

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 325**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 14175887 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2792677**

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

30 Prioridad:

26.06.2009 US 220685 P

25.01.2010 US 298188 P

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

27.09.2017

73 Titular/es:

**GALAPAGOS NV (100.0%)
Generaal De Wittelaan L11/A3
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 634 325 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo compuesto útil para el tratamiento de enfermedades degenerativas e inflamatorias

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto que es un inhibidor de JAK, para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o las enfermedades intestinales inflamatorias opcionalmente en combinación con un agente terapéutico adicional.

10 Las cinasas Janus (JAK) son tirosina cinasas citoplásmicas que transducen la señalización de citocinas de los receptores de membrana a los factores de transcripción STAT. Se describen cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Tras la unión de la citocina a su receptor, los miembros de la familia JAK experimentan la auto- y/o la transfosforilación entre sí, seguidas de la fosforilación de las STAT que posteriormente migran al núcleo para modular la transcripción. La transducción de señales intracelulares de JAK-STAT proporciona interferones, la mayoría de interleucinas, así como también una diversidad de citocinas y factores endocrinos tales como EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTIF, GM-CSF y PRL (Vainchenker W. y col. (2008).

15 La combinación de la investigación de modelos genéticos y de inhibidores de JAK de molécula pequeña reveló el potencial terapéutico de diversos JAK. JAK3 se valida por medio de la genética del ratón y del ser humano como una diana de inmunosupresión (O'Shea J. y col. (2004)). Se sometieron a desarrollo clínico de manera satisfactoria inhibidores JAK3, inicialmente para el rechazo del trasplante de órganos pero posteriormente también en otras indicaciones inmunoinflamatorias tales como la artritis reumatoide (AR), la psoriasis y la enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

20 TYK2 es una diana potencial para enfermedades inmunoinflamatorias, siendo validada por la genética humana y estudios de inactivación génica en ratones (Levy D. y Loomis C. (2007)).

25 JAK1 es una nueva diana en el área de enfermedades inmunoinflamatorias. JAK1 heterodimeriza con las otras JAK para transducir la señalización proinflamatoria accionada por citocinas. Por tanto, cabe esperar que la inhibición de JAK1 y/u otras JAK constituya una ventaja terapéutica para una gama de enfermedades inflamatorias así como también para otras enfermedades accionadas por la transducción de señales mediadas por JAK.

Antecedentes de la invención

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

35 La osteoartritis (también denominada OA, o artritis de uso o desgaste normal) es la forma más común de artritis y se caracteriza por pérdida del cartílago articular, con frecuencia asociada a la hipertrofia del hueso y el dolor. Para una revisión amplia de la osteoartritis, se remite a Wieland y col. (2005).

40 La osteoartritis es difícil de tratar. Actualmente, no existe cura disponible y el tratamiento se centra en el alivio del dolor y la prevención de la deformación de la articulación afectada. Los tratamientos comunes incluyen el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Aunque los complementos dietéticos, tales como la condroitina y el sulfato de glucosamina, se han constatado como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la osteoartritis, un ensayo clínico reciente reveló que ninguno de los dos tratamientos reduce el dolor asociado a la osteoartritis. (Clegg y col., 2006). Tomados juntos, no existen fármacos osteoartíticos de modificación de la enfermedad.

45 La simulación de los procesos anabólicos, los procesos catabólicos de bloqueo o una combinación de estos dos, pueden dar como resultado la estabilización del cartílago, y quizás incluso la reversión del daño, y por tanto previenen el avance posterior de la enfermedad. Diversos agentes de estimulación pueden favorecer la estimulación anabólica de los condrocitos. El factor-I de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) es el factor de crecimiento anabólico predominante en el fluido sinovial y estimula la síntesis por un lado de proteoglicanos y por otro, del colágeno. También se ha mostrado que los miembros de la familia de proteína morfogénica ósea (BMP), en concreto BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7, y los miembros del factor-β de crecimiento de transformación en humanos (TGF-β) pueden inducir la estimulación anabólica de los condrocitos (Chubinskaya y Kuettner, 2003). Se ha identificado recientemente un compuesto que induce la estimulación anabólica de los condrocitos (documento US 6.500.854; documento EP 1 391 211). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos muestran diversos efectos secundarios y,

por consiguiente, existe una fuerte necesidad de compuestos que estimulen la diferenciación de los condrocitos sin estos efectos secundarios.

Vandeghinste y col. (documento WO 2005/124342) descubrieron la JAK1 como diana cuya inhibición podría tener relevancia terapéutica para diversas enfermedades incluyendo la OA. La JAK1 pertenece a la familia de cinasas Janus (JAK) de tirosina cinasas citoplásmicas, implicadas en la transducción de señales intracelulares mediada por receptores de citocinas. La familia JAK consiste en 4 miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Las JAK se reclutan a receptores de citocinas, tras la unión de la citocina, seguido de la heterodimerización del receptor de citocinas y una subunidad del receptor compartida (cadena gamma-c común, gp130). Después, se activan las JAK por medio de auto- y/o transfosforilación por medio de otra JAK, dando como resultado la fosforilación de los receptores y el reclutamiento y la fosforilación de los miembros del transductor de señales y el activador de transcripción (STAT). Los STAT fosforilados se dimerizan y experimentan traslocación al núcleo, en el que se unen a regiones potenciadoras de los genes sensibles a las citocinas. El estudio de inactivación del gen de JAK1 en ratones demostró que la JAK1 desempeña funciones esenciales y no redundantes durante el desarrollo: los ratones JAK1 ^{-/-} murieron 24 horas después del nacimiento y el desarrollo de linfocitos se vio gravemente alterado. Además, las células JAK1 ^{-/-} no fueron reactivas, o fueron menos reactivas, a las citocinas que usan receptores de citocinas de clase II, receptores de citocinas que usan la subunidad gamma-c para la señalización y la familia de receptores de citocinas que usan la subunidad gp130 para la señalización (Rodig y col., 1998).

Se han implicado diversos grupos en la señalización de JAK-STAT en la biología de los condrocitos. Li y col. (2001) demostraron que la oncostatina M induce la expresión de los genes de MMP y TIMP3 en los condrocitos primarios por medio de la activación de las vías de señalización de JAK/STAT y MAPK. Osaki y col. (2003) demostraron que la inhibición del colágeno II mediada por interferón-gamma en los condrocitos implica la señalización de JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo de cartílago por medio de la reducción de la expresión de los componentes de la matriz, y por medio de la inducción de la expresión de colagenasas y de sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2), que actúa como mediador en la producción de óxido de nítrico (NO). Otero y col. (2005) demostraron que la leptina y IL1-beta inducen de forma sinérgica la producción de NO o la expresión del ARNm de NOS2 en los condrocitos, y que se bloquea por medio de un inhibidor de JAK. Legendre y col. (2003) demostraron que IL6/receptor IL6 inducía la regulación negativa del colágeno II de genes de matriz específicos de cartílago, el núcleo de agregan y la proteína de unión en condrocitos articulares bovinos, y que esto estaba mediado por la señalización de JAK/STAT. Por tanto, estas observaciones indican un papel de la actividad de JAK cinasa en la homeostasis del cartílago y oportunidades terapéuticas para los inhibidores de las cinasas JAK.

Los miembros de la familia JAK se han visto implicados en afecciones adicionales que incluyen trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan y col., 2007, *Mol. Immunol.* 44 (10):2497-506), en los que se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular de JAK2, también pueden servir de utilidad en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Adicionalmente, la familia JAK, en particular, JAK1, JAK2 y JAK3, se han vinculado al cáncer, en particular a las leucemias, por ejemplo, la leucemia mieloide aguda (O'Sullivan y col., 2007, *Mol Immunol.* 44(10):2497-506; Xiang y col., 2008, "Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia" *Blood First Edition Paper*, prepublicado en la red el 6 de diciembre de 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) y leucemia linfoblástica aguda (Mullighan y col., 2009) o tumores sólidos por ejemplo leiomioma uterino (Constantinescu y col., 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3): 122-131), cáncer de próstata (Tam y col., 2007, *British Journal of Cancer*, 87, 378-383). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1 y JAK2, pueden también presentar utilidad en el tratamiento del cáncer (leucemias y tumores sólidos por ejemplo leiomioma uterino, cáncer de próstata).

Se ha establecido un vínculo con enfermedades autoinmunitarias para JAK3 y Tyk2. Las mutaciones de JAK3, pero también en la cadena del receptor gamma-c de componentes de señalización aguas arriba y el receptor IL7 representan, todas juntas, aproximadamente un 70 % de los casos de inmunodeficiencia combinada grave humana (O'Shea y col., 2004). Nótese que JAK1 coopera con JAK3 en la transducción de señales a partir de la cadena del receptor gamma-c. Se observan polimorfismos de Tyk2 en el lupus sistémico eritematoso (LES) (O'Sullivan y col., 2007, *Mol Immunol.* 44(10):2497-506). Además, la dirección a la familia JAK puede proporcionar una oportunidad terapéutica en el área de la inmunoinflamación.

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

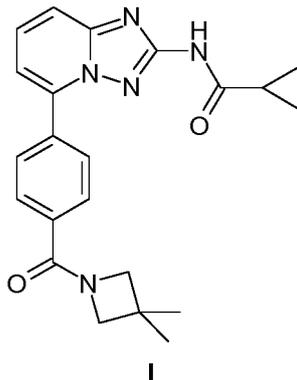
Las terapias actuales no son satisfactorias y por tanto sigue siendo necesario identificar compuestos adicionales que puedan usarse en el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro de la renovación del cartílago y/o malformaciones congénitas del cartílago. Por tanto, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o las enfermedades intestinales inflamatorias. En particular, el compuesto presenta elevada potencia y selectividad para JAK1 con respecto a otros miembros de la familia JAK además de la diana cinasa 385 y las dianas no cinasas. Adicionalmente, los datos indican que el compuesto tiene un buen margen de seguridad. Por tanto, se concluye que la presente invención ofrece una nueva oportunidad para el tratamiento de enfermedades mediadas por JAK1, en particular la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias y las enfermedades intestinales inflamatorias.

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

Sumario de la invención

5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1, son útiles para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro de la renovación del cartílago o malformaciones congénitas del cartílago.

En consecuencia, en un primer aspecto de la invención, se desvela un compuesto de la invención que tiene la Fórmula I:



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, la prevención o la proliferación de la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o las enfermedades intestinales inflamatorias.

15 El compuesto de la invención es un nuevo inhibidor de JAK que presenta una elevada potencia y selectividad para JAK1 con respecto a otros miembros de la familia JAK y dianas cinasa 385 y no cinasa, así como también muestra un buen margen de seguridad. El uso de un compuesto con este perfil puede dar como resultado ventajas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o las enfermedades intestinales inflamatorias, debido a una menor incidencia de los efectos colaterales.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) en combinación con un agente terapéutico adicional en el que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, el rechazo a trasplantes, enfermedades que implica el deterioro de la renovación del cartílago o malformaciones congénitas del cartílago.

25 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre las enumeradas en el presente documento, tales como la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, las enfermedades intestinales inflamatorias, que pueden estar asociadas a la actividad aberrante de JAK. En un aspecto específico, la presente divulgación proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de afecciones que se enumeran en el presente documento tales como la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, las enfermedades intestinales inflamatorias, que se asocian a la actividad aberrante de JAK1.

30 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección enumerada en el presente documento, tal como la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, las enfermedades intestinales inflamatorias, es decir una relación causal con la actividad anormal de JAK. En una realización específica la actividad anormal de JAK es la actividad anormal de JAK1.

35 En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona procedimientos para la síntesis del compuesto de la invención, con protocolos y vías de síntesis representativos desvelados más adelante en el presente documento.

40 En consecuencia, es un objeto principal de la presente invención proporcionar un compuesto que puede tratar o aliviar afecciones o enfermedades o síntomas de las mismas que se enumeran en el presente documento, tales como la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, las enfermedades intestinales inflamatorias, que pueden relacionarse causalmente con la actividad de JAK. En particular la enfermedad o afección puede relacionarse causalmente con la actividad de JAK1.

Otros objetos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la descripción detallada adjunta.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

Los siguientes términos pretenden tener los significados que se presentan a continuación y son útiles para la comprensión de la descripción y el alcance pretendido de la presente invención.

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

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

"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o susceptible de aprobación por una agencia reguladora de un gobierno federal o de un estado o la agencia correspondiente en países diferentes a los Estados Unidos, o que se enumera en la Farmacopea de los EE.UU. u otro compendio farmacéutico reconocido para su uso en animales, y más en particular, en seres humanos.

- 15 "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiera a una sal del compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacéutica deseada del compuesto parental. En particular, dichas sales no son tóxicas y pueden ser sales de adición de ácido orgánico o inorgánico y sales de adición de base. Específicamente, dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto parental bien es sustituido por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión alcalino térreo, o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Sales adicionales incluyen, a modo de ejemplo únicamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando el compuesto contiene funcionalidad básica, sales de ácidos inorgánico u orgánicos no tóxicas, tales como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. La expresión "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a un contra-ión catiónico aceptable de un grupo funcional ácido. Dichos cationes se ejemplifican por medio de cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares.
- 35

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

- 40 "Solvato" se refiere a formas del compuesto que se asocian a un disolvente, normalmente por medio de reacción de solvólisis. La asociación física incluye el enlace de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, etanol, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, en forma cristalina y se pueden solvatar o hidratar. Los solvatos apropiados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, y además incluyen tanto solvatos estequiométricos como solvatos no estequiométricos. En algunos casos el solvato es susceptible de aislamiento, por ejemplo cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente a la estructura reticular del cristal del sólido cristalino. "Solvato" abarca tanto solvatos de fase de disolución como solvatos susceptibles de aislamiento. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.
- 45

"Sujeto" incluye los seres humanos. Las expresiones "ser humano", "paciente" y "sujeto" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

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

- 55 "Prevenir" o "prevención" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, provocar que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes de la aparición de la enfermedad).

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

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno o trastornos inflamatorios" se refiere al grupo de trastornos que incluyen, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, enfermedades respiratorias alérgicas (por ejemplo, asma, rinitis), enfermedades intestinales inflamatorias (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), patologías inducidos por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones tras revascularización quirúrgica o estados crónicos de endotoxinas que contribuyen por ejemplo a insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas que afectan al cartílago, tales como las que afectan a las articulaciones. En particular, la expresión se refiere a artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedades respiratorias alérgicas (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad o enfermedades autoinmunitarias" se refiere al grupo de enfermedades que incluye enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, incluyendo trastornos tales como EPOC, asma (por ejemplo, asma intrínseco, asma extrínseco, asma de polvo, asma infantil), particularmente el asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hipersensibilidad de las vías respiratorias), bronquitis, incluyendo asma bronquial, lupus sistémico eritematoso (LES), esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I y complicaciones asociadas a la misma, eccema atópico (dermatitis atópica), dermatitis de contacto y dermatitis eccematosa, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. En particular, la expresión se refiere a EPOC, asma, lupus sistémico eritematoso, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad o enfermedades proliferativas" se refiere a trastornos tales como el cáncer (por ejemplo, leiomiomas 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, reestenosis, esclerodermis o fibrosis. En particular, la expresión se refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.

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

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "rechazo de trasplante" se refiere al rechazo de células agudo o crónico, a alo- o xeno-injertos de tejido o de órganos sólidos de, por ejemplo, isletas pancreáticas, hemocitoblastos, médula ósea, piel, músculo, tejido de la córnea, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago, o enfermedades de injerto contra huésped.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "malformación o malformaciones congénitas de cartilago" incluyen trastornos tales como condrolisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafiseal y trastornos relacionados.

5 Como se usa en el presente documento, el término "JAK" se refiere a la familia de cinasas Janus (JAK) que son tirosina cinasas citoplásmicas que producen la transducción la señalización de citocinas desde los receptores de membrana hasta los factores de transcripción de STAT. Se describen cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 y el término JAK puede hacer referencia a todos los miembros de la familia JAK de forma colectiva o a uno o más miembros de la familia JAK como indique el contexto.

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

15 Cuando se hace referencia a intervalos en el presente documento, por ejemplo pero sin limitación, alquilo C₁-C₈, la cita de un intervalo debería considerarse una representación de cada miembro de dicho intervalo.

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

30 Se pretende que todas las variantes isotópicas del compuesto que se proporciona en el presente documento, radiactivas o no, queden incluidas dentro del alcance de la invención.

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

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

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

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

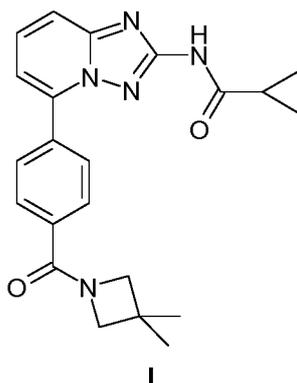
A menos que se indique lo contrario, se pretende que la descripción o nomenclatura de un compuesto particular en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluyan tanto los enantiómeros individuales como las mezclas, racémicas o de cualquier otro tipo, del mismo. Los procedimientos para la determinación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

55

EL COMPUESTO

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los inhibidores de JAK son útiles para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro de la renovación del cartílago o malformaciones congénitas del cartílago. El presente compuesto es un inhibidor de los miembros de la familia JAK; específicamente inhibe la actividad de JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. En particular, inhibe la actividad de JAK1.

En consecuencia, en un primer aspecto de la invención, se desvela un compuesto de la invención que tiene una Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, la prevención o la proliferación de la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o las enfermedades intestinales inflamatorias.

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

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

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

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

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

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

PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO

Se puede usar el compuesto de la invención como agente terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos que están causalmente relacionados o que se pueden atribuir a la actividad aberrante de JAK. En particular, afecciones relacionados con la actividad aberrante de JAK1. En consecuencia, en un aspecto la presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y las enfermedades inflamatorias intestinales.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona el compuesto de la invención, para su uso en combinación con un agente terapéutico adicional.

Un régimen particular del presente uso comprende la administración a un sujeto que padece osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o enfermedades inflamatorias intestinales una cantidad eficaz del compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación en el sujeto, y preferentemente terminar, los procesos responsables de dicha inflamación.

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

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

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

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

Cuando se usa para prevenir la aparición de la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o enfermedades inflamatorias intestinales, el compuesto de la invención se administra a un paciente con riesgo de desarrollar la afección, normalmente bajo el consejo y supervisión de un médico, en los niveles de dosificación descritos anteriormente. Generalmente, los pacientes con riesgo de desarrollar un trastorno particular incluyen los que tienen un historial familiar de la afección, o los que se han identificado por medio de ensayo genético o exploración como particularmente susceptibles de desarrollar la afección.

El compuesto de la invención se puede administrar como el único agente activo o se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo otros compuestos que demuestran la misma actividad terapéutica o similar, y que se determina que son seguros y eficaces para dicha administración combinada. En una realización específica, la coadministración de dos agentes (o más) permite el uso de dosis significativamente más bajas de cada uno, reduciendo de este modo los efectos secundarios observados.

En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro de la renovación del cartílago o malformaciones congénitas del cartílago.

En una realización, se coadministra el compuesto de la invención con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de una afección inflamatoria; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a, agentes inmunorreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticoesteroides (por ejemplo, prednisona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato de mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3, por ejemplo Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.

En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de la artritis (por ejemplo, artritis reumatoide); los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), esteroides, FARME sintéticos (por ejemplo pero sin limitación metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofin, aurotiomalato de sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina y ciclosporina) y FARME biológicos (por ejemplo pero sin limitación Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab y Abatacept).

En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de trastornos proliferativos; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: metotrexato, leucovorina, adriamicina, prednisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluoracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ejemplo, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (por ejemplo, Avastin™), inhibidores de proteosoma (por ejemplo, Velcade™), Glivec® e inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Adicionalmente, se puede administrar un compuesto de la invención en combinación con otras terapias incluyendo, pero sin limitarse a, radioterapia o cirugía. En una realización específica, el trastorno proliferativo se selecciona entre cáncer, enfermedad proliferativa o leucemia.

En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunitarias; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: glucocorticoides, agentes citostáticos (por ejemplo, análogos de purina), agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas nitrogenadas (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino y otros), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ejemplo, antraciclinas de dactinomina, 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 (por ejemplo, infliximab (Ramicade®), etanercept (Enbrel™) o adalimumab (Humira™)), micofenolato, Fingolimod y Myriocin.

5 En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención del rechazo de trasplantes; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (por ejemplo, sirolimus, everolimus), agentes antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales del receptor anti-IL-2R α , basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales de células anti-T (por ejemplo, globulina antitímocito (ATG), globulina antilinfocito (ALG)).

10 En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención del asma y/o rinitis y/o EPOC; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: agonistas del adrenorreceptor beta₂ (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhalada o en comprimidos), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio), glucocorticoides (orales o inhalados), agonistas β_2 de acción prolongada (por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol, y albuterol oral de liberación retardada), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ejemplo, fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrieno e inhibidores de síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlukast y zileutón), inhibidores de la liberación de mediador (por ejemplo, cromoglicato y ketotifeno), reguladores biológicos de la respuesta de IgE (por ejemplo, omalizumab), antihistaminas (por ejemplo, cetirizina, cinarizina, fexofenadina) y vasoconstrictores (por ejemplo, oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

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

25 En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de enfermedad del intestino irritable (EII); los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, budesonida), agentes sintéticos inmunomoduladores que modifican la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores biológicos que modifican la enfermedad (infliximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

30 En una realización, se coadministra el compuesto de la invención con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de lupus sistémico eritematoso; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: fármacos anti-reuma de modificación de enfermedad (FARME) tales como antimaláricos (por ejemplo, plaquenilo, hidroxiquina), inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico; fármacos inmunosupresores y analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, opiatos (por ejemplo, dextropropoxifeno y co-codamol), opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona, MS Contin o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo Duragesic.

35 En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico en la que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de la psoriasis; los agentes particulares incluyen, pero sin limitarse a: tratamientos tópicos tales como soluciones para baño, humectantes, cremas medicadas y pomadas que contienen alquitrán de hulla, ditranol (antralina), corticoesteroides tales como desoximetasona (Topicort™), fluocinonida, análogos de vitamina D₃ (por ejemplo, calcipotriol), aceite de argán y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanida, hidroxurea, sulfasalazina, micofenolato de mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o sustancias biológicas tales como Amevive™, Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ y ustequinumab (un agente de bloqueo de IL-12 y IL-23). Adicionalmente, se puede administrar un compuesto de la invención en combinación con otras terapias incluyendo, pero sin limitarse a, fototerapia, o fotoquimioterapia (por ejemplo, psoraleno y fototerapia ultravioleta A (PUVA)).

40 Por coadministración se incluye cualquier medio de administración de dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte de dicho régimen de tratamiento, como resultará evidente para el experto. Mientras que se pueden administrar dos o más agentes de forma simultánea en una formulación individual, esto no es esencial. Los agentes se pueden administrar en diferentes formulaciones y en diferentes momentos.

PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS**General**

- 5 Se puede preparar el compuesto de la invención a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Se apreciará que cuando se proporcionan condiciones de procedimiento preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, proporciones molares de reaccionantes, disolventes, presiones, etc.), también se pueden usar otras condiciones de procedimiento a menos que se afirme lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reaccionantes particulares o el disolvente usado, pero dichas condiciones se pueden determinar por parte de un experto en la materia por medio de procedimientos rutinarios de optimización.
- 10 Adicionalmente, como resultará evidente para los expertos en la materia, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para evitar que determinados grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector apropiado para un grupo funcional particular, así como también las condiciones apropiadas para la protección y desprotección, también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen numerosos grupos, y su introducción y retirada, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Segunda Edición, Wiley, Nueva York, 1991, y las referencias citadas en el mismo.
- 15

Los siguientes procedimientos se presentan con detalles en cuanto a la preparación del compuesto de la invención. El compuesto de la invención puede prepararse a partir de materiales de partida y reactivos conocidos y disponibles en el mercado por un experto en la materia de la síntesis orgánica.

- 20 Todos los reactivos fueron de calidad comercial y se usaron tal y como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se afirme lo contrario. Se usaron disolventes anhidros disponibles en el mercado para las reacciones realizadas en atmósfera inerte. Se usaron disolventes de calidad de reactivo en el resto de casos, a menos que se especifique lo contrario. Se realizó cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (35-70 μm). Se realizó cromatografía en capa fina usando placas F-254 de gel de sílice pre-revestidas (espesor de 0,25 mm). Se registró el espectro RMN ^1H en un espectrómetro de Bruker DPX 400 RMN (400 MHz). Se registraron los desplazamientos químicos (δ) para el espectro de RMN ^1H en partes por millón (ppm) con respecto a tetrametilsilano (δ 0,00) o el pico de disolvente residual apropiado, es decir, CHCl_3 (δ 7,27), como referencia interna. Se proporcionan las multiplicidades en forma de singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (c), multiplete (m) y ancho (a). Se proporcionan las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Se obtuvieron espectros EM de electronebulización en un espectrómetro CL/EM de plataforma de Micromass. Columnas usadas para todos los análisis de CLEM: Waster Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 mm de DI x 50 mm de L (Parte N.º 186002350)). HPLC de preparación: Waters XBridge Prep C18 5 μm de ODB 19 mm de DI x 100 mm L (Parte N.º 186002978). Todos los procedimientos usan gradientes de $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$. El H_2O contiene o bien TFA al 0,1 % o NH_3 al 0,1 %.
- 25
- 30

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

DCM	Diclorometano
DiPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
MeCN	Acetonitrilo
BOC	terc-Butiloxi-carbonilo
MF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Cat.	Cantidad catalítica
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido
CL-EM	Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masas
Ppm	partes por millón
Pd/C	Paladio al 10 % sobre Carbono
PMB	Para-metoxi-bencilo
PyBOP	hexafluoroborato de benzotriazol-1-il-oxi-tri-pirrolidino-fosfonio
EtOAc	acetato de etilo
APCI	ionización química a presión atmosférica
Rt	tiempo de retención
s	singulete

(continuación)

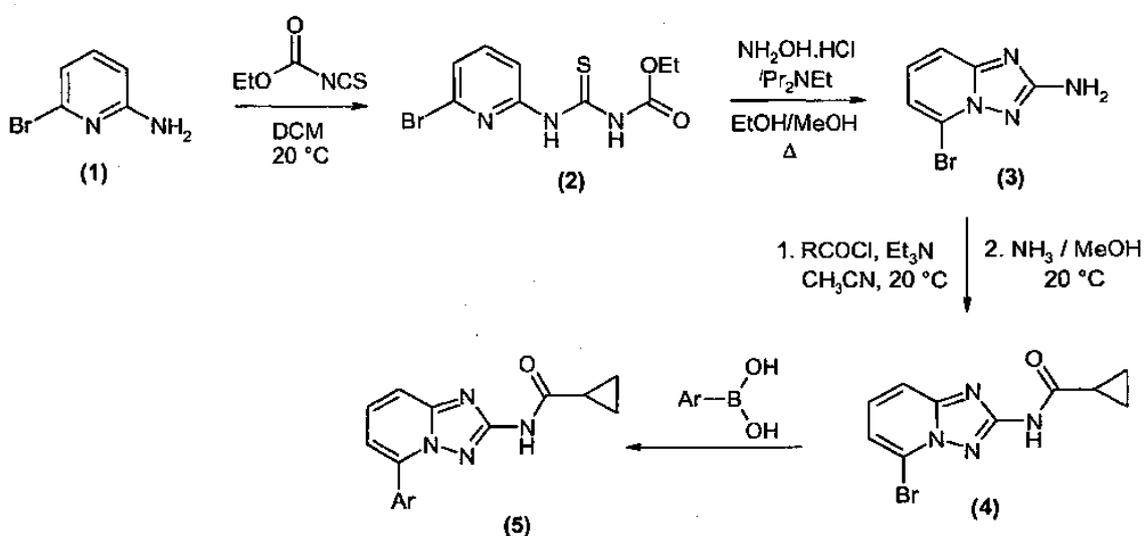
sa	singlete ancho
m	multiplete
min	minuto
ml	mililitro
μl	microlitro
g	gramo
mg	miligramo
PdCl ₂ dppf	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloroplatino (II)
TEA	Trietilamina
MMP	Metalo Proteinasa de Matriz
NHAC	Condrocitos Articulares Humanos Normales
ARNhc	ARN de horquilla corto
ARN	Ácido ribonucleico
Ad-ARNip	ANRip codificado en adenovirus
PBST	Solución salina tamponada con fosfato con Tween Na ₂ HPO ₄ 3,2 mM, KH ₂ PO ₄ 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4
APMA	acetato 4-aminofenilmercúrico
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
FBS	Suero bovino fetal
hCAR	receptor de adenovirus celular humano
3-MOI	multiplicidad de infección de 3
dNTP	trifosfato de desoxirribonucleósido
QPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ADNc	ácido desoxirribonucleico de copia
GAPDH	gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

Preparación sintética del compuesto de la invención

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

Procedimiento de síntesis general

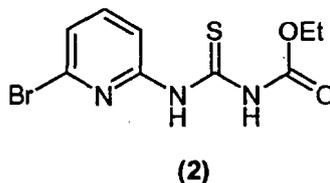
5

Esquema I

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

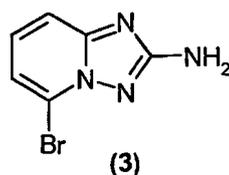
General

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



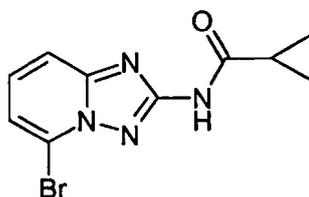
5 Se añade isotiocianato de etoxicarbonilo (173,0 ml, 1,467 mol) gota a gota a una solución de 2-amino-6-bromopiridina (**1**) (253,8 g, 1,467 mol) en DCM (2,5 l) enfriada hasta 5 °C, durante 15 min. Posteriormente se permite el calentamiento de la mezcla de reacción a temperatura ambiente (20 °C) y se agita durante 16 h. La evaporación al vacío proporciona un sólido que se puede recoger por medio de filtración, se lava minuciosamente con gasolina (600 ml, 3 veces) y se seca al aire para permitir la obtención de (**2**). Se puede usar la tiourea tal cual para la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12,03 (1H, s a, NH), 8,81 (1H, d, J 7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, s a, 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, c, J 7,1 Hz, CH₂), 1,35 (3H, t, J 7,1 Hz, CH₃).

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

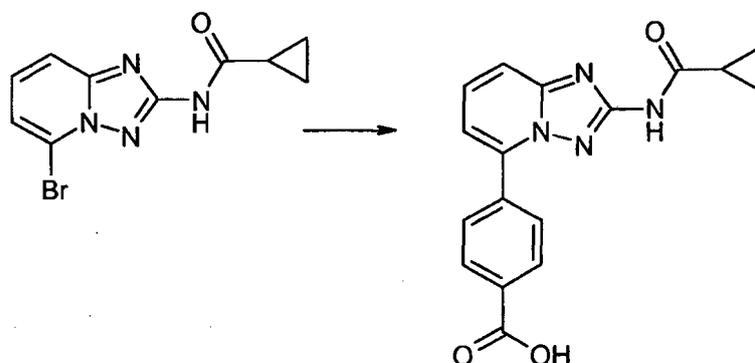


15 Se añade *N,N*-diisopropiletilamina (145,3 ml, 0,879 mol) a una suspensión de clorhidrato de hidroxilamina (101,8 g, 1,465 mol) en EtOH/MeOH (1:1, 900 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente (20 °C) durante 1 h. Después, se añade 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboxietoxi-tiourea (**2**) (89,0 g, 0,293 mol) y la mezcla se calienta lentamente a reflujo (Nota: se requiere una torre de lavado de blanqueo para inactivar el H₂S desprendido). Tras 3 h a reflujo, se dejar enfriar la mezcla y se filtra para recoger el sólido precipitado. Se recoge el producto por medio de evaporación al vacío del filtrado, adición de H₂O (250 ml) y filtración. Se lavaron sucesivamente los sólidos combinados con H₂O (250 ml), EtOH/MeOH (1:1, 250 ml) y Et₂O (250 ml), posteriormente se secan al vacío para proporcionar el derivado de triazolopiridina (**3**) en forma de un sólido. Se puede usar el compuesto tal cual para la próxima etapa sin purificación alguna. ¹H (400 MHz, DMS-d₆) δ 7,43-7-34 (2H, m, 2 x H aromático), 7,24 (1H, dd, J 6,8 y 1,8 Hz, H-aromático), 6,30 (2H, a, NH₂); m/z 213/215 (1:1, M+H⁺, 100 %).

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

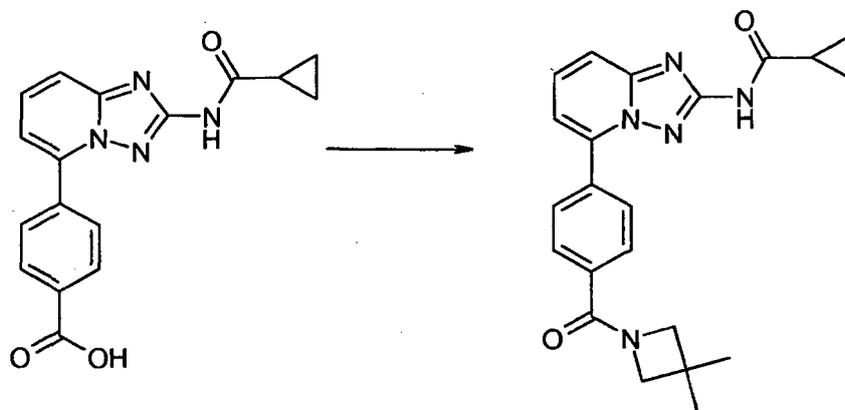


25 Se añade Et₃N (11,6 ml, 83,3 mol) a una solución de 2-amino-triazolopiridina (**3**) (7,10 mg, 33,3 mol) en CH₃CN seco (150 ml) a 5 °C, seguido de cloruro de ciclopropanocarbonilo (83,3 mol). Después, se deja calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agita hasta que se haya consumido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

Procedimiento de síntesis para la preparación del compuesto de la invención**Compuesto 1***Etapa 1: Acoplamiento de Suzuki*

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

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



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

El compuesto de la invención que se ha preparado o se puede preparar de acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el presente documento se enumera en la Tabla I a continuación. Los datos espectrales de RMN del compuesto de la invención se proporcionan en la Tabla II.

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

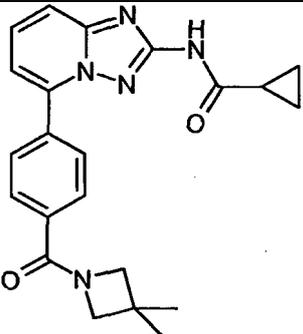
Comp n.º	Estructura	Nombre	PM	EM medida
1		{5-[4-(3,3-dimetil-azetidin-1-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida del ácido ciclopropanocarboxílico	389,46	390,0

Tabla II: Datos de RMN del Compuesto de la invención

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

5 Ejemplos Biológicos

Ejemplo 1 - ensayos in vitro

Ejemplo 1.1 Ensayo de inhibición de JAK1

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

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

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo JAK1 y el cálculo de CI₅₀ para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto sistemáticamente a una concentración de 20 μ M seguido de una dilución seriada 1/5, 8 puntos (20 μ M - 4 μ M - 800 nM - 160 nM - 6,4 nM - 1,28 nM - 0,26 nM) en una concentración final de DMSO del 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 μ M, 1 μ M). Los datos se expresan como el valor de CI₅₀ medio a partir de los ensayos \pm el error típico de la media.

Tabla III: Valores de CI₅₀ de JAK1 del Compuesto

Comp n.º	JAK1 (nM)
1	6,6 \pm 0,7

Ejemplo 1.2 Ensayo de determinación Ki de JAK1

Para la determinación de Ki, se mezclaron cantidades diferentes de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de Ki por medio de representación

recíproca doble de Km frente a la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usó JAK1 (Invitrogen, PV4774) a una concentración final de 500 ng/ml. El sustrato fue sal de Poli(Glu, Tyr)sodio (4:1), PM 20 000 - 50 000 (Sigma, P0275). Se realizó la reacción en Hepes 25 mM pH 7,5; Tween 20 al 0,01 %, MgCl₂ 10 mM con concentraciones variables de ATP y compuesto y se detuvo por medio de la adición de ácido fosfórico 150 mM. Se realizó la medición del fosfato incorporado en el sustrato poliGT colocando las muestras en una placa filtrante (usando un dispositivo de recogida, Perkin Elmer) y posterior lavado. Se midió ³³P incorporado en poliGT en un contador de centelleo Topcount tras la adición de líquido de centelleo a las placas filtrantes (Perkin Elmer).

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

Como alternativa, para la determinación de Ki, se mezclaron diferentes cantidades de inhibidor con la enzima y se siguió la reacción enzimática como función de la concentración de ATP. Se determinó el valor de Ki por medio de representación recíproca doble de Km frente a la concentración de compuesto (representación de Lineweaver-Burk). Se usó 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774) en el ensayo. El sustrato fue Peptido Ulight-JAK-a 50 nM (Tyr1023) (Perkin Elmer, TRF0121). Se realizó la reacción en MOPS 25 mM, pH 6,8, al 0,01 %, DTT 2 mM, MgCl₂ 5 mM Brij-35 con concentraciones variables de ATP y compuesto. Se midió el sustrato fosforilado usando un anticuerpo PT66 anti-fosfotirosina marcado con Eu (Perkin Elmer, AD0068). Se realizó la lectura en el envión (Perkin Elmer) con excitación a 320 nm y emisión seguida a 615 nm y 665 nm.

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

Ejemplo 1.3 Ensayo de inhibición de JAK2

Se adquirió JAK2 recombinante humano (dominio catalítico, aminoácidos 866-1154; número de catálogo PV4210) en Invitrogen. Se incubaron 0,0125 mU de JAK2 con péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) 25 nM (Perkin Elmer número de catálogo TRF0121) en tampón de reacción de cinasa (HEPES 41,66 mM pH 7,0, Triton X-100 al 0,016 %, MgCl₂ 12,5 mM, DTT 3,33 mM, ATP 7,5 μM) con o sin 4 μl que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final de 1 %), en un volumen total de un 20 μl, en una placa Luminotrac 200 384 blanca (Greiner, número de catálogo 781075). Tras 60 min a temperatura ambiente, se detuvieron las reacciones por medio de la adición de 20 μl/pocillo de mezcla de detección (1 x tampón de detección (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), Europio-anti-fosfotirosina 0,5 nM (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), EDTA 10 mM). Se realizó la lectura usando Envision con una excitación a 320 nm y medición de la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de cinasa restando las unidades de fluorescencia relativa (UFR) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μM estaurosporina) de UFR obtenida en presencia del vehículo. Se determinó la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir esta actividad como:

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

Se prepararon series de dilución de dosis para el compuesto, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo JAK2 y el cálculo de CI₅₀ para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto sistemáticamente a una concentración de 20 μM seguido de una dilución seriada 1/5, 8 puntos (20 μM - 4 μM - 800 nM - 160 nM - 6,4 nM - 1,28 nM - 0,26 nM) en una concentración final de DMSO de 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 μM, 1 μM). Los datos se expresan como el valor de CI₅₀ medio a partir del ensayo ± el error típico de la media.

Tabla IV: Valores de CI₅₀ de JAK2 del Compuesto

Comp n.º	JAK2 (nM)
1	67 ± 5

Ejemplo 1.4 Ensayo de determinación Ki de JAK2

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

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

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

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

Ejemplo 1.5 Ensayo de inhibición de JAK3

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

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

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

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

Comp n.º	JAK3 (nM)
1	408 \pm 62

Ejemplo 1.6 Ensayo de determinación de K_i de JAK3

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

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

Ejemplo 1.7 Ensayo de inhibición de TYK2

Se adquirió dominio catalítico de TYK2 recombinante humano (aminoácidos 871-1187; número de catálogo 08-147) en Carna biosciences. Se incubaron 5 ng de TYK2 con 12,5 μ g de sustrato de poliGT (Sigma número de catálogo

P0275) en tampón de reacción de cinasa (Hepes 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Na₃VO₄ 02 mM, NP-40 al 0,1 %, ATP no radioactivo 0,1 μM, gamma-ATP-³³P 0,125 μCi (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales), con o sin 5 μl que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final de 1 %), en un volumen total de un 25 μl, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, V-bottom). Tras 90 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones por medio de la adición de 25 μl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. Se transfirió toda la reacción de cinasa terminada a placas filtrantes de 96 pocillos pre-lavadas (ácido fosfórico de 75 mM) (Perkin Elmer número de catálogo 6005177) usando un dispositivo de recogida de células (Perkin Elmer). Se lavaron las placas 6 veces con 300 μl por pocillo de una solución de ácido fosfórico de 75 mM y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 μl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y se realizó la lectura usando un Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de cinasa restando los conteos por minuto (cpm) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μM estaurosporina) de cpm obtenido en presencia del vehículo. Se determinó la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir esta actividad como:

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

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, permitiendo someter a ensayo los efectos de dosis-respuesta en el ensayo TYK2 y el cálculo de CI₅₀ para el compuesto. Se somete a ensayo cada compuesto sistemáticamente a una concentración de 20 μM seguido de una dilución seriada 1/3, 8 puntos (20 μM - 6,67 μM - 2,22 μM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de DMSO de 1 %. Cuando aumenta la concentración del compuesto en la serie, se preparan más diluciones y/o se rebaja la concentración superior (por ejemplo, 5 μM, 1 μM).

Tabla VI: Valores de CI₅₀ de TYK2 del Compuesto

Comp n.º	TYK2 (nM)
1	219 ± 37

Ejemplo 2. Ensayos celulares

25 *Ejemplo 2.1. Ensayo de señalización de JAK-STAT:*

Se mantuvieron células HeLa en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía un 10 % de suero de ternero fetal inactivado térmicamente de 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomycin. Se usaron las células HeLa a una confluencia del 70 % para la transfección. Se sometieron a transfección de manera transitoria 20.000 células en un medio de cultivo celular de 87 μl con 40 ng de indicador de pSTAT1(2)-luciferasa (Panomics), 8 ng de indicador LacZ como indicador de control interno y 52 ng de pBSK usando 0,32 μl de Jet-PEI (Polypus) como reactivo de transfección por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos. Tras incubación durante la noche a 37 °C, 10 % de CO₂, se retiró el medio de transfección, se añadieron 75 μl de DMEM + 1,5 % de suero de ternero inactivado térmicamente. Se añadieron 15 μl de compuesto a una concentración de 6,7 veces durante 60 min y posteriormente se 10 μl de OSM humano (Peprotech) a 33 ng/ml de concentración final.

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

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

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

45 Se midió la actividad de luciferasa usando 40 μl de lisado celular más 40 μl de Steadylyte® como se describe por el fabricante (Perkin Elmer), en el Envision (Perkin Elmer).

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

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

Se representaron los valores de PIN para los compuestos sometidos a ensayo en dosis-respuesta y se derivaron los valores de CE₅₀.

Tabla VII: Valores de CI₅₀ de señalización de STAT del Compuesto

Comp n.º	CE ₅₀ (nM)
1	539 ± 130

5 Ejemplo 2.2. Ensayo de señalización de OSMIL-1β

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

Inhibición en porcentaje = ((fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra con el compuesto de ensayo presente) dividido entre (fluorescencia determinada en presencia del vehículo - fluorescencia determinada para la muestra sin estimulación))*100. Los datos se expresan como CE₅₀ medio de los ensayos ± error típico de la media.

Tabla VIII: Valores de CI₅₀ de MMP13 del Compuesto

Comp n.º	CE ₅₀ (nM)
1	4196 ± 2370

30

Ejemplo 2.3. Ensayo de proliferación de PBL

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

35

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

2.4.1. Protocolo de estimulación con IFNα

Para predecir la selectividad de los compuestos de ensayo para inhibir JAK1 sobre los mecanismos de señalización dependientes de JAK2 *in vivo*, se desarrolló un modelo *in vitro* fisiológicamente relevante usando sangre humana. En el ensayo WBA, se extrajo sangre de voluntarios humanos con consentimiento informado, se trató *ex vivo* con compuesto (1 h) y posteriormente se estimuló durante 30 min con interferón α (IFNα, mecanismo dependiente de JAK1) o durante 2 h con factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, mecanismo dependiente de JAK2).

40

2.4.1.1 Ensayo de fosfo-STAT1

Para la estimulación con IFNα, se midió el aumento de la fosforilación de Transductores de Señal y Activadores de Transcripción 1 (pSTAT1) por IFNα en extractos celulares de leucocitos usando un ensayo de ELISA pSTAT1. La

45

fosforilación del Transductor de Señal y Activador de Transcripción 1 (STAT1) tras la estimulación con interferón alfa (IFN α) es un evento mediado por JAK1. El ensayo de fosfo-STAT1, que se usó para medir los niveles de fosfo-STAT1 en extractos celulares, se desarrolló para evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir los mecanismos de señalización dependientes de JAK1.

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

El tampón de lisis ACK consistió en NH $_4$ Cl 0,15 M, KHCO $_3$ 10 mM, EDTA 0,1 mM. El pH del tampón fue de 7,3.

- 10 Se diluyó 10 veces un concentrado de tampón de lisis celular x 10 (parte del kit de ELISA intercalado PathScan Phospho-STAT1 (Tyr701) de Cell Signalling) en H $_2$ O. Se añadieron inhibidores de proteínasa al tampón antes de su uso.

Se disolvieron 20 μ g de IFN α en 40 μ l de H $_2$ O para obtener una solución madre 500 μ g/ml. Se almacenó la solución madre a -20 °C.

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

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

Se recogió sangre humana en tubos tratados con heparina. Se dividió la sangre en alícuotas de 392 μ l. Después, se añadieron 4 μ l de dilución de compuesto a cada alícuota y se incubaron las muestras de sangre durante 1 h a 37 °C.

- 20 Se diluyó la solución madre de IFN α 1000 veces en medio de RPMI para obtener una solución de trabajo de 500 ng/ml. Se añadieron 4 μ l de solución de trabajo de 500 ng/ml a las muestras de sangre (concentración final de IFN α : 5 ng/ml). Se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 min.

2.4.1.1.2 Preparación de extractos celulares

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

- 30

2.4.1.1.3 Medición de la fosforilación de STAT1 por medio de ELISA

- 35 Se usó el kit Pathscan Phospho-STAT1 (Tyr701) Sandwich ELISA de Cell Signalling (N.º de Cat. n.º7234) para determinar los niveles de Fosfo-STAT1.

Se descongelaron extractos celulares en hielo. Se centrifugaron los tubos durante 5 min a 16.000 g, 4 °C y se recogieron los lisados aclarados. Al mismo tiempo, se equilibraron tiras de micropocillos procedentes del kit a temperatura ambiente y se preparó tampón de lavado por medio de dilución de 20 x tampón de lavado en H $_2$ O. Se diluyeron las muestras 2 veces en diluyente de muestra y se añadieron 100 μ l a las tiras de micropocillos. Se incubaron las tiras durante la noche a 4 °C.

- 40

Al día siguiente, se lavaron las tiras 3 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo de detección a los pocillos. Se incubaron las tiras a 37 °C durante 1 h. Después, se lavaron los pocillos 3 veces con tampón de lavado de nuevo. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario con unión de HRP a cada pocillo y se incubaron las muestras a 37 °C. Transcurridos 30 min se lavaron los pocillos 3 veces de nuevo y se añadieron 100 μ l de sustrato de TMB a todos los pocillos. Cuando las muestras se volvieron azules, se añadieron 100 μ l de solución STOP para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm.

- 45

2.4.1.2. ELISA de IL-8

Para la estimulación de GM-CSF, se midió el aumento de los niveles de interleucina-8 (IL-8) en plasma usando un ensayo ELISA IL-8. La expresión de interleucina 8 (IL-8) inducida por factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocito (GM-CSF) es un evento mediado por JAK2. Se desarrolló ELISA IL-8, que se puede usar para medir los niveles de IL-8 en muestras de plasma, para evaluar la capacidad del compuesto para inhibir los mecanismos de señalización dependientes de JAK2.

- 50

Se trató *ex vivo* sangre humana, extraída a voluntarios con consentimiento, con el compuesto (1 h) y posteriormente se estimuló durante 2 h con GM-CSF. Se midió el aumento de los niveles de IL-8 en plasma usando un ensayo de ELISA IL-8.

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

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

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

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

15 2.4.1.2.2 Preparación de muestras de plasma

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

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

20 Se usó el kit de Inmunoensayo Quimioluminiscente de IL-8 Humana de R&D Systems (N.º de Cat. Q8000B) para determinar los niveles de IL-8.

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

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

30 2.4.1.3. Resultados

El pCI₅₀ del Compuesto 1 para inhibir el aumento de los niveles de pSTAT1 inducido por INF α fue de $6,32 \pm 0,07$ (ETM), al tiempo que pCI₅₀ para la inhibición del aumento de IL-8 inducido por GM-CSF fue de $4,87 \pm 0,13$ ((ETM)) (resultados obtenidos usando 6 donantes de sangre). Esto demuestra que el Compuesto 1 es 28 veces más selectivo para la vía de JAK1 frente a la vía de JAK2. Por tanto, en una configuración celular, está claro que el Compuesto 1 presenta selectividad para JAK1 con respecto a JAK2. Parece que el compuesto 1 presenta una selectividad mayor para JAK1 y JAK2 en comparación con los compuestos relacionados conocidos, u otros inhibidores de JAK conocidos.

2.4.1.3. Tratamiento de administración de datos y resultados

40 Con el fin de refinar los resultados, se representaron la inhibición de la inducción de fosfoSTAT1 por medio de IFN α en extractos celulares o la inhibición de la inducción de IL-8 por parte de GM-CSF en plasma frente a la concentración de compuesto y se extrajeron los valores de CI₅₀ usando un software Graphpad. Se conservaron los datos si R² era mayor de 0,8 y la pendiente de hill era menor de 3 y únicamente se conservaron los donantes para los cuales se obtuvieron datos válidos para ambos ensayos.

45 Por ejemplo, cuando se sometieron a este protocolo de análisis de datos adicional, el valor medido de pCI₅₀ para el Compuesto 1 para la inhibición del aumento de los niveles de pSTAT1 inducido por INF α fue de $6,21 \pm 0,09$ ((ETM)), mientras que pCI₅₀ para la inhibición del aumento de IL-8 inducido por GM-CSF fue de $4,97 \pm 0,14$ ((ETM)) (resultados obtenidos usando 6 donantes de sangre). Esto confirma que el Compuesto 1 es 17,6 veces más selectivo para la vía de JAK1 que para la vía de JAK2. Por tanto, en una configuración celular es evidente que el Compuesto 1 presenta selectividad para JAK1 con respecto a JAK2. Parece que el Compuesto 1 presenta una selectividad mayor para JAK1 que para JAK2, en comparación con los compuestos estructuralmente relacionados conocidos, u otros inhibidores de JAK conocidos.

50

2.4.2. Protocolo de estimulación de IL-6

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

2.4.2.1 Ensayos de fosfo-STAT1

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

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

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

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

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

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

2.4.2.1.2 Preparación de muestras de leucocitos y marcaje con CD4

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

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

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

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

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

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

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

2.4.2.1.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

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

sobre células CD4+.

2.4.2.2 Ensayo de Fosfo-STAT5

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

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

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

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

15 2.4.2.2.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con GM-CSF

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

20 2.4.2.2.2 Preparación de muestras de leucocitos y marcaje con CD14

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

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

30 2.4.2.2.3 Permeabilización de células y marcaje con anticuerpo anti Phospho-STAT5

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

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

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

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

2.4.2.2.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

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

45 2.4.2.3. Resultados

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

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

Ejemplo 3. Modelos in vivo

Ejemplo 3.1. Modelo AIC

5 3.1.1 Materiales

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

10 3.1.2. Animales

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

15 3.1.3 Artritis inducida por colágeno (AIC)

Un día antes del experimento, se preparó una solución CII (2 mg/ml) con ácido acético 0,05 M y se almacenó a 4 °C. Justo antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes iguales de adyuvante (IFA) y CII por medio de un dispositivo de homogeneización en una botella de vidrio pre-enfriada en un baño de agua con hielo. Se podría requerir adyuvante extra y homogeneización prolongada si no se formara ninguna emulsión.

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

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

30 3.1.4. Diseño del estudio

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

35 3.1.5. Evaluación clínica de la artritis

Se clasificó la artritis de acuerdo con el procedimiento de Khachigian 2006, Lin et al 2007 y Nishida et al 2004. Se clasificó el hinchamiento de cada una de las cuatro patas con la puntuación artrítica siguiente: 0 - sin síntomas; 1 - enrojecimiento moderado pero definitivo e hinchamiento de un tipo de articulación tal como tobillo o muñeca, o enrojecimiento aparente e hinchamiento limitado hasta dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados; 2 - enrojecimiento moderado e hinchamiento de dos o más tipos de articulaciones; 3 - enrojecimiento severo e hinchamiento de toda la pata incluyendo los dedos; 4 - extremidad con inflamación máxima con afectación de múltiples articulaciones (puntuación máxima acumulada de artritis clínica de 16 por cada animal) (Nishida y col., 2004).

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

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

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

5 3.1.6 Cambio de peso corporal (%) tras la aparición de la artritis

Clínicamente, la pérdida de peso corporal se asocia a la artritis (Shelton y col., 2005; Argiles y col., 1998; Rall, 2004; Walsmith y col., 2004). Además, se podrían usar los cambios en el peso corporal tras la aparición de artritis como criterio de valoración no específico para evaluar el efecto de las sustancias terapéuticas en el modelo de ratas. Se calculó el cambio en el peso corporal (%) tras la aparición de artritis como se muestra a continuación:

$$10 \quad \text{Ratones} = \frac{\text{Peso corporal}_{(\text{semana } 6)} - \text{Peso corporal}_{(\text{semana } 5)}}{\text{Peso corporal}_{(\text{semana } 5)}} \times 100 \%$$

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

15 3.1.7 Puntuación de Larsen

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

20 3.1.8 Radiología

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

3.1.9 Histología

Tras los análisis radiológicos, se fijaron las patas posteriores en formol tamponado con fosfato al 10 % (pH 7,4), se descalcificaron con agente de descalcificación ósea rápida para realizar la histología fina (Laboratories Eurobio) y se intercalaron en parafina. Para garantizar la evaluación amplia de las articulaciones con artritis, se cortaron al menos cuatro secciones en serie (de 5 µm de espesor) y cada una de las series de secciones estaba separada por 100 µm. Se tiñeron las secciones con hematoxilina y eosina (HyE). Se realizaron exámenes histológicos, doble ciego, para evaluar la inflamación sinovial y el daño óseo y sobre el cartílago. En cada pata, se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron infiltración celular, gravedad de granulación sinovial, erosión del cartílago y erosión ósea. Se realizó la puntuación como se muestra a continuación: 1 - normal, 2 - suave, 3 - moderada, 4 - marcada. Se sumaron estas cuatro puntuaciones juntas y se representaron como una puntuación adicional, concretamente la "puntuación total AR". Para permitir la comparación de las lecturas histológicas entre estudios, se dividió la puntuación histológica total de cada rata entre la puntuación histológica total media obtenida para el vehículo en el estudio al cual pertenece esa rata y se multiplicó por 100 (es decir, se expresa la puntuación histológica total como el porcentaje de la puntuación histológica total media del vehículo por estudio). Se calculó y se comparó la puntuación histológica total media de los diferentes grupos de tratamiento.

3.1.10 Análisis de tomografía micro-computarizada (µC) de calcáneo (hueso del talón)

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

del calcáneo (separados aproximadamente 10,8 µm).

3.1.11. Resultados

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

Ejemplo 3.2. Modelo de choque séptico

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

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

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

Ejemplo 3.3. Modelo MAB

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

0 Sin síntomas

1 Enrojecimiento moderado pero definitivo e hinchamiento de un tipo de articulación tal como tobillo o muñeca, o enrojecimiento aparente e hinchamiento limitado hasta dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados
 2 Enrojecimiento moderado e hinchamiento de dos o más tipos de articulaciones
 3 Enrojecimiento severo e hinchamiento de toda la pata incluyendo los dedos
 4 Extremidad con inflamación máxima con afectación de múltiples articulaciones

Ejemplo 3.4. Modelos oncológicos

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

Ejemplo 3.5 Modelo EII en ratón

Los modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas frente a la EII se describen por parte de Wirtz y col., 2007.

Ejemplo 3.6 Modelo de asma en ratón

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

Ejemplo 4 Modelos de Seguridad, DMPK y Toxicidad

Ejemplo 4.1. Solubilidad termodinámica

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

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

5 Trascorridas 24 h se transfieren 800 μ l de la muestra a un tubo Eppendorf y se centrifugan 5 min a 14000 rpm. Después, se transfieren 200 μ l del sobrenadante de la muestra a una placa MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50) y se filtra el sobrenadante (33,7-40,4 kPa) con ayuda de un colector de vacío al interior de una placa limpia de 96 pocillos con parte inferior con forma de V de polipropileno de Greiner (N.º de Cat. 651201). Se diluyen 5 μ l del filtrado en 95 μ l (F20) del mismo tampón utilizado para incubar en la placa que contenía la curva patrón (Greiner, N.º de Cat. 651201).

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

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

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

20 Se analizan las áreas con ayuda de un paquete de software Masslynx y se representan las áreas de los picos de las muestras frente a la curva patrón para obtener la solubilidad del compuesto.

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

Ejemplo 4.2 Solubilidad acuosa

25 Partiendo de una solución madre 10 mM en DMSO, se prepara una dilución seriada del compuesto en DMSO. Se transfieren las series de dilución a una placa Maxisorb NUNC 96 con parte inferior con forma de F (N.º de Cat. 442404) y se añade un tampón de fosfato 0,2 M pH 7,4 o tampón de citrato 0,1 M pH 3,0 a temperatura ambiente.

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

30 Se sellan las placas de ensayo y se incuban durante 1 h a 37 °C mientras se agitan a 230 rpm. Después, se detectan las placas bajo un microscopio de luz blanca, dando lugar a dibujos individuales de precipitado por concentración. Se analiza el precipitado y se convierte en un número que se representa sobre un gráfico. La primera concentración a la que aparece el compuesto completamente disuelto es la concentración que se notifica, sin embargo la concentración real se encuentra en algún punto entre esta concentración y una etapa de dilución superior.

35 Se presentan los valores de solubilidad en μ g/ml

Ejemplo 4.3 Unión de proteína plasmática (Diálisis de Equilibrio)

40 Se diluye una solución madre 10 mM del compuesto en DMSO con un factor de 5 en DMSO. Se diluye posteriormente esta solución en plasma recién descongelado de perro, ratón, rata o humano (BioReclamation INC) con una concentración final de 10 μ M y una concentración de DMSO final del 0,5 % (5,5 μ l en 1094,5 μ l de plasma en una placa de 96 pocillos de PP-Masterblock (Greiner, N.º Cat. 780285).

45 Se prepara una placa Pierce Red Device con insertos (ThermoScientific, N.º de Cat. 89809) y se llena con 750 μ l de PBS en la cámara del tampón y 500 μ l de plasma marcado en la cámara del plasma. Se incuba la placa durante 4 h a 37 °C mientras se agita a 230 rpm. Tras la incubación, se transfieren 120 μ l de ambas cámaras a 360 μ l de acetonitrilo en placas de pocillos profundos PP, de parte inferior redondeada, de 96 pocillos (Nunc, N.º de Cat. 278743) y se sellan con un borde de papel metalizado de aluminio. Se mezclan las muestras y se colocan sobre hielo durante 30 min. Después, se centrifuga esta placa 30 min a 1200 rcf a 4 °C y se transfiere el sobrenadante a una placa de PP de parte inferior con forma de v de 96 pocillos (Greiner, 651201) para análisis en CLEM.

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

Se analizan las muestras sobre CLEM con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A era amoníaco 15 mM y el disolvente B era acetonitrilo. Se analizó la muestra por pulverización iónica positiva en una columna XBridge C18

3,5 μ M (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo total de análisis de 2 min y varía del 5 % B al 95 % de B.

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

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

Ejemplo 4.4 Propensión a la prolongación de QT

Se evalúa el potencial de prolongación de QT en el ensayo de pinzamiento zonal de hERG.

10 4.4.1 Pinzamiento zonal convencional de células completas

Se realizan registros de pinzamiento zonal de células completas usando un amplificador EPC10 controlado por un software Pulse v8,77 (HEKA). Normalmente, la resistencia de la serie es menor de 10 M Ω y se compensa en más de un 60 %, a los registros no se les han restado las fugas. Se fabrican los electrodos a partir de pipetas de vidrio GC150TF (Harvard).

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

La solución de pipeta de zona interna contiene: gluconato de K 100 mM, KCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂ATP 5 mM, Glutación 2 mM, EGTA 11 mM, HEPEs 10 mM, pH 7,2.

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

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

25 4.4.2 Análisis de datos

Se calculan los valores de CI₅₀ y CI₂₀ para cada compuesto sometido a ensayo. Se calculan la diferencia en número entre la CI₂₀ y las concentraciones C_{máx} no unidas del compuesto de ensayo obtenidas a dosis terapéuticas relevantes, como viene determinado por medio de los resultados obtenidos para el modelo AIC de rata.

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

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

35 en la que a es la respuesta mínima, b es la respuesta máxima y d es la pendiente de Hill. Esta ecuación se puede usar para calcular tanto la CI₅₀ (en la que y = 50 y c es el valor de CI₅₀) como la CI₂₀ (en la que y = 20 y c es el valor de CI₂₀). Se usó un software GraphPad® Prism® (Graphpad® Software Inc.) para todo el ajuste de la curva. Una diferencia de 100 o más indica un bajo potencial para la prolongación de QT.

Ejemplo 4.5 Estabilidad microsómica

Se diluyó una solución madre 10 mM de compuesto en DMSO 1000 veces en un tampón de fosfato de 182 mM pH 7,4 en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, N.º de Cat. 780285) y se pre-incubó a 37 °C.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 **TABLA IX - Estabilidad microsómica**

Compuesto n.º	Ser humano	Rata
1	76-100 %	76-100 %

Ejemplo 4.6 Permeabilidad Caco2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

V = volumen de la cámara
 T_{inc} = tiempo de incubación
 Área superficial = 0,33 cm²

5 Se calcularon las proporciones de flujo de salida, como indicación del flujo de salida activo desde la superficie de la célula apical, usando la proporción de P_{ap} B>A / P_{ap} A>B.

Se usaron los siguientes criterios de aceptación del ensayo:

Propanolol: valor P_{ap} (A>B) ≥ 20 (x10⁻⁶ cm/s)

10 Rodamina 123 o Vinblastina: valor de P_{ap} (A>B) < 5 (x 10⁻⁶ cm/s) con proporción de flujo de salida ≥ 5.
 Permeabilidad de Lucifer Yellow: ≤ 100 nm/s.

TABLA X - Tasa de salida de flujo de Caco2

T	P _{ap} A>B (x 10 ⁻⁶ cm/s)	Proporción de descarga
1	7,8 ± 0,8	6,1 ± 0,6

Ejemplo 4.7 Estudio farmacocinético

15 4.7.1 Estudio farmacocinético en roedores

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

25 4.7.2. Estudio farmacocinético en perros

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

4.7.3 Cuantificación de los niveles de compuesto en plasma

35 Se determinan las concentraciones de plasma de cada compuesto de ensayo por medio de un procedimiento de CLEM/EM en el que se opera el espectrómetro de masas en modo de electronebulización positiva.

4.7.4 Determinación de parámetros farmacocinéticos

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

Ejemplo 4.8. Estudio de toxicidad de 7 días en ratas

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

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

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

Ejemplo 4.9 Estabilidad de hepatocitos

5 Se describen modelos para el aclaramiento metabólico en hepatocitos por parte de McGinnity y col. *Drug Metabolism and Disposition* 2008, 32, 11, 1247.

Se apreciará por parte de los expertos en la técnica que las descripciones anteriores son a modo de ejemplo y explicativas en su naturaleza, y como se ha indicado pretenden ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas. A través de la experimentación sistemática, un experto reconocerá modificaciones y variaciones evidentes. De este modo, la invención no pretende quedar definida por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

REFERENCIAS

- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. (1998) *Catabolic proinflammatory cytokines*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1:245-51.
- 15 Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. (2002) *Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein*. *Arthritis Rheum*. 46:802-5.
- Choy EH, Panayi GS. (2001). *N Engl J Med*. 344:907-16.
- Chubinskaya S y Kuettner KE (2003). *Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(9):1323-1340.
- 20 Clegg DO y col. (2006) *N Engl J Med*. 2006 354:795-808. *Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis*.
- Constantinescu y col., 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3):122-131.
- Firestein GS. (2003). *Nature*. 423:356-61.
- Geron y col. (2008) *Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors* *Cancer Cell* 13 (4), 321-30.
- 25 Ip y col. (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.
- Jou IM, Shiau AL, Chen SY, Wang CR, Shieh DB, Tsai CS, Wu CL. (2005) *Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*. 52:339-44.
- 30 Kachigian LM. (2006) *Collagen antibody-induced arthritis*, *Nature Protocols* 2512-2516.
- Khachigian, L. M. *Collagen antibody-induced arthritis*. (2006) *Nature Protocols* 1, 2512-6.
- Kudlacz y col. (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.
- 35 Lee DM, Weinblatt ME (2001). *Lancet*. 358:903-11.
- Legendre F, Dudhia J, Pujol J-P, Bogdanowicz P. (2003) *JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes*. *J Biol Chem*. 278(5):2903-2912.
- 40 Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. (2001) *Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires janus kinase/STAT signaling pathway*. (2001) *J Immunol* 166:3491-3498.
- Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clément-Lacroix P. (2007) *Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents*. *Br J Pharmacol*. Abril; 150 (7):829-31.
- 45 Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen I-M, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP Willmane CL; (2009) *JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia*, *PNAS* 22 de mayo. [Epub antes de la impresión].
- Nials y col. (2008) *Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge, Disease Models & Mechanisms*, 213-220.
- 50 Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, Yoshida A, Yamana J, Yamamura M, Ninomiya Y, Inoue H, Asahara H. (2004) *Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression*. *Arthritis Rheum*. 10:3365-76.
- O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., *Nature Reviews*, 2004, 555-564.
- 55 O'Dell JR. (2004) *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*. 350(25):2591-602.
- Osaki M, Tan L, Choy BK, Yoshida Y, Cheah KSE, Auron PE, Goldring MB. (2003) *The TATA-conatining core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1alpha, JAK1 and JAK2*. *Biochem J* 369:103-115.
- Oste L y col., *ECTC Montreal 2007: A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine AIC model by micro-CT morphometry*.
- 60 Otero R, Lago R, Lago F, Gomez Reino JJ, Gualillo O. (2005) *Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1*. *Arthritis Research & Therapy*

7:R581R591.

Pernis y col. (2002) *JAK-STAT signaling in asthma* *J. Clin. Invest.* 1279.

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

5 Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Schreiber RD. (1998) *Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine-induced biologic responses* *Cell* 93:373-383.

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

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

Sims NA y col., (2004) *Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis.* *Arthritis Rheum.* 50 2338-2346.

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

Smolen JS, Steiner G. (2003). *Nat Rev Drug Discov.* 2:473-88.

Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383.

20 Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto y Tadimitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (supl. 3):S233-S242.

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

Wernig y col. (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.

25 Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. (2005). *Nat Rev Drug Discov.* 4:331-44. *Osteoarthritis an untreatable disease?*

Wirtz y col. (2007) *Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease, Advanced Drug Delivery Reviews*, 1073-1083.

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

30 A partir de la descripción anterior, a los expertos en la técnica se les ocurrirán diversas modificaciones y cambios en las composiciones y procedimientos de la invención. Se pretende que todas las modificaciones que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas queden incluidas en el presente documento.

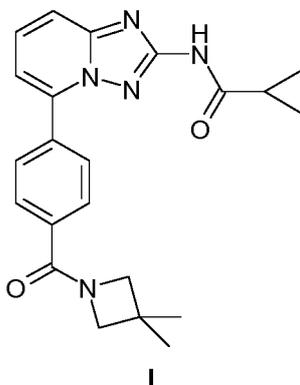
35 Debería entenderse que factores tales como la capacidad de penetración celular diferencial de los diversos compuestos pueden contribuir a discrepancias entre la actividad de los compuestos en los ensayos celulares y bioquímicos *in vitro*.

40 El nombre químico del compuesto de la invención como se proporciona y se explican en la presente solicitud, pueden haberse generado de manera automática por medio del uso de un programa de software de nomenclatura química disponible a nivel comercial y puede no haberse verificado de forma independiente. Los programas representativos que desempeñan esta función incluyen la herramienta de nomenclatura Lexichem comercializada por Open Eye Software, Inc. y la herramienta Autonom Software comercializada por MDL, Inc. En el caso que el nombre químico difiera de la estructura mostrada, se otorgará prioridad a la estructura representada.

45 Se prepararon estructuras químicas mostradas en el presente documento usando ya sea ChemDraw® o ISIS®/DRAW. Cualquier valencia abierta que aparezca en un átomo de carbono, oxígeno o nitrógeno en las estructuras del presente documento indica la presencia de un átomo de hidrógeno. Cuando exista un centro quiral en la estructura, pero no se muestre ninguna estereoquímica específica para dicho centro quiral, ambos enantiómeros asociados a la estructura quiral se incluyen en la estructura.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias o enfermedades intestinales inflamatorias.
2. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la afección es osteoartritis.
3. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la afección es enfermedades intestinales inflamatorias.
- 10 4. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.
- 15 5. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento, prevención o profilaxis de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro de la renovación del cartílago o malformaciones congénitas del cartílago.