Compuesto comparativo 10	0.05	97.6
Compuesto comparativo 11	36.5	0.9

Ejemplo 4.6. Estudio de farmacocinética en roedores.

4.6.1. Animales.

5 Se obtuvieron ratas Sprague–Dawley (macho, 5–6 semanas de edad) de Janvier (Francia). Las ratas se aclimataron durante por lo menos 7 días antes del tratamiento, y se mantuvieron con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (07:00 – 19:00). La temperatura se mantuvo a aproximadamente 22°C, y se proporcionaron alimentos y agua *ad libitum*. Dos días antes de la administración del Compuesto ilustrativo 1 y el Compuesto comparativo 2, las ratas se sometieron a la cirugía a fin de colocar un catéter en la vena yugular, bajo anestesia de isoflurano. Después de la cirugía, las ratas se albergaron en forma individual. Las ratas fueron privadas de alimentos durante por lo menos 16 horas antes de la dosificación oral, y 6 horas después. Se proporcionó agua *ad libitum*.

10 4.6.2. Estudio de farmacocinética.

15 Se formularon los compuestos en PEG200/solución salina fisiológica (60/40) para la vía intravenosa, y en metilcelulosa al 0.5% (Compuesto ilustrativo 1 y Compuesto comparativo 2) e hidroxilpropil–β–ciclodextrina al 10%, pH 3 (Compuesto comparativo 11), para la vía oral. Los compuestos de ensayo se dosificaron por vía oral como una sola sonda esofágica, en una concentración de 5 mg/kg, con un volumen de dosificación de 5 ml/kg, y se dosificaron por vía intravenosa como un bolo por medio de la vena cava en una concentración de 1 mg/kg, con un volumen de dosificación de 5 ml/kg. Cada grupo consistió en tres ratas. Para los compuestos 1 y 2, se recogieron muestras de sangre por medio de la vena yugular con heparina de litio como anticoagulante, en los siguientes tiempos: 0.05; 0.25; 0.5; 1; 3; 5 y 8 horas (vía intravenosa), y 0.25; 0.5; 1; 3; 5; 8 y 24 horas (vía oral). Para el Compuesto comparativo 11, se recogieron muestras de sangre en el seno retroorbital con heparina de litio como anticoagulante, en los siguientes tiempos: 0,25; 1; 3 y 6 horas (vía oral). Se centrifugaron muestras de sangre completa a 5000 r. p. m. durante 10 min, y las muestras de plasma resultantes se almacenaron a –20°C para el análisis pendiente.

4.6.3. Cuantificación de las concentraciones de compuesto en plasma.

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de ensayo por medio de un método de LC–MS/MS, en el cual el espectrómetro de masa se operó en modo de electropulverización positivo.

25 4.6.4. Determinación de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando Winnonlin® (Pharsight®, United States).

Tabla XI

	Compuesto ilustrativo 1		Compuesto comparativo 2		Compuesto comparativo 11
	IV 1 mg/kg (n = 3)	PO 5 mg/kg (n = 3)	IV 1 mg/kg (n = 3)	PO 5 mg/kg (n = 3)	PO 5 mg/kg (n = 3)
C0 o C <sub>máx</sub> (ng/ml)	1407 (28)	310 (33)	863(4)	1320 (42)	547 (8)
T <sub>máx</sub> (h)		2.2 [0.5–5]		0.33 [0.25–0.5]	0.25 [0.25–0.25]
AUC(0–z) (ng.h/ml)	722 (2)	1429 (24)	470 (5)	1437 (33)	690 (23)
AUC (0–24 h) (ng.h/ml)	739 (2)	1681 (8)	474 (5)	1465 (30)	
Cl	1.35 (2)		2.12 (5)		
V <sub>ss</sub>	1.76 (3)		1.46 (4)		
T <sub>1/2</sub>	1.6 (3)		0.74 (8)	0.92 (57)	0.92 (7)
F (%)	45		62		

Ejemplo 4.7. Estudio de toxicidad de la rata de 7 días.

30 Se efectúa un estudio de toxicidad oral de 7 días con los compuestos de ensayo en ratas macho Sprague–Dawley, a fin de evaluar su potencial tóxico y la toxicocinética con dosis diarias de 100, 300 y 500 mg/kg/día, por medio de una sonda nasogástrica, con un volumen de dosificación constante de 5 ml/kg/día.

Los compuestos de ensayo se formulan en HPβCD al 30% (v/v) en agua purificada. Cada grupo incluye 5 ratas macho principales, al igual que 3 animales satélite, para la toxicocinética. Se suministra a un cuarto grupo HPβCD al 30% (v/v) en agua solamente, a la misma frecuencia, volumen de dosificación y por la misma vía de administración, que funciona como el grupo de control de vehículo.

- 5 La meta del estudio consiste en determinar la menor dosis que no provoca eventos adversos identificados (concentración de efecto adverso no observable – NOAEL, por sus siglas en inglés).

Ejemplo 4.8. Estabilidad de hepatocitos.

Los modelos para la evaluación del aclaramiento metabólico en hepatocitos son descritos por McGinnity *et al.*, *Drug Metabolism and Disposition*, 2008, 32, 11, 1247.

- 10 Ejemplo 4.9. Sensibilidad de la prolongación QT.

Se evaluó el potencial para la prolongación QT en el ensayo de pinzamiento de parche de hERG.

Pinzamiento zonal de célula entera convencional.

- 15 Se efectuaron registros de pinzamiento zonal de célula entera usando un amplificador EPC10 controlado por el programa informático Pulse v8.77 (HEKA). La resistencia de serie típicamente fue inferior a 10 MΩ y fue compensada más del 60%, los registros no fueron sustraídos por filtración. Los electrodos se fabricaron a partir de vidrio de pipeta GC150TF (Harvard).

La solución de baño externo contenía: NaCl, 135 mM; KCl, 5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM; glucosa, 5 mM; HEPES, 10 mM; pH 7.4.

- 20 La solución de pipeta de parche interno contenía: Kgluconato, 100 mM; KCl, 20 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; Na<sub>2</sub>ATP, 5 mM; glutatona, 2 mM; EGTA, 11 mM; HEPES, 10 mM; pH 7.2.

Los fármacos se perfundieron usando un sistema de perfusión rápido Biologic MEV–9/EVH–9.

- 25 Todos los registros se efectuaron en células HEK293 que expresaban en forma estable canales hERG. Las células se cultivaron en cubiertas de portaobjetos redondas de 12 mm (German glass, Bellco) ancladas en la cámara de registro usando dos varillas de platino (Goodfellow). Se provocaron corrientes de hERG usando un pulso de activación a +40 mV durante 1000 ms, seguido de un pulso de corriente de cola a –50 mV durante 2000 ms, donde el potencial de mantenimiento fue –80 mV. Los pulsos se aplicaron cada 20 s, y todos los experimentos se efectuaron a temperatura ambiente.

Resultados.

- 30 Por ejemplo, cuando se efectúa este ensayo, el valor de IC<sub>50</sub> medido del Compuesto ilustrativo 1 fue superior a 150 μM.

Conclusiones generales.

- 35 La información proporcionada en la presente solicitud demuestra que el Compuesto ilustrativo 1 (el compuesto de la invención) exhibe potencia *in vivo* significativamente mayor, en comparación con compuestos estructuralmente similares. Esta mejoría es inesperada, y no podría haber sido pronosticada por el experto en el arte, en particular, debido a que muchos de estos compuestos estructuralmente similares exhiben potencia *in vitro* muy similar contra JAK1 y JAK2.

- 40 Será apreciado por los expertos en el arte que las descripciones precedentes son ejemplares y de naturaleza explicativa, y tienen el propósito de ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas. A través de la experimentación de rutina, el experto reconocerá variaciones y modificaciones evidentes que pueden efectuarse sin alejarse del espíritu de la invención. Por lo tanto, se tiene la intención de que la invención no sea definida por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

REFERENCIAS.

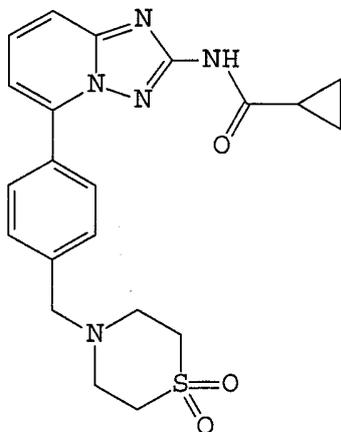
- Choy, E. H., Panayi, G. S. (2001). *N Engl J Med*. 344: 907–16.
- 45 Chubinskaya, S. and Kuettnner, K. E. (2003). “Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes”. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35 (9)1323–1340.
- Clegg D. O. *et al.* (2006). *N Engl J Med*. 2006, 354:795–808. “Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis”.
- Firestein, G. S. (2003). *Nature*. 423: 356–61.

- Lee, D. M, Weinblatt, M. E. (2001). *Lancet*. 358: 903–11.
- Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J. P., Bogdanowicz, P. (2003) "JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)–6/soluble IL–6R down–regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes". *J Biol Chem*. 278 (5) 2903–2912.
- 5 Li, W. Q., Dehnade, F., Zafarullah, M. (2001), "Oncostatin M–induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase–3 genes expression in chondrocytes requires janus kinase/STAT signaling pathway". (2001) *J. Immunol*. 166: 3491–3498.
- O'Dell, J. R. (2004). "Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis". *N. Engl. J. Med*. 350 (25): 2591–602.
- 10 Osaki, M., Tan, L., Choy, B. K., Yoshida, Y., Cheah, K. S. E, Auron, P. E., Goldring, M. B. (2003). "The TATA–containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon–gamma–mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1alpha, JAK1 and JAK2". *Biochem. J*. 369: 103–115.
- Otero, M., Lago, R., Lago, F., Gomez Reino, J. J., Gualillo, O. (2005). "Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin–1". *Arthritis Research & Therapy*. 7:R581–R591.
- 15 Sims, N. A. *et al.*, (2004). "Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen–induced arthritis". *Arthritis Rheum*. 50: 2338–2346.
- Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., King, K. L., Sheehan, K. C. F., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E. M., Schreiber, R. D. (1998). "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine–induced biologic responses". *Cell*. 93: 373–383.
- 20 Smolen, J. S., Steiner, G. (2003). *Nat. Rev. Drug. Discov*. 2: 473–88.
- Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J., Rudolphi, K. A. (2005). *Nat. Rev. Drug Discov*. 4: 331–44. "Osteoarthritis – an untreatable disease?"
- Tam, L., McGlynn, L. M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J. M. S., Edwards, J. (2007), *British Journal of Cancer*, 97, 378–383.
- 25 Constantinescu *et al.*, 2007, *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (3): 122–131.
- Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadimitsu Kishimoto, *Arthritis Res.*, 2002, 4 (supl. 3): S233–S242.
- O'Shea J., *et al.* *Nature Review Drug Discovery*, 3 (2004) 555–564: "A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway".
- 30 Vainchenker, W. *et al.* *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (2008) 385–393: "JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immune deficiencies".
- Levy, D. and Loomis, C. *New England Journal of Medicine*, 357 (2007) 1655–1658: "STAT3 signaling and the Hyper–IgE–syndrome".
- 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.
- 35 Geron *et al.* (2008), "Selective inhibition of JAK2–driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors", *Cancer Cell*, 13 (4), 321–30.
- Wirtz *et al.* (2007), "Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073–1083.
- 40 Nials *et al.* (2008), "Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge", *Disease Models & Mechanisms*, 213–220.
- 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. Immunol.*, 162–172.
- Pernis *et al.* (2002), "JAK–STAT signaling in asthma", *J. Clin. Invest.* 1279.
- 45 Kudlacz *et al.* (2008), "The JAK–3 inhibitor CP–690550 is a potent anti–inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia", *Eur. J. Pharmacol* 154–161.

- Mullighan, C. G., Zhang, J., Harvey, R. C., Collins–Underwood J. R., Schulman, B. A., Phillips, L. A., Tasian, S. K., Loh, M. L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S. R., Chen, I. M., Clifford, R. J., Gerhard, D. S., Carroll, W. L., Reaman, G. H., Smith, M., Downing, J. R., Hunger, S. P., Willmane, C. L.; (2009) “JAK mutations in high–risk childhood acute lymphoblastic leukemia”, *PNAS* May 22. [Epub ahead of print].
- 5 Argiles, J. M., Lopez–Soriano, F. J. (1998) “Catabolic proinflammatory cytokines”. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1: 245–51.
- Bush, K. A., Farmer, K. M., Walker, J. .S., Kirkham, B. W. (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.
- 10 Jou, I. M., Shiau, A. L., Chen, S. Y., Wang, C. R., Shieh, D. B., Tsai, C. S., Wu, C. L. (2005): “Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen–induced arthritis”. *Arthritis Rheum.* 52: 339–44.
- Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S., Shen, Z. N., 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.
- 15 Rall, L. C., Roubenoff, R. (2004), “Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions”. *Rheumatology*; 10: 1219–23.
- Salvemini, D., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., De Sarro, A., Caputi, A. P., 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.
- 20 Shelton, D. L., Zeller, J., Ho, W. H., Pons, J., Rosenthal, A. (2005). “Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto–immune arthritis”. *Pain.* 116: 8–16.
- Sims, N. A., Green, J. R., Glatt, M., Schlicht, S., Martin, T. J., Gillespie, M. T., Romas, E. (2004). “Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen–induced arthritis”. *Arthritis Rheum.*, 50: 2338–46.
- 25 Walsmith, J., Abad, L., Kehayias, J., Roubenoff, R. (2004). “Tumor necrosis factor–alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis”. *J Rheumatol.*; 31: 23–9.
- Khachigian, L. M. “Collagen antibody–induced arthritis”. (2006). *Nature Protocols.* 1, 2512–6.
- 30 Lin, H. S., Hu, C. Y., Chan, H. Y., Liew, Y. Y., Huang, H. P., 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.
- McGinnity, *et al. Drug Metabolism and Disposition.* 2008, 32, 11, 1247.
- Debe entenderse que factores tales como la capacidad de penetración celular diferencial de los diversos compuestos pueden contribuir a discrepancias entre la actividad de los compuestos en los ensayos celulares y bioquímicos *in vitro*.
- 35 Por lo menos algunas de las denominaciones químicas de los compuestos de la invención, como se proporcionan y se exponen en esta solicitud, pueden haber sido generadas sobre una base automatizada mediante el uso de un programa informático comercial para la denominación química, y no han sido verificadas independientemente. Los programas representativos que realizan esta función incluyen la herramienta de denominación Lexichem, comercializada por Open Eye Software, Inc., y la herramienta Autonom Software, comercializada por MDL, Inc. En el caso donde la denominación química indicada y la estructura representada difieran, registré la estructura representada.
- 40 Las estructuras químicas expuestas en esta solicitud se prepararon usando o bien ChemDraw® o ISIS® /DRAW. Cualquier valencia abierta que aparezca en un átomo de carbono, oxígeno o nitrógeno en las estructuras de esta solicitud indica la presencia de un átomo de hidrógeno. Cuando existe un centro quiral en una estructura, aunque no se exponga estereoquímica específica para el centro quiral, ambos enantiómeros asociados con la estructura quiral están contemplados por la estructura.
- 45

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto de conformidad con la fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de conformidad con la reivindicación 1.
3. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, que comprende un agente terapéutico adicional.
4. El uso del compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento.
- 10 5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, para su uso como un medicamento.
6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, para usarse en el tratamiento, prevención o profilaxis de condiciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplante, enfermedades que involucran el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- 15 7. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde la condición inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias y enfermedades de intestino inflamatorio.
- 20 8. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6 o 7, en donde la condición inflamatoria es artritis reumatoide.
9. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde la condición inflamatoria es enfermedad de intestino inflamatorio.
- 25 10. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde la condición inflamatoria es colitis y/o enfermedad de Crohn.
11. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde la enfermedad que involucra deterioro de recambio de cartílago se selecciona de espondilitis anquilosante y artritis psoriásica.
12. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde la enfermedad autoinmune es dermatitis atópica.
- 30 13. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde la enfermedad de rechazo de trasplante es enfermedad de rechazo injerto contra anfitrión.

14. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 6, en donde el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.

15. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 9, en donde el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de artritis, enfermedades de intestino inflamatorio, enfermedades autoinmunes o rechazo de transplante.

5