

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 758**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/61** (2006.01)

**C07C 311/20** (2006.01)

**A61K 31/18** (2006.01)

**A61K 31/4418** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2014 PCT/GB2014/051921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2014 E 14735642 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 3013799**

54 Título: **N-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-fenil-bencenosulfonamidas y N-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-(2-piridil)bencenosulfonamidas y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

**26.06.2013 GB 201311361**

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

**13.11.2017**

73 Titular/es:

**PIMCO 2664 LIMITED (100.0%)  
The Walbrook Building 25 Walbrook  
London EC4N 8AF, GB**

72 Inventor/es:

**PATEL, LISA;  
SMITH, STEPHEN ALLAN;  
GREIG, IAIN ROBERT y  
WILLIAMS, SAMUEL CAMERON**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 641 758 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

N-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-fenil-bencenosulfonamidas y N-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-(2-piridil)bencenosulfonamidas y su uso terapéutico

5 **Campo técnico**

La presente invención está relacionada, en términos generales, con el campo de los compuestos terapéuticos. Más específicamente la presente invención está relacionada con ciertos compuestos de N-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-fenil-bencenosulfonamida y N-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-(2-piridil)bencenosulfonamida sustituidos (denominados colectivamente en el presente documento compuestos HMC) que son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos (por ejemplo, enfermedades) que incluyen, inflamación y/o destrucción articular y/o pérdida ósea; trastornos mediados por activación excesiva y/o inapropiada y/o prolongada del sistema inmune; trastornos inflamatorios y autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide; psoriasis; artritis psoriática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); asma; aterosclerosis; enfermedad inflamatoria del intestino; espondilitis anquilosante; esclerosis múltiple; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; un trastorno asociado con pérdida ósea, tal como pérdida ósea asociada a una actividad excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, o enfermedad de Paget; cáncer, tal como tumor maligno hematológico, tal como mieloma múltiple, leucemia, o linfoma, o un cáncer de tumor sólido, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama (mujeres y/o hombres), cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer tiroideo, ameloblastoma de células basales, o melanoma; un trastorno asociado a fibrosis, tal como esclerosis sistémica o esclerodermia; o una vasculitis infrecuente, tal como enfermedad de Behçet. La presente invención también está relacionada con composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos, y el uso de tales compuestos y composiciones, por ejemplo, en terapia.

**Antecedentes**

30 En el presente documento se citan diversas publicaciones con el fin de describir y desvelar más completamente la invención y el estado de la técnica con la que está relacionada la invención. Cada una de estas publicaciones se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad en la presente divulgación, en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación individual se incorpora por referencia.

35 En la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o un grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

40 Se ha de observar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el", y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. De ese modo, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de tales vehículos, y similares.

45 Los intervalos se expresan a menudo en el presente documento como de "aproximadamente" un valor particular, y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye de el un valor particular y/o al otro valor particular. De forma análoga, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se ha de entender que el valor particular forma otra realización.

50 La presente divulgación incluye información que puede ser útil en la comprensión de la presente invención. No es una admisión que cualquiera de las informaciones proporcionadas en el presente documento sea técnica anterior o sea pertinente a la invención reivindicada actualmente, o que cualquier publicación a la que se haga referencia específica o implícitamente sea técnica anterior.

55 Enfermedad inflamatoria crónica

La inflamación es la respuesta inmune de los tejidos debida a una lesión corporal. La inflamación aguda es una respuesta normal y protectora que protege y cura el cuerpo después de una lesión física o una infección, caracterizada por calor, hinchamiento, y enrojecimiento en el sitio de la lesión. Sin embargo, si la inflamación persiste durante un periodo prolongado se vuelve crónica. La inflamación crónica es un distintivo de, y un factor que contribuye a, diversas patologías que incluyen artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y psoriasis.

65 El proceso inflamatorio es complejo e implica una cascada biológica de señales moleculares y celulares que alteran las respuestas fisiológicas. En el sitio de la lesión, las células liberan señales moleculares tales como citoquinas e interleuquinas que causan diversos cambios en el área afectada que incluyen dilatación de los vasos sanguíneos,

aumento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad vascular, invasión de leucocitos (células sanguíneas blancas), y exudado de fluidos que contienen proteínas tales como inmunoglobulinas (anticuerpos). Varios tipos diferentes de leucocitos, incluyendo granulocitos, monocitos, y linfocitos, están implicados en la cascada inflamatoria. Sin embargo, la inflamación crónica está mediada principalmente por monocitos y macrófagos de vida larga; los monocitos maduran en macrófagos una vez abandonan la corriente sanguínea y entran en los tejidos. Los macrófagos tragan y digieren los microorganismos, los invasores extraños, y las células senescentes y los macrófagos liberan varios mediadores químicos diferentes, incluyendo el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23) y prostaglandinas que perpetúan la respuesta inflamatoria. En los últimos estadios, otras células, incluyendo linfocitos, invaden los tejidos afectados.

De ese modo, existe una patología común que subyace a una gran diversidad de afecciones inflamatorias crónicas. Además, las características de la inflamación crónica también se observan en otras enfermedades que incluyen cáncer y enfermedades metabólicas tales como obesidad y diabetes.

Una de las afecciones inflamatorias crónicas más comunes es la artritis reumatoide (RA), una afección que afecta hasta a un 2 % de la población a nivel mundial. Aunque es una enfermedad compleja, existen diversos factores fisiológicos, celulares, y bioquímicos asociados al progreso de RA que son comunes a otras diversas enfermedades, que incluyen aquellas con un componente de autoinmunidad (por ejemplo, esclerosis múltiple), inflamación (por ejemplo, aterosclerosis y cáncer), pérdida ósea (por ejemplo, osteoporosis) y proliferación (por ejemplo, tumores malignos hematológicos). Esto hace de la RA importante no solo para el estudio de una diversidad mucho más amplia de enfermedades, sino también sugiere que los agentes farmacéuticos que trabajan a través de la modificación de estos procesos comunes pueden tener utilidad más allá de la RA. Esto último se ha confirmado mediante la práctica clínica donde se ha mostrado que los fármacos de RA tienen una amplia utilidad en otras diversas afecciones.

#### Artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes/inflamatorias relacionadas

La artritis reumatoide (RA) es un trastorno autoinmune caracterizado por inflamación crónica del revestimiento sinovial de múltiples articulaciones acoplado a la degradación progresiva de la articulación. La RA afecta habitualmente a las articulaciones de la muñeca y las manos y también puede afectar a los codos, hombros, cadera, cuello y rodillas conduciendo a un dolor y discapacidad importantes (véase, por ejemplo, Scott *et al.*, 2010). La Organización Mundial de la Salud predice que 23,7 millones de personas padecen RA, con una incidencia creciente debido a la asociación entre la afección y la edad creciente.

La causa exacta de la RA, así como de todos los trastornos autoinmunes, sigue sin estar clara, aunque los posibles desencadenantes incluyen reducción de la autotolerancia, una respuesta anómala a los factores ambientales, agentes infecciosos, y estímulos hormonales (véanse, por ejemplo, Klareskog *et al.*, 2006; Firestein *et al.*, 2005).

A nivel celular, el desarrollo de RA comienza habitualmente con linfocitos T que se infiltran en la membrana sinovial que reviste la articulación afectada; esto conduce a continuación a la activación de monocitos, macrófagos y fibroblastos sinoviales a modo de contacto célula-célula y la posterior liberación de diversas citoquinas, incluyendo factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) e interleuquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 (véase, por ejemplo, Astry *et al.*, 2011). Estas citoquinas proinflamatorias son a continuación decisivas en la orquestación de diversas cascadas complejas de transducción de señales, que incluyen las rutas de NF $\kappa$ B, el factor regulador de interferón (IRF), el receptor de tipo Toll (TLR), y Jak/STAT (véase, por ejemplo, Malemud *et al.*, 2010) que conducen a la inducción de genes que codifican diversos productos que propagan la respuesta inflamatoria y además estimulan la destrucción de tejido. Estos productos incluyen enzimas degradadoras de tejido tales como colagenasas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), catepsinas, y otros factores proinflamatorios tales como selectinas, integrinas, leucotrienos, prostaglandinas, quimioquinas, y otras citoquinas (véase, por ejemplo, McInnes *et al.*, 2007; Smolen *et al.*, 2003). Además, estas células también aumentan la producción de las MMP, lo que conduce a la degradación de la matriz extracelular y a la pérdida del cartílago en la articulación (véase, por ejemplo, Sun, 2010), un proceso que también implica una clase especializada de células conocida como osteoclastos y un factor conocido como activador del receptor del ligando kappa-B del factor nuclear (RANKL) (véase, por ejemplo, Takayanagi, 2009).

RANKL es un factor esencial para la generación de osteoclastos, y la regulación positiva de la producción de RANKL conduce al aumento de la diferenciación de osteoclastos y finalmente a la destrucción ósea (véase, por ejemplo, Long *et al.*, 2012). La respuesta inflamatoria en RA conduce a la acumulación de linfocitos, células dendríticas, y macrófagos, todo ello operando localmente para producir citoquinas y otros mediadores proinflamatorios tales como TNF $\alpha$  e IL-6 que además potencian los efectos de RANKL en la destrucción ósea. Además, la cascada inflamatoria conduce a la hiperplasia de sinoviocitos (véase, por ejemplo, Takayanagi, 2009), que a su vez conduce al espesamiento y la vascularización del sinovio en un tejido destructivo y agresivo conocido como pannus. El pannus contiene tanto osteoclastos, que destruyen el hueso, como metaloproteinasas, que están implicadas en la destrucción del cartílago. Como tal, el eje RANKL es fundamental para el progreso y la patología de RA así como para el sistema osteoimmune (la interacción entre los sistemas óseo e inmune), que es fundamental para la patología de diversas diferentes patologías que se describen posteriormente.

### Papel de TNF $\alpha$ en RA

La superfamilia TNF de receptores y ligandos desempeña un papel principal en la causalidad de la inflamación y la pérdida ósea local y sistémica asociada. TNF $\alpha$  es un potente agente proinflamatorio que regula numerosos aspectos de la función de los macrófagos. Se libera rápidamente después de traumatismo, infección, o exposición a LPS derivados de bacterias y se ha mostrado que es uno de los mediadores tempranos más abundantes en el tejido inflamado. Entre sus diversas funciones se encuentra su papel principal en la orquestación de la producción de una cascada de citoquinas proinflamatorias. Además de las citoquinas proinflamatorias, TNF $\alpha$  también aumenta los mediadores de transducción de señal de lípidos tales como las prostaglandinas. Basándose en estos papeles, TNF $\alpha$  se ha propuesto como el protagonista principal en la activación y reclutamiento celular inflamatorio y se sugiere que desempeña un papel crítico en el desarrollo de numerosas enfermedades inflamatorias crónicas que incluyen artritis reumatoide (véanse, por ejemplo, Liu, 2005; Feldmann *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 1996; Brennan *et al.*, 1992). La importancia de TNF $\alpha$  en RA se recalca mediante el descubrimiento de que los anticuerpos que bloquean TNF $\alpha$  pueden prevenir la inflamación en modelos animales de RA, y que la terapia anti-TNF $\alpha$  es en la actualidad el tratamiento más eficaz para RA (véase, por ejemplo, Pisetsky, 2012, y los detalles adicionales que se proporcionan posteriormente).

El propio TNF $\alpha$  promueve una cascada de señalización que conduce a la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP-1 (véase, por ejemplo, Parameswaran *et al.*, 2010). La unión de TNF $\alpha$  e IL-1 a sus respectivos receptores conduce al reclutamiento de transductores de señal corriente abajo denominados TRAF. Los TRAF reclutan quinasas adicionales, y el complejo de quinasas resultante activa la ruta MAP-quinasa, que conduce finalmente a la activación de AP-1, y la fosforilación de I $\kappa$ B quinasa. I $\kappa$ B es el inhibidor de NF $\kappa$ B, que actúa previniendo la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo. La fosforilación de I $\kappa$ B mediante I $\kappa$ B quinasa conduce a la degradación de I $\kappa$ B. Una vez se ha degradado I $\kappa$ B, NF $\kappa$ B migra al núcleo, donde estimula la transcripción de genes antiapoptóticos, que estimulan la supervivencia de los linfocitos T y B, prolongando de ese modo la respuesta inmune. Esta prolongación de la respuesta inflamatoria es fundamental para la naturaleza crónica de la RA. La importancia de la activación de NF $\kappa$ B se demuestra por el hecho de que la inhibición de la actividad de NF $\kappa$ B mediante péptidos inhibidores puede prevenir la artritis en modelos animales de RA (véase, por ejemplo, Jimi *et al.*, 2004).

### Otros factores fundamentales en la artritis reumatoide

Como se ha descrito anteriormente, diversos factores además de TNF $\alpha$  y NF $\kappa$ B actúan para estimular la inflamación en RA y otras enfermedades inflamatorias crónicas. Entre estos se encuentran IL-6 y los factores reguladores de interferón (IRF).

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina proinflamatoria cuyos niveles aumentan tras la activación de diversas células del sistema inmune durante la inflamación en RA, principalmente macrófagos y linfocitos T. Tiene efectos pleiotrópicos en la enfermedad a través de su papel fundamental en la respuesta de fase aguda y está implicada en gran medida en gobernar la transición de inflamación aguda a crónica. Lleva a cabo esto modificando la composición del infiltrado de células sanguíneas blancas en el espacio inflamatorio, convirtiéndola de neutrófilos en monocitos/macrófagos (véase, por ejemplo, Gabay, 2006). Además, IL-6 ejerce efectos estimulantes sobre los linfocitos T y B, favoreciendo de ese modo las respuestas inflamatorias crónicas, así como sobre los osteoclastos, estimulando de ese modo la renovación del hueso. Estos efectos están implicados en la patología de una amplia diversidad de enfermedades autoinmunes/inflamatorias más allá de RA, que incluyen lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis, psoriasis, artritis psoriática, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de Sjogren, aterosclerosis, y enfermedad inflamatoria del intestino, así como en cánceres tales como mieloma múltiple y cáncer de próstata.

Además, IL-6 se ha visto implicada en enfermedades que implican pérdida ósea (por ejemplo, osteoporosis), enfermedades mediadas por fibrosis (por ejemplo, esclerosis sistémica), diabetes, rechazo a trasplante, diversos cánceres (incluyendo, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma, cáncer de próstata), enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), trastornos psiquiátricos (por ejemplo, depresión), y ciertas vasculitis infrecuentes (por ejemplo, enfermedad de Behçet). Para una revisión completa, véase, por ejemplo, Rincon, 2012.

Los factores reguladores de interferón (IRF) consisten en una familia de factores de transcripción con diversas funciones en la regulación transcripcional de las respuestas celulares en la salud y la enfermedad. Los IRF contienen habitualmente un dominio de unión a ADN en el extremo N-terminal, conteniendo la mayoría de los miembros también un dominio C-terminal asociado a IRF que media interacciones proteína-proteína. Se han identificado diez IRF y diversos homólogos de IRF codificados por virus. Los IRF se activan en respuesta a estímulos endógenos y microbianos durante una respuesta inmune, y modulan selectiva y cooperativamente la expresión de citoquinas y factores de transcripción clave implicados en diversos procesos inflamatorios. Por ejemplo, la estimulación del receptor para el lipopolisacárido bacteriano TLR-4 activa una cascada de señalización que activa tanto NF $\kappa$ B como IRF-5, mientras IRF-7 se activa mediante un proceso que implica la familia STAT de factores de transcripción, que también se activan, pero independientemente, mediante IL-6.

La activación de los IRF conduce diversos efectos corriente abajo que incluyen la especificación del destino de los macrófagos (véase, por ejemplo, Krausgruber *et al.*, 2011), la diferenciación de linfocitos T colaboradores (véase, por ejemplo, Zhang *et al.*, 2012) y la proliferación de linfocitos B (véase, por ejemplo, Minamino *et al.*, 2012). Estos diversos papeles en la enfermedad están recalcados por datos de modelos animales con supresión génica que muestran, por ejemplo, niveles reducidos de IL-6 y TNF $\alpha$  en respuesta a estímulos inflamatorios (véase, por ejemplo, Takaoka *et al.*, 2005).

Además de los papeles biológicos de los IRF descritos anteriormente, se han asociado genéticamente varios miembros de la familia de IRF a predisposición a afecciones inflamatorias. Por ejemplo, los polimorfismos en IRF-3 e IRF-7 están asociados a susceptibilidad a lupus eritematoso sistémico (véanse, por ejemplo, Akahoshi *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011). Además, IRF-5, que controla el destino de los macrófagos, está asociado a susceptibilidad a RA, lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, síndrome de Sjogren, y esclerosis sistémica (véanse, por ejemplo, Sharif *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2011).

### 15 Tratamiento de la artritis reumatoide

Las terapias tempranas para RA se centran en controlar los síntomas de la enfermedad, principalmente por reducción de la inflamación, en lugar de retardar el progreso de la enfermedad. Estos fármacos incluían AINE tales como aspirina, diclofenaco, y naproxeno. La inflamación se controlaba además mediante glucocorticoides, y su combinación con AINE proporcionaba un control a corto plazo razonablemente eficaz de la inflamación. Más recientemente, se ha introducido un enfoque más agresivo para el tratamiento de RA que comienza en el inicio de la enfermedad, usando los denominados fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARD), que actúan para ralentizar o incluso prevenir el progreso de la enfermedad. Estos incluyen diversos fármacos más antiguos, incluyendo sales de oro; sulfasalazina; antimaláricos tales como hidroxicloroquina; D-penicilamina; inmunosupresores tales como ácido micofenólico, azatioprina, ciclosporina A, tacrólimus y sirólimus; minociclina; leflunomida; y de la forma más importante, metotrexato (véase, por ejemplo, Smolen *et al.*, 2003).

El metotrexato es en la actualidad la terapia estándar de oro para las comparaciones de ensayos clínicos, y se usa generalmente en combinación con terapias más recientes. Es eficaz en la mayoría de los pacientes pero, en común con la totalidad de los agentes anteriores, tiene efectos secundarios gastrointestinales significativos, lo que conduce a que aproximadamente un 50 % de los pacientes tengan que abandonar finalmente el tratamiento (véase, por ejemplo, Mount *et al.*, 2005). Una desventaja adicional de estos DMARD más antiguos es la cantidad de tiempo que transcurre para que el fármaco inicie la acción, variando de semanas con el metotrexato, a meses con las sales de oro. Aunque las remisiones completas solo se producen en aproximadamente una cuarta parte de los pacientes, para aquellos que no muestran ningún efecto generalmente no es posible detener la terapia sin padecer el riesgo de un rebote más violento de la enfermedad (véase, por ejemplo, Smolen *et al.*, 2003).

En los últimos años, el tratamiento de RA se ha visto revolucionado por el advenimiento de los agentes biológicos que fijan como diana rutas inflamatorias específicas. En la actualidad se han aprobado varios agentes biológicos para su uso en RA incluyendo compuestos biológicos anti-IL-6 e IL-1 tales como tocilizumab (Actemra®) y anakinra (Kineret®) (véase, por ejemplo, Scott *et al.*, 2010). Sin embargo, los primeros y más importantes agentes biológicos son las terapias anti-factor de necrosis tumoral (anti-TNF).

Las terapias anti-TNF $\alpha$  son el tratamiento líder del mercado para RA. Están disponibles diversos agentes anti-TNF $\alpha$  que incluyen anticuerpos neutralizadores tales como infliximab (Remicade®; J&J y Schering Plough) y adalimumab (Humira®; Abbott), o receptores señuelos tales como etanercept (Enbrel®; Amgen y Wyeth), representando ambos tratamientos validados y altamente eficaces para RA así como para otras enfermedades tales como enfermedad de Crohn y psoriasis. También se están investigando diversos otros trastornos inflamatorios y autoinmunes como dianas potenciales. Otros enfoques para bloquear la acción del TNF $\alpha$  incluyen el fragmento anti-TNF $\alpha$  pegilado certolizumab (Cimzia®, UCB). Todas estas terapias actúan, en última instancia, para prevenir la activación de los efectores corriente abajo del TNF $\alpha$  descritos anteriormente, incluyendo NF $\kappa$ B. Sin embargo, a pesar de su éxito en el mercado, las terapias anti-TNF $\alpha$  adolecen de diversos efectos secundarios que incluyen un aumento del riesgo de ciertos tumores malignos tales como linfoma e infecciones graves tales como Legionela y Listeria, así como un aumento de riesgo de insuficiencia cardíaca, reactivación de hepatitis B, y enfermedad desmielinizante.

Finalmente, y de forma más reciente, un inhibidor de JAK quinasa, tofacitinib (Xeljanz®, Pfizer) ha complementado el abanico de tratamientos de RA. Sin embargo, tofacitinib adolece de diversas preocupaciones de seguridad que incluyen un aumento del riesgo de infecciones graves así como un aumento del riesgo de perforaciones gastrointestinales, lesión hepática, y ciertos cánceres, que es probable que limite su uso en los hombres (véase, por ejemplo, O'Shea *et al.*, 2013).

Como tal, sigue existiendo la necesidad de terapias nuevas y mejoradas para RA y otras enfermedades inflamatorias con énfasis particular en la mejora de la seguridad.

Sistema osteoinmune y trastornos óseos

El sistema osteoinmune es el término para la interacción combinada y relacionada entre el sistema inmune y el sistema esquelético.

5 En condiciones fisiológicas normales, el sistema esquelético proporciona soporte, movilidad, protección para los órganos vitales, y la reserva mineral de calcio y fosfato. Con el fin de conseguir y adaptarse a estas funciones, el esqueleto existe en un equilibrio dinámico caracterizado por una continua reabsorción ósea mediada por osteoclastos y deposición ósea mediada por osteoblastos (véase, por ejemplo, Karsenty *et al.*, 2002). Este proceso biológico se ha denominado "remodelación" ósea y se produce de forma acoplada con osteoblastos que producen factores clave de diferenciación de osteoclastos, incluyendo RANKL, descrito anteriormente, y osteoclastos que estimulan la formación ósea mediante la producción de mediadores osteoblásticos a medida que degradan el hueso.

15 Las células inmunes tanto innatas como adaptativas ejercen efectos sobre osteoclastos y osteoblastos a través de diversos mediadores de la superficie celular y segregados (véase, por ejemplo, Takayanagi, 2009). La activación del receptor de RANKL (RANK) en precursores de osteoclastos inicia una cascada de cambios transcripcionales que dan como resultado la formación de osteoclastos y la expresión de la maquinaria necesaria para la reabsorción ósea incluyendo las moléculas necesarias para unión al hueso, secreción de ácido, y proteolisis. Muchos de los factores de transcripción importantes para la diferenciación de los osteoclastos son reguladores clave de respuestas inmunes, tales como NFκB y el factor nuclear de linfocitos T activados c1 (NFATc1) y este proceso también está potenciado por factores implicados en la inflamación tales como TNFα e IL-6.

20 Además de su papel fundamental en el progreso y la patogénesis de RA, el sistema osteoinmune desempeña un papel fundamental en otras diversas enfermedades incluyendo osteoporosis y otros trastornos óseos y cáncer (véase, por ejemplo, Dallas *et al.*, 2011).

30 La osteoporosis es una enfermedad común caracterizada por una reducción de la densidad ósea, deterioro del tejido óseo, y un aumento del riesgo de fractura. Numerosos factores contribuyen a la patogénesis de la osteoporosis incluyendo una dieta pobre, falta de ejercicio, fumar, y la ingesta excesiva de alcohol. La osteoporosis también surge junto con enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, enfermedades endocrinas tales como tirotoxicosis, y con ciertos tratamientos farmacológicos tales como tratamiento con glucocorticoides. De hecho, las fracturas por fragilidad relacionada con osteoporosis representan una de las complicaciones más importantes que se producen en pacientes con enfermedades reumáticas tales como RA, lupus eritematoso sistémico, y espondilitis anquilosante.

35 La enfermedad ósea de Paget es una afección común de causa desconocida, caracterizada por un aumento de la renovación ósea y remodelación ósea desorganizada, con áreas de aumento de actividad osteoclástica y osteoblástica. Aunque el hueso de Paget es a menudo más denso de lo normal, la arquitectura anómala hace que el hueso sea mecánicamente débil, dando como resultado deformidad del hueso y aumento de la susceptibilidad de fractura patológica.

40 Se ha mostrado que la señalización de IL-6, TNFα, y RANKL desempeña un papel principal en la sobreactividad de osteoclastos y el aumento consecuente en la pérdida ósea (véanse, por ejemplo, Tanaka *et al.*, 2003; Roodman, 2006). El uso de fármacos que afectan a estas rutas se ha validado mediante la finalización de los ensayos clínicos del anticuerpo monoclonal frente a RANKL, AMG-162 (Denosumab®, Amgen), para el tratamiento de osteoporosis/mieloma múltiple, así como mediante el cuerpo creciente de evidencias que muestran que las terapias anti-TNFα y anti-IL-6 también previenen la pérdida ósea en enfermedades artríticas (véanse, por ejemplo, Ogata *et al.*, 2012; Billau, 2010).

50 Sistema osteoinmune y cáncer

Numerosos tipos de cáncer afectan al hueso. La enfermedad ósea asociada a cáncer se puede manifestar mediante la aparición de hipercalcemia o el desarrollo de metástasis osteolíticas y/u osteoescleróticas. El aumento de reabsorción ósea osteoclástica desempeña un papel principal en la patogénesis de ambas afecciones. Aunque casi cualquier cáncer se puede complicar con metástasis ósea, las fuentes más comunes son mieloma múltiple, carcinoma de mama, y carcinoma de próstata. Los tumores más comunes asociados a hipercalcemia son mieloma múltiple, carcinoma de mama, y carcinoma de pulmón.

60 Como se ha descrito anteriormente, la señalización de RANK/RANKL es esencial para la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea que se produce durante la remodelación esquelética. Aunque los niveles fisiológicos de señalización de RANK/RANKL estimula la proliferación y la supervivencia celular de células del epitelio mamario, se ha mostrado recientemente que la señalización anómala de RANK/RANKL en estos tejidos influye en el inicio y el progreso de la tumorigénesis de mama y se ha mostrado que el bloqueo de la señalización de RANKL usando denosumab (Xgeva®, Amgen) es eficaz en la prevención de complicaciones secundarias de metástasis ósea, tales como fractura patológica, e hipercalcemia en pacientes con cáncer de mama (véase, por ejemplo, Steger *et al.*, 2011).

Las terapias que bloquean la señalización de RANK/RANKL también pueden disminuir la capacidad de los cánceres osteotrópicos para metastatizarse al hueso. Se ha mostrado que la señalización a través de RANK en la superficie de células tumorales epiteliales humanas así como células de melanoma induce una respuesta quimiotáctica en estas células tumorales mientras que en un modelo murino de metástasis de melanoma, el tratamiento terapéutico de ratones con osteoprotegrina, que neutraliza el receptor de RANKL, RANK, reduce significativamente la carga tumoral en los huesos pero no en otros órganos.

Además del papel de RANKL en el cáncer, existe la evidencia creciente de que la activación de NFκB a través de moléculas tales como TNFα puede desempeñar un papel principal en la promoción y el progreso tanto de tumores malignos hematológicos, tales como mieloma y linfomas, como de tumores sólidos, tales como cáncer de mama, próstata, y pulmón (véase, por ejemplo, Baud *et al.*, 2009). También existe una conciencia creciente del papel y la importancia de la inflamación y el sistema osteoimmune en el cáncer y en el desarrollo de resistencia a radioterapia y a agentes quimioterapéuticos. Además, se ha sugerido que la inflamación es de hecho uno de los distintivos básicos del cáncer (véase, por ejemplo, Mantovani, 2009). La mejora de la eficacia de los tratamientos anticancerígenos mediante la prevención de la activación de NFκB es por lo tanto una estrategia prometedora para aumentar los regímenes terapéuticos existentes y en la actualidad se encuentran investigación, de la forma más notable para el tratamiento de mieloma múltiple.

Los defectos en las rutas apoptótica es normal es también están implicados en la evolución y el progreso del crecimiento celular tumoral así como de la inflamación. La apoptosis (muerte celular programada) desempeña un papel principal en la retirada de las células anómalas; los defectos en las cascadas de señalización, que conducirían normalmente a su inducción, desempeñan un papel principal en la oncogénesis. La radioterapia y numerosos agentes quimioterapéuticos actúan causando lesiones celulares, que inducirían normalmente apoptosis; los defectos en la ruta también reducirían por lo tanto la eficacia de tales agentes. Se conoce que las moléculas efectoras más importantes en la ruta de señalización que conduce a la apoptosis son las caspasas, que se pueden desencadenar mediante diversos estímulos, incluyendo la unión de TNFα a su receptor. Se han descubierto mutaciones en los genes que codifican las caspasas en diversos tipos de tumores, incluyendo los cánceres gástrico, de mama, de células renales, y de cuello uterino así como habitualmente en linfoma linfoblástico de linfocitos T y ameloblastomas de células basales (véase, por ejemplo, Philchenkov *et al.*, 2004). Los compuestos que activan las caspasas, y de ese modo las células sensibles a la apoptosis, serían altamente eficaces como terapias para el cáncer ya sea como agentes individuales o en la potenciación de la eficacia de la quimioterapia y radioterapia para cáncer existente.

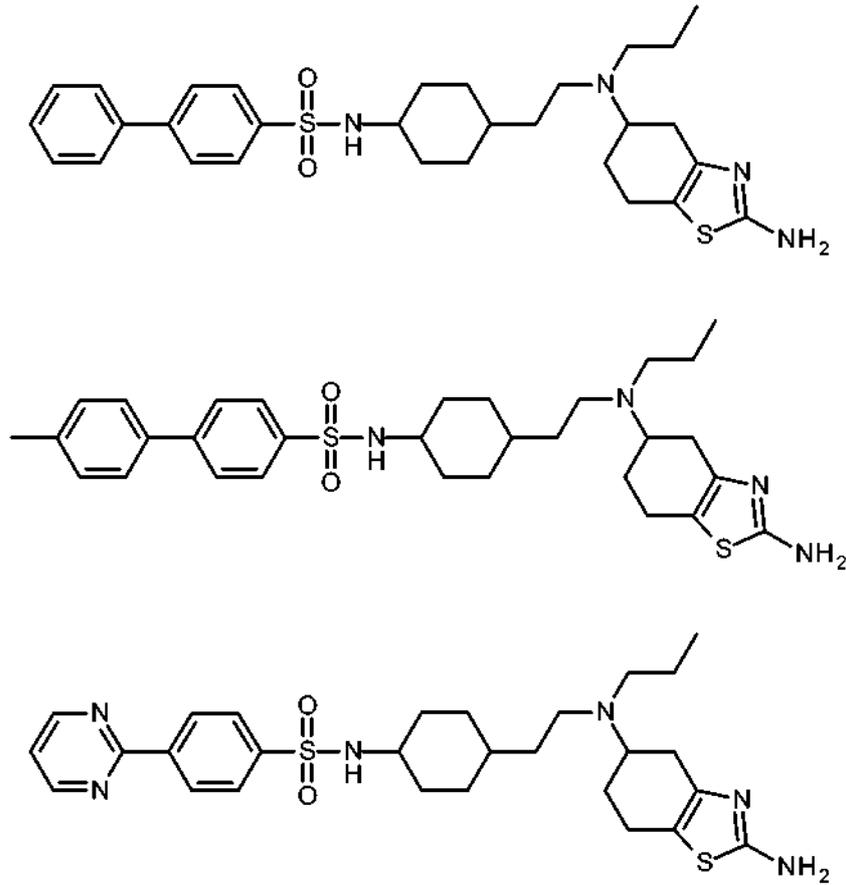
#### Agentes que evitan la inflamación altere el sistema osteoimmune

Los inventores han identificado los compuestos que, por ejemplo, previenen la inflamación y la pérdida ósea, y de ese modo se pueden usar en el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio o autoimmune, que incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), uveítis, enfermedad inflamatoria pélvica, endometriosis, psoriasis y artritis psoriática; enfermedades que implican pérdida ósea, que incluyen, por ejemplo, pérdida ósea asociada a artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea de Paget, y mieloma múltiple; así como cáncer asociado a la activación de NFκB, con señalización anómala de NFκB, o con inflamación o sobreproducción de IL-6, que incluyen tumores malignos hematológicos tales como mieloma múltiple, leucemia, linfoma linfoblástico de linfocitos T, y otros linfomas (por ejemplo, linfoma no Hodgkin), y tumores sólidos tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama (mujeres y/o hombres), cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer tiroideo, y melanoma; cáncer asociado a la inactivación o discapacidad de la muerte celular mediada por caspasas, tal como cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer del cuello uterino, y ameloblastomas de células basales; afecciones asociadas a la actividad modulada de IRF-5 que incluyen granulomatosis de Wegener y esclerosis sistémica; fibrosis asociada a la sobreproducción de IL-6, tal como esclerosis sistémica o esclerodermia; enfermedades neurodegenerativas asociadas a la sobreproducción de IL-6, tales como enfermedad de Alzheimer; trastornos psiquiátricos asociados también a la sobreproducción de IL-6, tales como depresión; enfermedades de angiogénesis asociadas a la sobreproducción de IL-6 tales como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética, hiperplasias asociadas a IL-6 tales como enfermedad de Castleman y ciertas vasculitis infrecuentes asociadas a la sobreproducción de IL-6, tales como enfermedad de Behçet.

Sin el deseo de quedar unidos a ninguna teoría en particular, los presentes inventores creen que esta acción puede ser a través de un mecanismo que implica el bloqueo de TNFα, y/o la señalización de RANKL y/o la actividad IRF y/o la inhibición de la producción de IL-6.

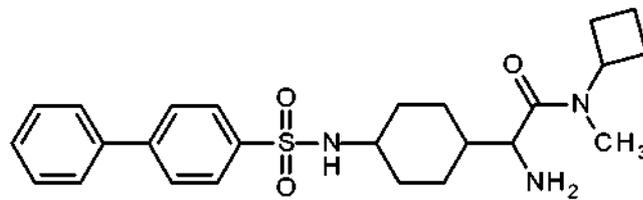
#### Compuestos conocidos

Wang *et al.*, 2010, describen ciertos compuestos que aparentemente tienen alta afinidad y son agonistas totales selectivos del receptor D<sup>3</sup> de dopamina. Algunos ejemplos de compuestos mostrados en el mismo incluyen los siguientes (véanse, por ejemplo, las páginas 18-19 y 48-50 del mismo):



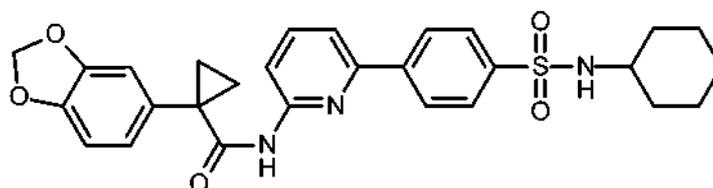
Chen *et al.*, 2012 describen compuestos similares.

- 5 Tsutsumi *et al.*, 2005, describen ciertos compuestos que aparentemente muestran actividad inhibitora de DPP-IV y aparentemente son útiles en el tratamiento de diabetes del tipo II y obesidad. El siguiente compuesto se muestra como el Ejemplo 89 de la página 192 del mismo:

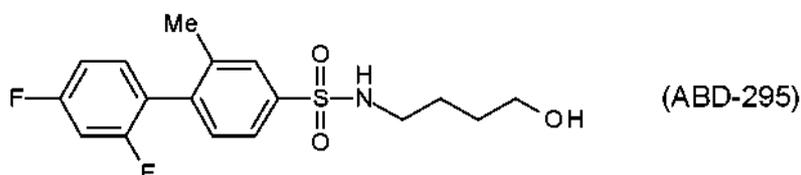
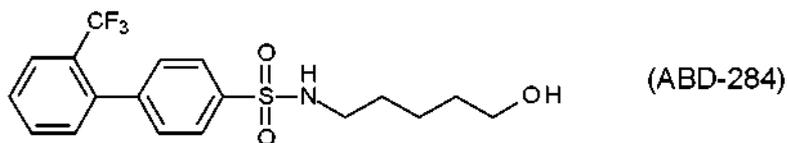
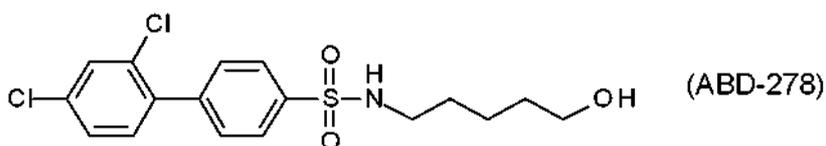
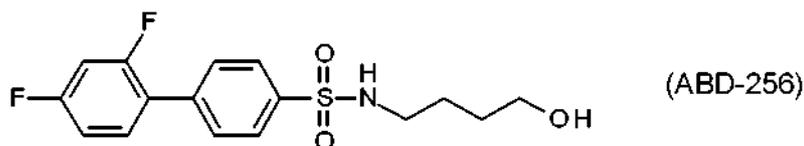
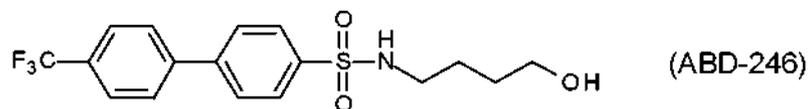


- 10 Hadida *et al.*, 2007 describen ciertos compuestos que supuestamente son útiles como moduladores de transportadores de la caseta de unión de ATP ("ABC") o fragmentos de los mismos, incluyendo el regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística ("CFTR"). El siguiente compuesto se muestra en el Ejemplo 208 de la página 77 del mismo:

15

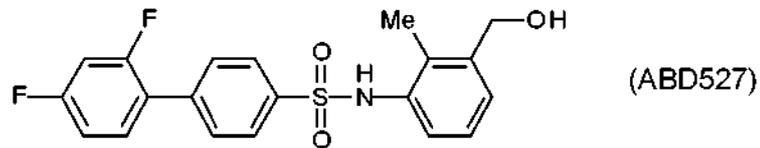
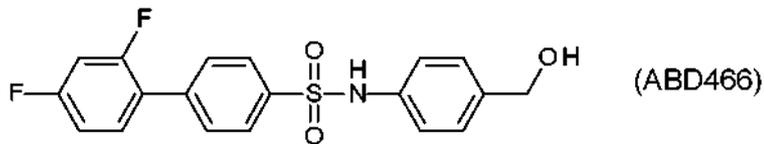
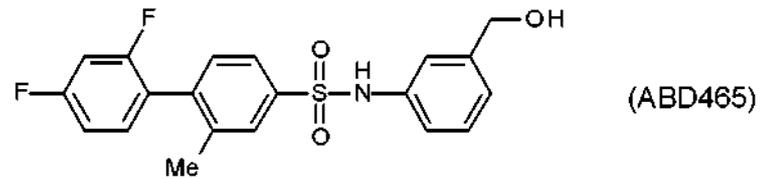
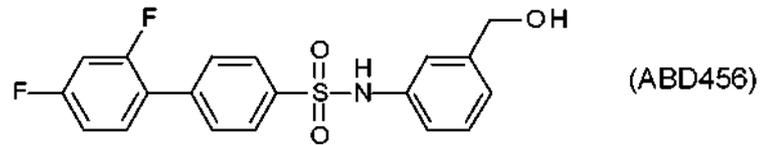
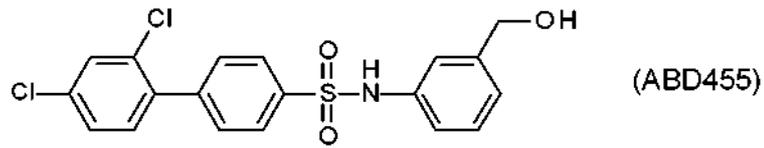


- 5 Ralston *et al.*, 2005, describen ciertas amidas bifeníl-4-sulfónicas para su uso: para inhibir la supervivencia, formación, y/o actividad de osteoclastos; para inhibir afecciones mediadas por osteoclastos y/o caracterizadas por reabsorción ósea; en el tratamiento de trastornos óseos tales como osteoporosis, artritis reumatoide, enfermedad ósea asociada a cáncer, y enfermedad de Paget; y en el tratamiento de trastornos asociados a inflamación o activación del sistema inmune. Algunos ejemplos de compuestos que se muestran en el mismo incluyen los siguientes:



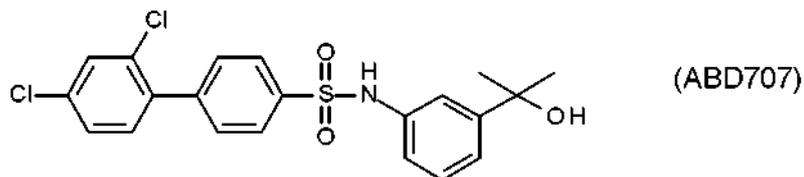
- 10 Greig *et al.*, 2006, describen compuestos similares.

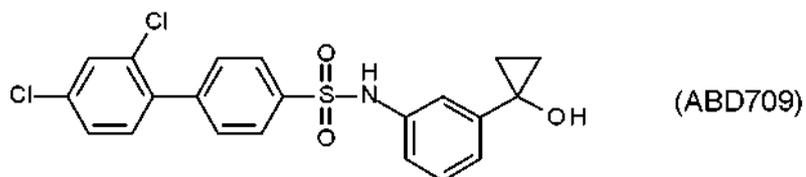
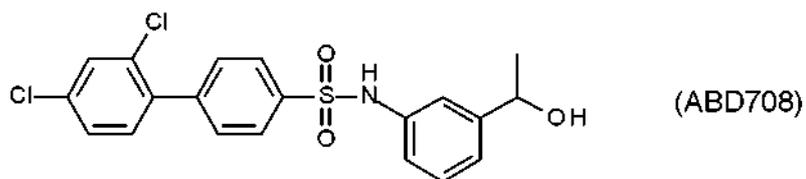
- 15 Greig *et al.*, 2008, describen ciertas amidas del ácido bifeníl-4-sulfónico para el tratamiento de inflamación y/o destrucción de articulaciones y/o pérdida ósea; trastornos mediados por activación excesiva y/o inapropiada y/o prolongada del sistema inmune; trastornos inflamatorios y autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, y espondilitis anquilosante; y trastornos asociados a pérdida ósea, tales como pérdida ósea asociada a actividad excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, y enfermedad de Paget. Algunos ejemplos de los compuestos que se muestran en el mismo incluyen los siguientes:



Greig *et al.*, 2010b, describen ciertas amidas del ácido bifenil-4-sulfónico para el tratamiento de inflamación y/o destrucción de articulaciones y/o pérdida ósea; trastornos mediados por activación excesiva y/o inapropiada y/o prolongada del sistema inmune; trastornos inflamatorios y autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, y espondilitis anquilosante; y trastornos asociados a pérdida ósea, tales como pérdida ósea asociada a actividad excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, y enfermedad de Paget. Algunos ejemplos de los compuestos que se muestran en el mismo incluyen los siguientes:

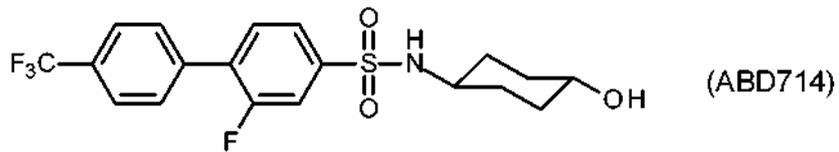
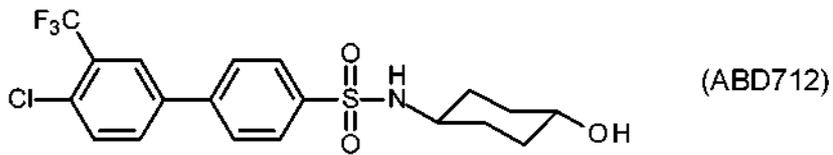
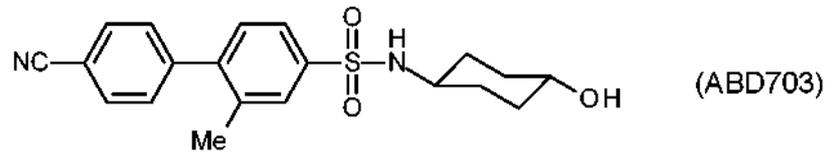
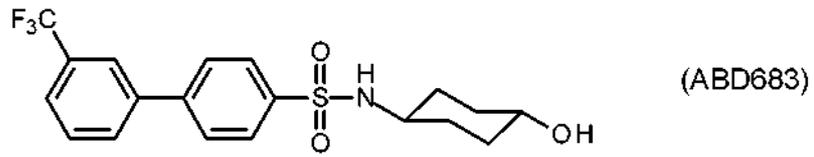
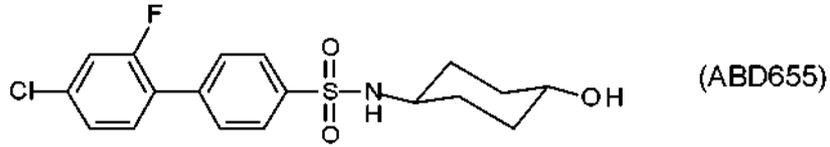
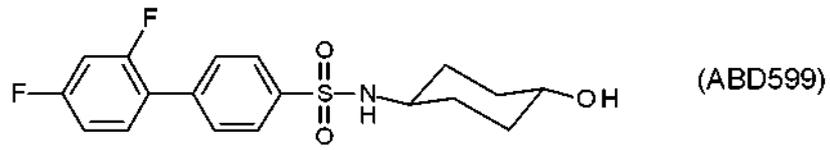
10

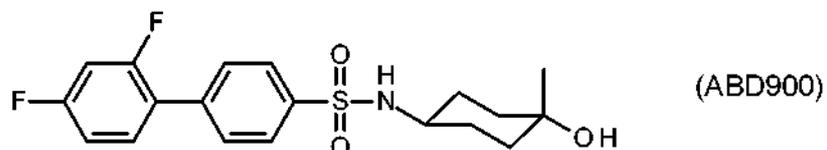
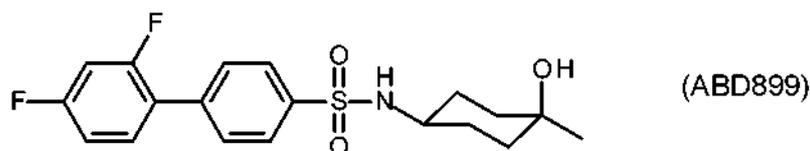
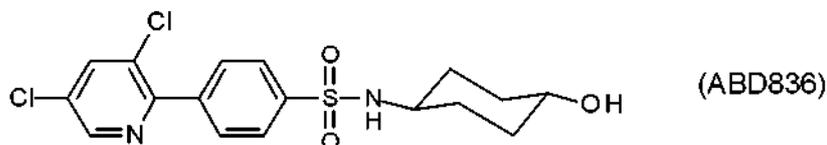
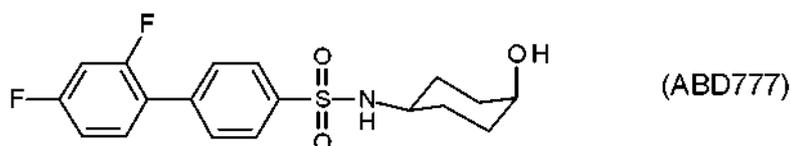
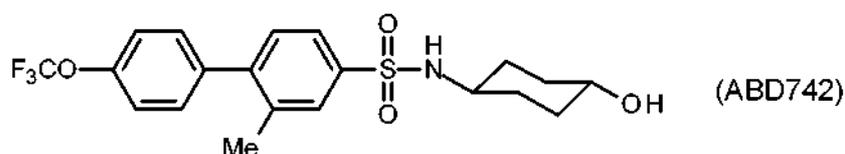
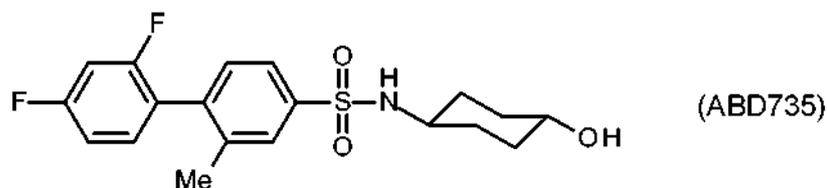
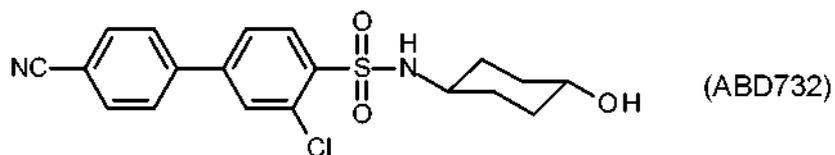




Greig *et al.*, 2013 describen compuestos similares.

- 5 Greig *et al.*, 2010a, describen ciertas amidas del ácido bifenil-4-sulfónico para el tratamiento de inflamación y/o destrucción de articulaciones y/o pérdida ósea; trastornos mediados por activación excesiva y/o inapropiada y/o prolongada del sistema inmune; trastornos inflamatorios y autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, y espondilitis anquilosante; trastornos asociados a pérdida ósea, tales como pérdida ósea asociada a actividad excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, y enfermedad de Paget; y cáncer, tal como un tumor maligno hematológico y un tumor sólido. Algunos ejemplos de los compuestos que se muestran en el mismo incluyen los siguientes:
- 10





#### Nuevos compuestos con propiedades mejoradas

- 5 Los compuestos HMC que se describen en el presente documento están protegidos frente a varios riesgos tóxicos que están presentes en los compuestos conocidos, especialmente los que se muestran en Greig *et al.*, 2010a y muestran un aumento de eficacia en modelos de enfermedad.

- 10 Sin el deseo de quedar unidos a ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que las combinaciones particulares de sustituyentes y sus posiciones en la estructura de anillo de biarilo dan lugar a propiedades extraordinarias. Además de las mejoras sustanciales en la toxicología aguda *in vivo*, estas combinaciones protegen a los compuestos de citotoxicidad general, genotoxicidad, y los riesgos de seguridad cardiovascular observados en los compuestos conocidos. Específicamente, los compuestos HMC que se describen en el presente documento son negativos para genotoxicidad, muestran una mejora sustancial en la citotoxicidad general, y se protegen sustancialmente diferentes a la inhibición del gen relacionado con éter-a-go-go (hERG), que representa un riesgo de seguridad cardiovascular principal.
- 15

Si un fármaco se va a usar en la clínica, debe tener un perfil de seguridad y eficacia adecuado. Debe mostrar una seguridad aguda adecuada para permitir la dosificación a seres humanos sin esperar efectos secundarios generales graves. Además, no debe causar lesión genética (genotoxicidad) debido a que los agentes que son genotóxicos pueden actuar como carcinógenos en los seres humanos. Un fármaco clínicamente aceptable tampoco inhibiría hERG, un canal iónico que, cuando se inhibe, puede causar un trastorno cardíaco fatal conocido como síndrome de QT largo. Junto con estas propiedades de seguridad, el fármaco debe ser suficientemente potente frente a la diana biológica para dar el efecto terapéutico deseado; debe tener una solubilidad suficiente para absorberse en el tracto gastrointestinal; y debe tener suficiente estabilidad para permanecer en la circulación un período de tiempo suficientemente prolongado para alcanzar la diana biológica.

Los compuestos HMC que se describen en el presente documento demuestran una mejora de eficacia en modelos de artritis reumatoide, por ejemplo, en comparación con los compuestos que se muestran en Greig *et al.*, 2010a. Esto se demuestra mediante una mayor magnitud de efecto en la enfermedad, así como una mayor potencia, observándose ambos, de forma importante, cuando los compuestos HMC se administran cuando la enfermedad ya está establecida. Esto refleja los ajustes clínicos para el uso de estos compuestos. Además estos efectos se observan sin toxicidad indebida.

La reducción de las propiedades toxicológicas (efectos adversos) de un fármaco es una barrera de desarrollo de igual desafío e importancia en comparación con la optimización de las propiedades farmacodinámicas (acción del fármaco en el cuerpo) y farmacocinéticas (acción del cuerpo en el fármaco). Los compuestos HMC que se describen en el presente documento proporcionan ventajas significativas como agentes terapéuticos orales (en comparación con los compuestos conocidos) al mejorar la toxicología general aguda *in vivo*, la seguridad genotóxica y citotóxica, y la seguridad cardiovascular, con poco o ningún cambio en la farmacocinética *in vivo* o pérdida de potencia frente a la diana biológica.

Los compuestos HMC que se describen en el presente documento combinan las características requeridas de agentes oralmente activos para el tratamiento, por ejemplo, de afecciones inflamatorias crónicas, pérdida ósea, y cáncer.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra seis gráficos, cada uno del índice artrítico medio en función del tiempo (día de dosificación) para el compuesto de ensayo dosificado a 10 mg/kg/día mediante sonda gástrica oral (círculos abiertos) y control (círculos sólidos), para cada uno de: (A) HMC-C-02-A (superior izquierdo), (B) HMC-C-01-A (superior medio), (C) HMC-N-02-A (superior derecho), (D) HMC-N-01-A (inferior izquierdo), (E) HMC-C-01-B (inferior medio), (F) HMC-N-01-B (inferior derecho), como se describe posteriormente en el Estudio Biológico 6.

La Figura 2 muestra los gráficos, cada uno del índice artrítico en función del tiempo (día de dosificación) para el compuesto de ensayo (círculos abiertos, cuadrados abiertos), control (círculos sólidos) y control positivo, el fármaco comercializado etanorcept (triángulos), para cada uno de (A) ABD899 a 10 mg/kg/día (izquierda), (B) HMC-C-01-A a 0,3 mg/kg/día y 3 mg/kg/día (derecha), como se describe posteriormente en el Estudio Biológico 6.

La Figura 3 muestra seis gráficos, cada uno del índice artrítico medio en función del tiempo (día de dosificación) para el compuesto de ensayo (círculos abiertos), control (círculos sólidos), y control positivo, metotrexato (triángulos) para cada uno de: (A) ABD899 dosificado a 3 mg/kg/día (superior izquierda), (B) HMC-C-01-A dosificado a 3 mg/kg/día (superior medio), (C) HMC-N-01-A dosificado a 3 mg/kg/día (superior derecho), (D) ABD899 dosificado a 10 mg/kg/día (inferior izquierdo), (E) HMC-C-01-A dosificado a 10 mg/kg/día (inferior medio), y (F) HMC-N-01-A dosificado a 10 mg/kg/día (inferior derecho), como se describe posteriormente en el Estudio Biológico 11.

### Sumario de la invención

Un aspecto de la invención está relacionado con ciertos compuestos de *N*-(4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-fenilbencenosulfonamida y *N*-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-(2-piridil)bencenosulfonamida sustituidos (denominados colectivamente en el presente documento compuestos HMC), como se describe en el presente documento.

Otro aspecto de la invención está relacionado con una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención está relacionado con un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende la etapa de mezclar un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto HMC, como se describe en el presente

documento, para su uso en un método de tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante terapia, por ejemplo, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento.

5 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, en la preparación de un medicamento para tratamiento, por ejemplo, el tratamiento de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento.

10 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método de tratamiento, por ejemplo, de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento, que comprende administrar a un paciente con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, preferentemente en forma de una composición farmacéutica.

15 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un kit que comprende (a) un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, preferentemente proporcionado en forma de una composición farmacéutica y en un recipiente adecuado y/o con un envase adecuado; y (b) instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones escritas de cómo administrar el compuesto.

20 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto HMC *obtenible* mediante un método de síntesis como se describe en el presente documento, o un método que comprende un método de síntesis como se describe en el presente documento.

25 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto HMC *obtenido* mediante un método de síntesis como se describe en el presente documento, o un método que comprende un método de síntesis como se describe en el presente documento.

30 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con nuevos compuestos intermedios, como se describen en el presente documento, que son adecuados para su uso en los métodos de síntesis que se describen en el presente documento.

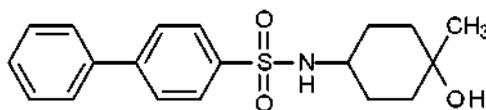
Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de tales nuevos compuestos intermedios, como se describen en el presente documento, en los métodos de síntesis que se describen en el presente documento.

35 Como entenderá el experto en la materia, las características y las realizaciones preferentes de un aspecto de la invención también están relacionadas con los demás aspectos de la invención.

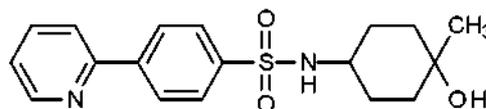
### Descripción detallada de la invención

#### Compuestos

40 Un aspecto de la presente invención se refiere a ciertos compuestos que se pueden describir convenientemente como compuestos de *N*-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-fenil-bencenosulfonamida y *N*-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-(2-piridil)bencenosulfonamida sustituidos.

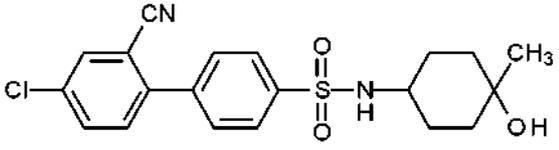
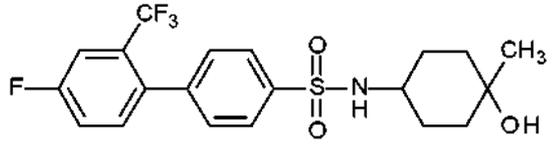
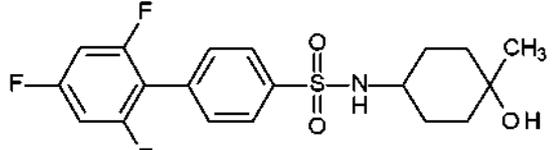
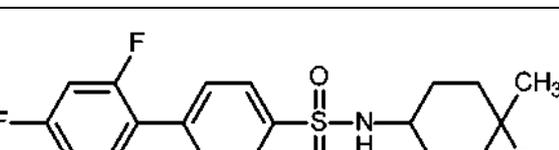
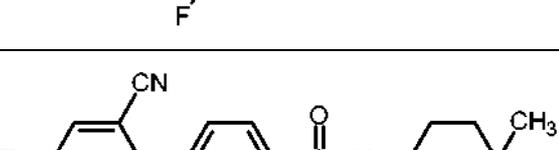
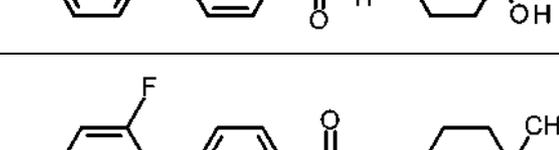
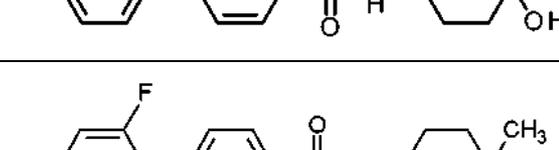
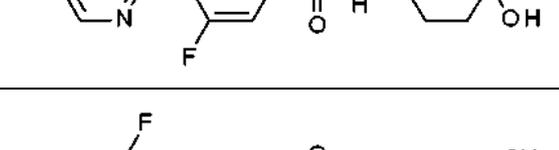
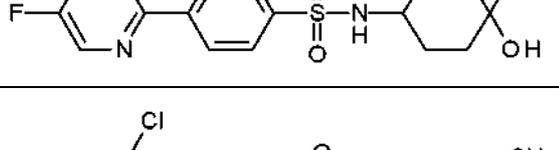


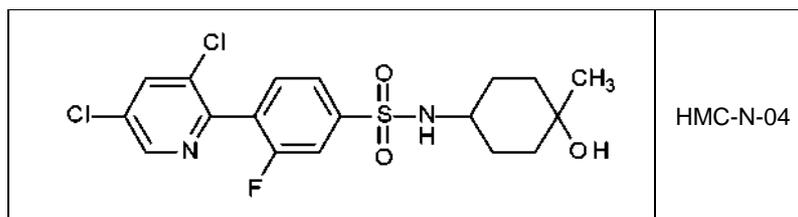
45 *N*-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-fenil-bencenosulfonamida



50 *N*-(4-hidroxi-4-metil-ciclohexil)-4-(2-piridil)bencenosulfonamida

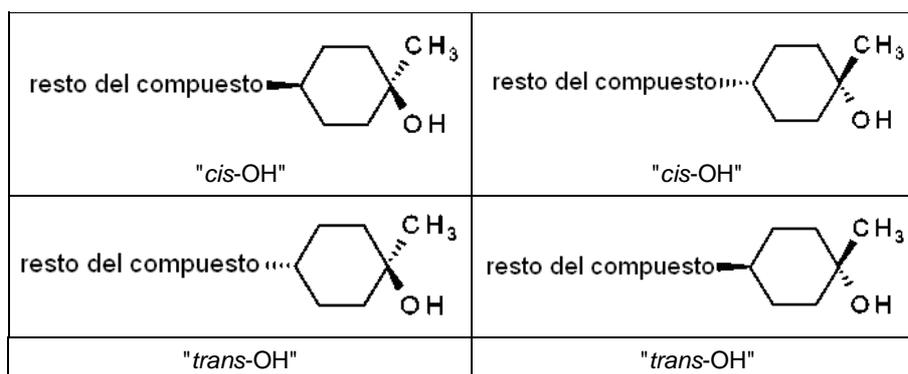
55 De ese modo, un aspecto de la presente invención es un compuesto seleccionado entre los compuestos de las siguientes fórmulas, o una sal, un hidrato, o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptables (por conveniencia, denominados colectivamente en el presente documento "compuestos HMC"):

 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(Cl)c(C#N)cc3</chem>	HMC-C-01
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(F)c(C(F)(F)F)cc3</chem>	HMC-C-02
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(F)c(F)c(F)c3</chem>	HMC-C-03
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2cc(F)ccc2-c3cc(F)cc(F)c3</chem>	HMC-C-04
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(F)c(C#N)cc3</chem>	HMC-C-05
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(F)c(C#N)cc3</chem>	HMC-C-06
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(F)c(F)n3</chem>	HMC-N-01
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(F)c(F)n3</chem>	HMC-N-02
 <chem>CC1(O)CCCCC1NS(=O)(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(Cl)c(Cl)n3</chem>	HMC-N-03



Se ha de observar que los sustituyentes en un lado del anillo de ciclohexilo (es decir, -OH y -CH<sub>3</sub> en el lado a mano derecha) se pueden situar "trans" / "cis" o "cis" / "trans" con respecto al resto de la molécula (es decir, en el anillo de ciclohexilo al que están unidos, con respecto al resto del compuesto que está unido en la posición para del anillo de ciclohexilo).

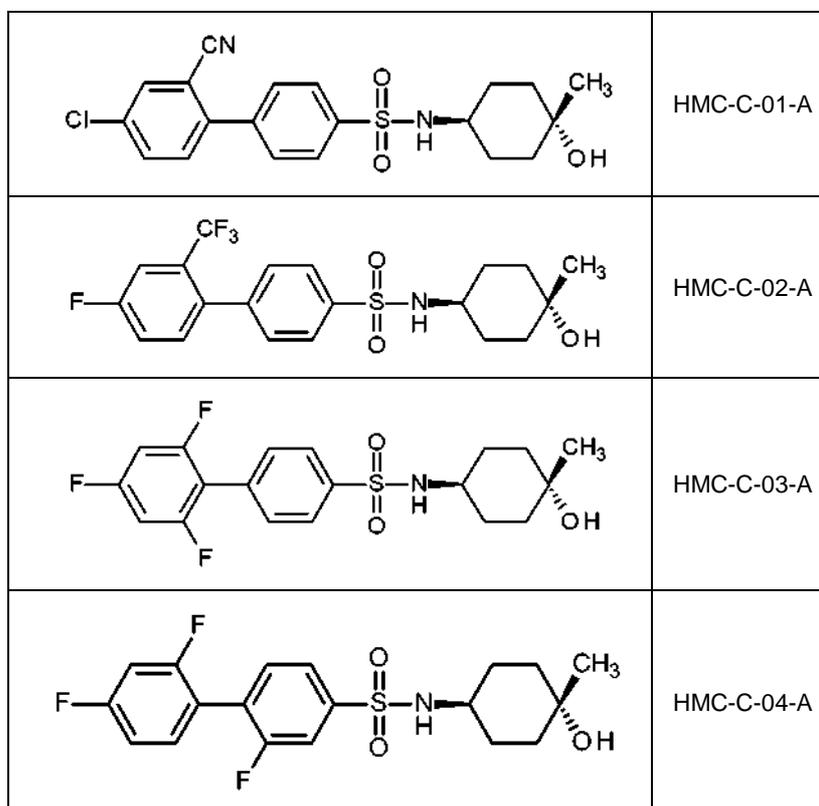
5

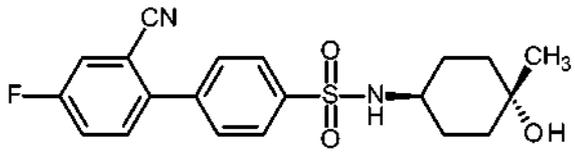
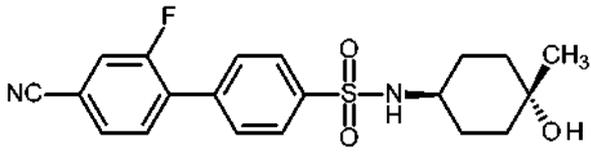
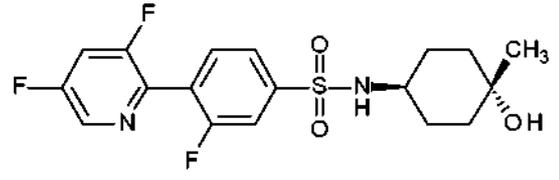
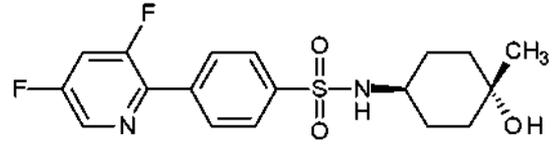
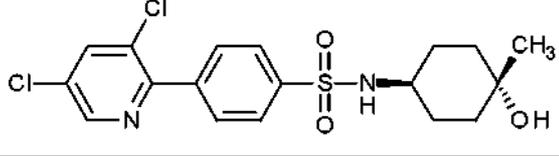
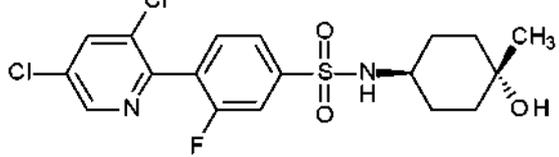


A menos que se indique de otro modo, se pretende que la totalidad de tales conformaciones se incluyan mediante la referencia a un compuesto que no especifique una conformación particular.

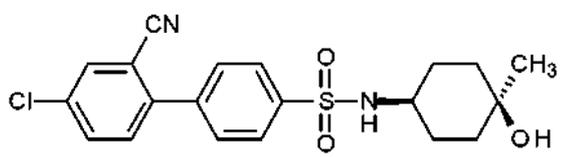
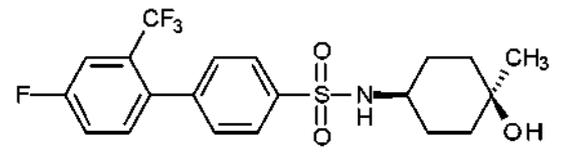
10

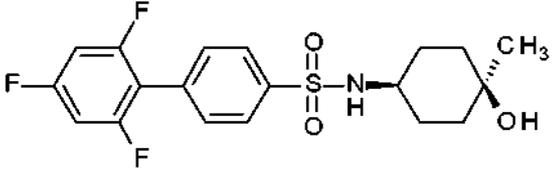
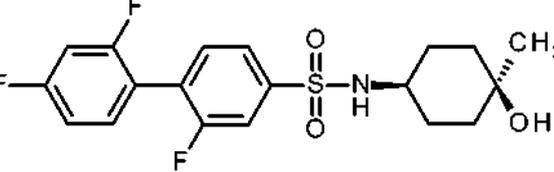
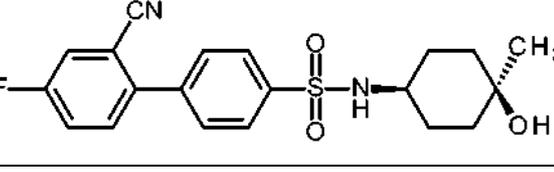
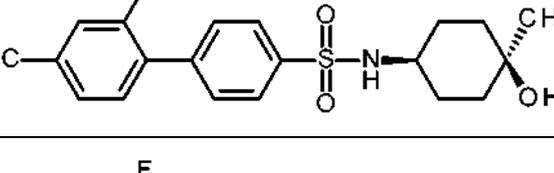
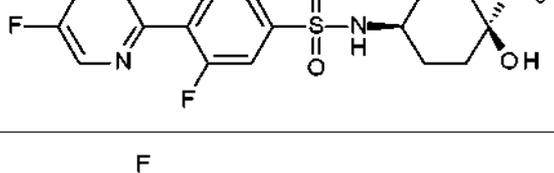
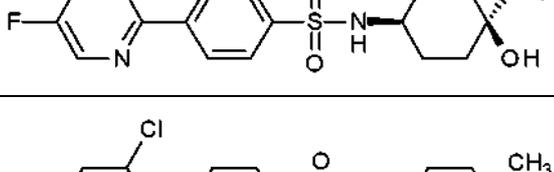
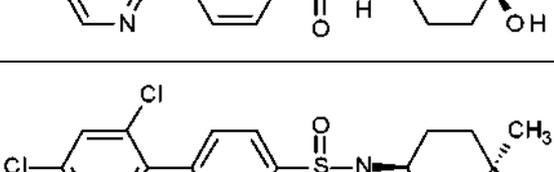
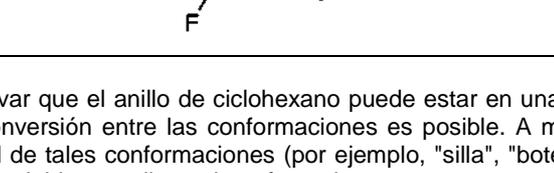
En una realización, el compuesto está en la conformación "trans-OH", como, por ejemplo, en los siguientes compuestos:



	HMC-C-05-A
	HMC-C-06-A
	HMC-N-01-A
	HMC-N-02-A
	HMC-N-03-A
	HMC-N-04-A

En una realización, el compuesto está en la conformación "cis-OH", como, por ejemplo, en los siguientes compuestos:

	HMC-C-01-B
	HMC-C-02-B

	HMC-C-03-B
	HMC-C-04-B
	HMC-C-05-B
	HMC-C-06-B
	HMC-N-01-B
	HMC-N-02-B
	HMC-N-03-B
	HMC-N-04-B

También se ha de observar que el anillo de ciclohexano puede estar en una conformación de "silla", "bote", o "bote torcido", y que la interconversión entre las conformaciones es posible. A menos que se indique de otro modo, se pretende que la totalidad de tales conformaciones (por ejemplo, "silla", "bote", "bote torcido", "OH es axial", "OH es ecuatorial", etc.) estén incluidas mediante la referencia a un compuesto que no especifique una conformación particular.

5

Formas básicamente purificadas

Un aspecto de la presente invención está relacionado con compuestos HMC, como se describen en el presente documento, en forma básicamente purificada y/o en una forma básicamente exenta de contaminantes.

5 En una realización, la forma básicamente purificada es al menos un 50 % en peso, por ejemplo, al menos un 60 % en peso, por ejemplo, al menos un 70 % en peso, por ejemplo, al menos un 80 % en peso, por ejemplo, al menos un 90 % en peso, por ejemplo, al menos un 95 % en peso, por ejemplo, al menos un 97 % en peso, por ejemplo, al menos un 98 % en peso, por ejemplo, al menos un 99 % en peso.

10 A menos que se especifique, la forma básicamente purificada se refiere al compuesto en cualquier forma conformacional. Por ejemplo, en una realización, la forma básicamente purificada se refiere a una mezcla de formas conformacionales, es decir, purificada con respecto a los demás compuestos. En una realización, la forma básicamente purificada se refiere a una forma conformacional. En una realización, la forma básicamente purificada se refiere a una mezcla de formas conformacionales. En una realización, la forma básicamente purificada se refiere a una mezcla equimolar de formas conformacionales.

20 En una realización, los contaminantes representan no más de un 50 % en peso, por ejemplo, no más de un 40 % en peso, por ejemplo, no más de un 30 % en peso, por ejemplo, no más de un 20 % en peso, por ejemplo, no más de un 10 % en peso, por ejemplo, no más de un 5 % en peso, por ejemplo, no más de un 3 % en peso, por ejemplo, no más de un 2 % en peso, por ejemplo, no más de un 1 % en peso.

25 A menos que se especifique, los contaminantes se refieren a los demás compuestos, es decir, distintos de otras formas conformacionales. En una realización, los contaminantes se refieren a los demás compuestos y a las demás formas conformacionales.

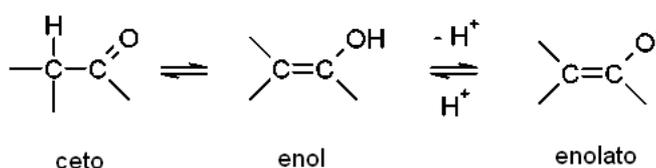
30 En una realización, la forma básicamente purificada es al menos un 60 % conformacionalmente pura (es decir, un 60 % del compuesto, en base molar, es la conformación deseada, y un 40 % es la forma o formas conformacionales no deseadas), por ejemplo, al menos un 70 % conformacionalmente pura, por ejemplo, al menos un 80 % conformacionalmente pura, por ejemplo, al menos un 90 % conformacionalmente pura, por ejemplo, al menos un 95 % conformacionalmente pura, por ejemplo, al menos un 97 % conformacionalmente pura, por ejemplo, al menos un 98 % conformacionalmente pura, por ejemplo, al menos un 99 % conformacionalmente pura.

Isómeros

35 Ciertos compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales, o anoméricas particulares, que incluyen, pero no se limitan a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t, y r; formas endo y exo; formas R, S, y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol, y enolato; formas syn y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas  $\alpha$  y  $\beta$ ; formas axial y ecuatorial; formas de bote, silla, bote torcido, sobre, y semisilla; y las combinaciones de las mismas, denominadas colectivamente en lo sucesivo en el presente documento "isómeros" (o "formas isoméricas").

45 La referencia a una clase de estructuras puede incluir bien formas estructuralmente isoméricas que entran dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C<sub>1-7</sub> incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta-, y para-metoxifenilo). Sin embargo, la referencia a un grupo o patrón de sustitución específico no se pretende que incluya otra estructura (o isómeros constitucionales) que difieran con respecto a las conexiones entre los átomos en lugar de mediante las posiciones en el espacio. Por ejemplo, la referencia a un grupo metoxi, -OCH<sub>3</sub>, no se pretende que indique la referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH<sub>2</sub>OH. De forma análoga, la referencia a orto-clorofenilo no se pretende que indique la referencia a su isómero estructural, metal-clorofenilo.

50 La exclusión anterior no está relacionada con las formas tautoméricas, por ejemplo las formas ceto, enol, y enolato, como, por ejemplo, en los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enotiol, N-nitroso/hidroxiato, y nitro/acinitro.



60 Se ha de observar que incluidos específicamente en el término "isómeros" se encuentran compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H (D), y <sup>3</sup>H

(T); C puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye  $^{11}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y  $^{14}\text{C}$ ; O puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye  $^{15}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$  y  $^{18}\text{O}$ ; N puede estar en cualquier forma isotópica que incluye  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ ; F puede estar en cualquier forma isotópica que incluye  $^{18}\text{F}$  y  $^{19}\text{F}$  y similares.

- 5 A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto particular incluye la totalidad de tales formas isoméricas, incluyendo las mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas) de las mismas. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente por adaptación de los métodos enseñados en el presente documento, o métodos conocidos, de una forma conocida.

10

#### Sales

- 15 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se analizan en Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., vol. 66, pág. 1-19.

- 20 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo,  $-\text{COOH}$  puede ser  $-\text{COO}^-$ ), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Algunos ejemplos de cationes adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos tales como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , cationes alcalinotérreos tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y otros cationes tales como  $\text{Al}^{3+}$ . Algunos ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones amonio (es decir,  $\text{NH}_4^+$ ) e iones amonio sustituidos (por ejemplo,  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ). Algunos ejemplos de iones amonio sustituidos adecuados son los que se obtienen a partir de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario habitual es  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ .

- 30 Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo,  $-\text{NH}_2$  puede ser  $-\text{NH}_3^+$ ), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Algunos ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fosforoso. Algunos ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, y valérico. Algunos ejemplos de cationes orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetil celulosa.

- 40 A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto particular también incluye las formas de sal del mismo.

#### Solvatos e hidratos

- 45 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular el correspondiente solvato del compuesto. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de un soluto (por ejemplo, un compuesto, una sal del compuesto) y un disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede denominar convenientemente hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

- 50 A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto particular también incluye las formas de solvato e hidrato del mismo.

#### Formas químicamente protegidas

- 55 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular el compuesto en una forma químicamente protegida. La expresión "forma químicamente protegida" se usa en el presente documento en el sentido químico convencional y está relacionada con un compuesto en el que uno o más grupos funcionales reactivos están protegidos de las reacciones químicas indeseables en las condiciones especificadas (por ejemplo, pH, temperatura, radiación, disolvente, y similares). En la práctica, se emplean métodos químicos bien conocidos para hacer reversiblemente no reactivo un grupo funcional, que de otro modo sería reactivo, en las condiciones especificadas. En una forma químicamente protegida, uno o más grupos funcionales reactivos están en forma de un grupo protegido o protector (también conocido como un grupo enmascarado o enmascarador o un grupo bloqueado o bloqueador). Mediante la protección de un grupo funcional reactivo, las reacciones que implican otros grupos funcionales reactivos sin proteger se pueden llevar a cabo sin que afecte al grupo protegido; el grupo protector se puede retirar, habitualmente en una etapa posterior, sin afectar básicamente al resto de la molécula. Véase por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green y P. Wuts; 4ª edición; John Wiley & Sons, 2006).

65

Se usan ampliamente una amplia diversidad de tales métodos "protectores", "bloqueadores", o "enmascaradores" y se conocen bien en la síntesis orgánica. Por ejemplo, un compuesto que tiene dos grupos funcionales reactivos no equivalentes, ambos de los cuales serían reactivos en las condiciones especificadas, se puede derivatizar para volver uno de los grupos funcionales "protegido", y por lo tanto no reactivo, en las condiciones especificadas; el compuesto protegido de ese modo se puede usar como un reactivo que tiene de forma eficaz solo un grupo funcional reactivo. Después de que la reacción deseada (que implica el otro grupo funcional) se haya completado, el grupo protector se puede "desproteger" para devolverlo a su funcionalidad original.

Por ejemplo, un grupo amina se puede proteger, por ejemplo, en forma de una amida (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), por ejemplo, en forma de: una metil amida (-NHCO-CH<sub>3</sub>); una benciloxi amida (-NHCO-OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -NH-Cbz); en forma de una t-butoxi amida (-NHCO-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propoxi amida (-NHCO-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -NH-Bpoc), en forma de una 9-fluorenilmetoxi amida (-NH-Fmoc), en forma de una 6-nitroveratriloxi amida (-NH-Nvoc), en forma de una 2-trimetilsililetiloxi amida (-NH-Teoc), en forma de una 2,2,2-tricloroetiloxi amida (-NH-Troc), en forma de una aliloxi amida (-NH-Alloc), en forma de una 2(-fenilsulfonil)etiloxi amida (-NH-Psec); o, en casos adecuados (por ejemplo, aminas cíclicas), en forma de un radical nitróxido (>N-O●).

### Profármacos

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular el compuesto en forma de un profármaco. El término "profármaco", como se usa en el presente documento, está relacionado con un compuesto que, cuando se metaboliza (por ejemplo, *in vivo*), produce el compuesto activo deseado. Por lo general, el profármaco es inactivo, o menos activo que el compuesto activo deseado, pero proporciona propiedades ventajosas de manipulación, administración, o metabólicas.

### Síntesis química

En el presente documento se describen métodos para las síntesis químicas de los compuestos HMC. Estos y/o otros métodos bien conocidos se pueden modificar y/o adaptar de formas conocidas con el fin de facilitar la síntesis de compuestos HMC adicionales que se describen en el presente documento.

### Composiciones

Un aspecto de la presente invención está relacionado con una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición comprende además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales, como se describen en el presente documento.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende mezclar un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende mezclar un compuesto HMC, como se describe en el presente documento; uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales, como se describen en el presente documento; y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

### Usos

Los compuestos HMC, como se describen en el presente documento, son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos (por ejemplo, enfermedades) que incluyen, por ejemplo, los trastornos (por ejemplo, las enfermedades) que se describen en el presente documento.

### Puso en métodos de terapia

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, por ejemplo, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales, como se describen en el presente documento, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, por ejemplo, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento.

Uso en la preparación de medicamentos

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, en la preparación de un medicamento para tratamiento, por ejemplo, el tratamiento de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento.

En una realización, el medicamento comprende el compuesto HMC.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, y uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales, como se describen en el presente documento, en la preparación de un medicamento para tratamiento, por ejemplo, el tratamiento de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento.

En una realización, el medicamento comprende el compuesto HMC y los uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales.

Métodos de tratamiento

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método de tratamiento, por ejemplo, de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento, que comprende administrar a un paciente con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, preferentemente en forma de una composición farmacéutica.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método de tratamiento, por ejemplo, de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad) como se describe en el presente documento, que comprende administrar a un paciente con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, preferentemente en forma de una composición farmacéutica, y uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales, como se describen en el presente documento, preferentemente en forma de una composición farmacéutica.

Afecciones tratadas

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno inflamatorio o un trastorno primo de.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno asociado con inflamación y/o activación del sistema inmune.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno mediado por activación excesiva y/o inapropiada y/o prolongada del sistema inmune.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de inflamación.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno asociado a inflamación o activación del sistema inmune.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de artritis reumatoide; psoriasis; artritis psoriática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); asma; aterosclerosis; enfermedad inflamatoria del intestino; o espondilitis anquilosante.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de artritis reumatoide.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de psoriasis.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de artritis psoriática.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En una realización, el tratamiento es tratamiento de asma.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de aterosclerosis.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de espondilitis anquilosante.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino.

En una realización, el tratamiento es prevención de una respuesta inmune que conduce a rechazo de órgano o

injerto después de trasplante.

En una realización, el tratamiento es prevención de una afección inflamatoria en la que la expresión o actividad de IRF-5 es anómala.

5 En una realización, el tratamiento es tratamiento de un tumor que sobreexpresa TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, RANKL, y/o NF $\kappa$ B.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un tumor para el que la inhibición de la expresión o actividad o señalización de TNF $\alpha$ , IL-1, RANKL, NF $\kappa$ B, IRF tales como IRF-3, -5 o -7 y/o IL-6 facilita o mejora la acción de agentes tumoricidas citotóxicos.

10

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un tumor maligno hematológico.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de mieloma múltiple.

15 En una realización, el tratamiento es tratamiento de leucemia; por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de linfoma; por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos T (por ejemplo, linfoma linfoblástico T, linfoma de linfocitos T extranodal, linfoma de linfocitos T cutáneo, linfoma macrocítico anaplásico, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico), y linfoma de linfocitos B (por ejemplo, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin) (por ejemplo, linfoma de linfocitos B macrocítico difuso, linfoma folicular, linfoma del tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítico microcítico, linfoma de células del manto, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkitt).

20

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un cáncer de tumor sólido, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama (mujeres y/o hombres), cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer tiroideo, ameloblastoma de células basales, o melanoma

25

En una realización, el tumor maligno hematológico (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, etc.) y el cáncer de tumor sólido (por ejemplo, cáncer de la vejiga, etc.) está asociado a la activación de NF $\kappa$ B, a la señalización anómala de NF $\kappa$ B, o a inflamación.

30

En una realización, el tumor maligno hematológico (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, etc.) y el cáncer de tumor sólido (por ejemplo, cáncer de la vejiga, etc.) está asociado a inactivación o disfunción de la inducción de caspasas o a señalización anómala de caspasas.

35

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno proliferativo; por ejemplo, enfermedad de Castleman.

40

En una realización, el tratamiento es tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado entre: enfermedades que tienen un componente inflamatorio o autoinmune, que incluyen asma, aterosclerosis, enfermedades alérgicas, tales como atopía, rinitis alérgica, dermatitis atópica, anafilaxis, aspergilosis broncopulmonar alérgica, y neumonitis por hipersensibilidad (enfermedad de criadores de palomas, enfermedad del pulmón del granjero, enfermedad del pulmón humidificador, enfermedad pulmonar de los trabajadores de malta); alergias, que incluyen dermatitis por alergia a las pulgas en mamíferos tales como animales domésticos, por ejemplo, perros y gatos, alergenios de contacto que incluyen picaduras de mosquitos o otras alergias a aguijones de insectos, hiedra venenosa, roble venenoso, zumaque venenoso, o otros alergenios de la piel; trastornos autoinmunes, que incluyen diabetes del tipo I y las complicaciones asociadas, esclerosis múltiple, artritis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune (de Hasimoto), enfermedades hepáticas autoinmunes tales como hepatitis y cirrosis biliar primaria, hipertiroidismo (enfermedad de Graves; tirotoxicosis), diabetes resistente a la insulina, insuficiencia adrenal autoinmune (enfermedad de Addison), ooforitis autoinmune, orquitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hemoglobinuria paroxística por frío, enfermedad de Behçet, trombocitopenia autoinmune, neutropenia autoinmune, anemia perniciosa, anemia de células rojas pura, coagulopatías autoinmunes, endometriosis, miastenia gravis, encefalomiелitis alérgica experimental, polineuritis autoinmune, pénfigo y otras enfermedades ampollasas, carditis reumática, síndrome de Goodpasture, síndrome postcardiotomía, síndrome de Sjogren, polimiositis, dermatomiositis, y esclerodermia; patologías que resultan de inflamación inapropiada, ya sea local o sistémica, por ejemplo, síndrome del intestino irritable o inflamatorio (Mazzucchelli *et al.*, 1996), enfermedades de la piel tales como liquen plano, hipersensibilidad de tipo retrasado, inflamación pulmonar crónica, por ejemplo, alveolitis pulmonar y granuloma pulmonar, inflamación gingival u otra enfermedad periodontal, e inflamación ósea asociada a lesiones de origen endodóncico (Volejnikova *et al.*, 1997), enfermedades pulmonares por hipersensibilidad tales como neumonitis por hipersensibilidad (Sugiyama *et al.*, 1995), e inflamación relacionada con liberación de histamina de basófilos (Dvorak *et al.*, 1996), tal como fiebre del heno, liberación de histamina de mastocitos (Galli *et al.*, 1989), o tumores de mastocitos, tipos de reacciones de hipersensibilidad de tipo 1 (anafilaxis, alergias de la piel, urticaria, gota, rinitis alérgica, y gastroenteritis alérgica); colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn; enfermedad renal poliquística inducida por TNF $\alpha$  (Li *et al.*, 2008); o síndromes periódicos asociados a criopirina, que incluyen síndrome de Muckle-Wells.

45

50

55

60

65

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno mediado por osteoclastos.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno caracterizado por absorción ósea excesiva.

5 En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno asociado a pérdida ósea.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de pérdida ósea.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de pérdida ósea asociada a inflamación.

10

En una realización, el tratamiento es tratamiento de pérdida ósea no asociada a inflamación.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de pérdida ósea asociada a activación excesiva de osteoclastos.

15 En una realización, el tratamiento es tratamiento de destrucción de articulación.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de destrucción de articulación asociada a inflamación.

20 En una realización, el tratamiento es tratamiento de destrucción de articulación asociada a activación excesiva de osteoclastos.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de pérdida ósea asociada a activación excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, o enfermedad de Paget.

25 En una realización, el tratamiento es tratamiento de pérdida ósea asociada a artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, o enfermedad ósea de Paget.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, o enfermedad ósea de Paget.

30

En una realización, el tratamiento es tratamiento de neoplasia de huesos, ya sea como tumor principal o como metástasis, incluyendo osteosarcoma y osteoma (véase, por ejemplo, Zheng *et al.*, 1998) y enfermedad ósea asociada a cáncer (por ejemplo, hipercalcemia de tumor maligno, metástasis ósea, metástasis ósea osteolítica, mieloma múltiple, carcinoma de mama).

35

En una realización, el tratamiento es tratamiento de hipercalcemia causada por afecciones asociadas a aumento de reabsorción ósea, que incluyen: intoxicación por vitamina D, hiperparatiroidismo primario terciario, inmovilización, y sarcoidosis.

40 En una realización, el tratamiento es tratamiento de aflojamiento aséptico de implantes prostéticos (por ejemplo, las articulaciones artificiales, por ejemplo, rodillas, cadera, etc., se pueden aflojar debido a la actividad de osteoclastos dirigida por inflamación local) (véase, por ejemplo, Childs *et al.*, 2001).

En una realización, el tratamiento es tratamiento de osteopetrosis, osteoartritis, o formación ósea ectópica.

45

En una realización, el tratamiento es tratamiento de un trastorno asociado a fibrosis, tal como esclerosis sistémica o esclerodermia.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de una vasculitis infrecuente, tal como enfermedad de Behçet.

50

#### Tratamiento

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto de tratar una afección, está relacionado en términos generales con tratamiento y terapia, ya sea de un ser humano o un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se consigue cierto efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye la reducción de la tasa de progreso, la detención de la tasa de progreso, el alivio de los síntomas de la afección, la mejora de la afección, y la cura de la afección. También está incluido el tratamiento como una medida profiláctica (es decir, profilaxis). Por ejemplo, el uso de pacientes que aún no han desarrollado la afección, pero que se encuentran en riesgo de desarrollar la afección, está incluido en el término "tratamiento".

60

Por ejemplo, el tratamiento de la inflamación incluye la profilaxis de la inflamación, la reducción de la incidencia de la inflamación, la reducción de la gravedad de la inflamación, el alivio de los síntomas de la inflamación, etc.

65 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, está relacionada con la cantidad de un compuesto, o un material, composición o forma de dosificación que comprende un compuesto, que es eficaz para producir cierto efecto terapéutico deseado, que correlaciona con una relación beneficio/riesgo

razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

Terapias de combinación

5 El término "tratamiento" incluye tratamientos y terapias de combinación, en los que se combinan dos o más  
tratamientos o terapias, por ejemplo, secuencialmente o simultáneamente. Por ejemplo, los compuestos que se  
describen en el presente documento también se pueden usar en terapias de combinación, por ejemplo, junto con  
10 otros agentes, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, etc. Algunos ejemplos de tratamientos y terapias incluyen  
quimioterapia (la administración de agentes activos, que incluyen, por ejemplo, fármacos, anticuerpos (por ejemplo,  
como en inmunoterapia), profármacos (por ejemplo, como en terapia fotodinámica, GDEPT, ADEPT, etc.); cirugía;  
terapia de radiación; terapia fotodinámica; terapia génica; y dietas controladas.

Un aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto como se describe en el presente  
15 documento, en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La combinación particular debería estar a discreción del médico que seleccionaría las dosificaciones usando su  
conocimiento general habitual y regímenes de dosificación conocidos por el practicante experto en la materia.

20 Los agentes (es decir, el compuesto que se describe en el presente documento, más uno o más agentes distintos)  
se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente, y se pueden administrar en programaciones de dosis  
individualmente variables y a través de diferentes rutas. Por ejemplo, cuando se administran secuencialmente, los  
agentes se pueden administrar en intervalos espaciados de forma próxima (por ejemplo, durante un período de 5-10  
minutos) o en intervalos más prolongados (por ejemplo, separados 1, 2, 3, 4 o más horas, o incluso separados  
25 periodos más prolongados cuando se requiera), correlacionando el régimen de dosificación preciso con las  
propiedades del agente o agentes terapéuticos.

Los agentes (es decir, el compuesto que se describe en el presente documento, más uno o más agentes distintos)  
se pueden formular juntos en una forma de dosificación individual, o alternativamente, los agentes individuales se  
30 pueden formular por separado y se pueden presentar juntos en forma de un kit, opcionalmente con instrucciones  
para su uso.

Otros usos

35 Los compuestos HMC que se describen en el presente documento también se pueden usar como parte de un  
ensayo *in vitro*, por ejemplo, con el fin de determinar si es probable que un hospedador candidato se beneficie de un  
tratamiento con el compuesto en cuestión.

Los compuestos HMC que se describen en el presente documento también se pueden usar como un estándar, por  
ejemplo, en un ensayo, con el fin de identificar otros compuestos, otros agentes antiinflamatorios, etc.

40 Kits

Un aspecto de la invención está relacionado con un kit que comprende (a) un compuesto HMC como se describe en  
el presente documento, o una composición que comprende un compuesto HMC como se describe en el presente  
45 documento, por ejemplo, proporcionado preferentemente en un recipiente adecuado y/o con un envase adecuado; y  
(b) instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones escritas de cómo administrar el compuesto por la  
composición.

En una realización, el kit comprende además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes terapéuticos adicionales,  
50 como se describen en el presente documento.

Las instrucciones escritas también pueden incluir una lista de indicaciones para las que es un tratamiento adecuado  
el ingrediente activo.

55 Rutas de administración

El compuesto HMC o la composición farmacéutica que comprende el compuesto HMC se puede administrar a un  
sujeto mediante cualquier ruta conveniente de administración, ya sea sistémicamente/periféricamente o tópicamente  
(es decir, en el sitio de acción deseado).

60 Las rutas de administración incluyen oral (por ejemplo, por ingestión); bucal; sublingual; transdérmica (que incluye,  
por ejemplo, mediante un parche, esparadrapo, etc.); transmucosa (que incluye, por ejemplo, mediante un parche,  
esparadrapo, etc.); intranasal (por ejemplo, mediante pulverización nasal, gotas o desde un atomizador o dispositivo  
de suministro de polvo seco); ocular (por ejemplo, mediante gotas oculares); pulmonar (por ejemplo, mediante  
65 terapia de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz);  
rectal (por ejemplo, mediante supositorio o enema); vaginal (por ejemplo, mediante pesario); parenteral, por ejemplo,

mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea, y intraesternal; mediante el implante de un depósito o recipiente, por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente.

5 En una realización preferente, la ruta de administración es oral (por ejemplo, mediante ingestión). En una realización preferente, la ruta de administración es parenteral (por ejemplo, mediante inyección).

#### Sujeto/paciente

10 El sujeto/paciente puede ser un cordado, un vertebrado, un mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (por ejemplo, canguro, wombat), un roedor (por ejemplo, un cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), aviar (por ejemplo, un pájaro), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un mono o simio), un mono (por ejemplo, tití, babuino), un simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano. Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto.

20 En una realización preferente, el sujeto/paciente es un ser humano.

#### Formulaciones

25 Aunque es posible que el compuesto HMC se administre solo, es preferente presentarlo en forma de una formulación farmacéutica (por ejemplo, composición, preparación, medicamento) que comprende al menos un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes distintos farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia, que incluyen vehículos, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

35 De ese modo, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas, como se han definido anteriormente, y métodos para preparar una composición farmacéutica que comprenden mezclar al menos un compuesto HMC, como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes distintos farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formula en forma de unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad (dosificación) predeterminada del compuesto.

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, está relacionada con compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, un ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, que correlaciona con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, diluyente, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación.

45 Se pueden encontrar vehículos, diluyentes o excipientes, etc. adecuados en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición, 2005.

50 Las formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto con un vehículo que constituye los uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan mediante asociación uniforme e íntima del compuesto con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido, etc.), y a continuación dando forma al producto, si fuera necesario.

55 La formulación se puede preparar para proporcionar liberación rápida o lenta; liberación inmediata, retrasada, temporizada, o sostenida; o una combinación de las mismas.

60 Las formulaciones pueden estar de forma adecuada en forma de líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, lavados bucales, gotas, comprimidos (que incluyen, por ejemplo, comprimidos revestidos), gránulos, polvos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas (que incluyen, por ejemplo, cápsulas de gelatina duras y blandas), obleas, píldoras, ampollas, bolos, supositorios, pesarios, tinturas, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, espumas, pulverizaciones, nieblas, o aerosoles.

65 Las formulaciones se pueden proporcionar de forma adecuada en forma de un parche, esparadrapo adhesivo,

venda, vendaje, o similar que se impregna con uno o más compuestos y opcionalmente uno o más ingredientes distintos farmacéuticamente aceptables, que incluyen, por ejemplo, potenciadores de penetración, permeación, y absorción. Las formulaciones también se pueden proporcionar de forma adecuada en forma de un depósito o recipiente.

5 El compuesto se puede disolver en, suspender en, o mezclar con uno o más ingredientes distintos farmacéuticamente aceptables. El compuesto se puede presentar en un liposoma u otro material formado por micropartículas que se diseña para dirigir el compuesto, por ejemplo, a componentes de la sangre o uno o más órganos.

10 Las formulaciones adecuadas para administración oral (por ejemplo, mediante ingestión) incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, obleas, píldoras, ampollas, bolos.

15 Las formulaciones adecuadas para administración bucal incluyen lavados bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, esparadrapos adhesivos, depósitos, y recipientes. Las pastillas para chupar comprenden por lo general el compuesto en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto. Las pastillas comprenden por lo general el compuesto en una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica. Los lavados bucales comprenden por lo general el compuesto en un vehículo líquido adecuado.

20 Las formulaciones adecuadas para administración sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas, y píldoras.

25 Las formulaciones adecuadas para administración transmucosa incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), lavados bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, esparadrapos adhesivos, depósitos, y recipientes.

30 Las formulaciones adecuadas para administración transmucosa no oral incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), supositorios, pesarios, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, así como parches, esparadrapos adhesivos, depósitos, y recipientes.

35 Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica incluyen geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, y aceites, así como parches, esparadrapos adhesivos, depósitos, y recipientes.

40 Los comprimidos se pueden preparar mediante medios convencionales, por ejemplo, compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos formados por compresión se pueden preparar mediante compresión en una máquina adecuada del compuesto en una forma de fluido libre tal como un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con uno o más aglutinantes (por ejemplo, povidona, gelatina, goma arábica, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetil celulosa); cargas o diluyentes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón glicolato sódico, povidona reticulada, carboximetil celulosa sódica reticulada);  
45 agentes tensioactivos o dispersantes o humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico); conservantes (por ejemplo, *p*-hidroxibenzoato de metilo, *p*-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico); aromas, agentes potenciadores de aroma, y edulcorantes. Los comprimidos formados por moldeado se pueden preparar por moldeado en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden revestir o ranurar opcionalmente y se pueden formular de un modo tal que proporcionen una liberación lenta o controlada del compuesto en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos se pueden proporcionar opcionalmente con un revestimiento, por ejemplo, que afecte a la liberación, por ejemplo un revestimiento entérico, para proporcionar la liberación en partes del intestino en lugar del estómago.

50 Las pomadas se preparan por lo general a partir del compuesto y una base de pomada parafínica o miscible en agua.

55 Las cremas se preparan por lo general a partir del compuesto y una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente un 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol y las mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de forma deseable un compuesto que mejore la absorción o penetración del compuesto través de la piel u otras áreas afectadas. Algunos ejemplos de tales potenciadores de penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

60 Las emulsiones se preparan por lo general a partir del compuesto y una fase aceitosa, que puede comprender

opcionalmente simplemente un emulgente (conocido de otro modo como emulsionante), o puede comprender una mezcla de al menos un emulgente con una grasa o un aceite o con tanto una grasa como un aceite. Preferentemente, se incluye un emulgente hidrófilo junto con un emulgente lipófilo que actúa como estabilizador. También es preferente incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el emulgente o emulgentes con o sin el estabilizador o estabilizadores componen la denominada cera emulgente, y la cera junto con el aceite y/o la grasa componen la denominada base de pomada emulgente que forma la fase dispersa aceitosa de las formulaciones de crema.

Los emulgentes y los estabilizadores de emulsión adecuados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico. La selección de los aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en la consecución de las propias cosméticas deseadas, dado que la solubilidad del compuesto en la mayoría de los aceites que es probable que se usen en las formulaciones de emulsión farmacéuticas puede ser muy baja. De ese modo, la crema sería preferentemente un producto no graso que no mancha y lavable con una consistencia adecuada para evitar la pérdida de tubos u otros recipientes. Se pueden usar ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, modo o dibásicos tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo preferentes los tres últimos ésteres. Se pueden usar solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, se pueden usar lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para administración intranasal, donde el vehículo es un líquido, incluyen, por ejemplo, pulverización nasal, gotas nasales, o mediante administración de aerosol con nebulizador, incluyen soluciones acuosas o aceitosas del compuesto.

Las formulaciones adecuadas para administración intranasal, donde el vehículo es un sólido, incluyen, por ejemplo, las presentadas en forma de un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micrómetros que se administra de una forma en la que se toma una *puf*, es decir, mediante inhalación rápida a través de las vías nasales desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz.

Las formulaciones adecuadas para administración pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insufla) incluyen las que se presentan en forma de una pulverización de aerosol a partir de un envase presurizado, con el uso de un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otros gases adecuados.

Las formulaciones adecuadas para administración ocular incluyen gotas oculares en las que el compuesto se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el compuesto.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal se pueden presentar en forma de un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato; o en forma de una solución o suspensión para tratamiento mediante enema.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del compuesto, vehículos tales como los conocidos en la técnica que son apropiados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección), incluyen líquidos acuosos o no acuosos, isotónicos, exentos de pirógenos, estériles (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los que el compuesto se disuelve, se suspende, o se proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otro material formado por micropartículas). Tales líquidos pueden contener además otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizadores, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes, y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre (u otro fluido corporal pertinente) del receptor pretendido. Algunos ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, y similares. Algunos ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro sódico, solución de Ringer, o inyección de Ringer con lactato. Por lo general, la concentración del compuesto en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes cerrados herméticamente de dosis individual o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos, y comprimidos estériles.

Dosificación

El experto en la materia ha de entender que las dosificaciones apropiadas de los compuestos HMC, y las composiciones que comprenden los compuestos HMC, pueden variar de paciente a paciente. La determinación de la dosificación óptima implicará generalmente el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efecto secundario perjudicial. En nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto HMC particular, la ruta de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto HMC, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos, y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, condiciones, salud general, e historia médica anterior del paciente. La cantidad de compuesto HMC y la ruta de administración estarán en última instancia a discreción del médico, veterinario, o clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para conseguir concentraciones locales en el sitio de acción que consigan el efecto deseado sin causar efectos secundarios nocivos o perjudiciales sustanciales.

La administración se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas en intervalos apropiados) en el curso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y la dosificación de administración más eficaces se conocen bien por parte de los expertos en la materia y variarán con la formulación usada para la terapia, el fin de la terapia, la célula o células diana que se van a tratar, y el sujeto que se va a tratar. Se pueden realizar administraciones individuales o múltiples con el nivel y patrón de dosis que se seleccione por parte del médico, veterinario, o clínico a cargo del tratamiento.

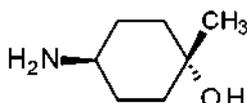
En general, una dosis adecuada del compuesto HMC está en el intervalo de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 20 mg (más habitualmente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg) por kilogramo de peso corporal de sujeto por día. Para administración pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación), una dosificación adecuada está en el intervalo de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 1 mg por kilogramo de peso corporal de sujeto por día. Cuando el compuesto es una sal, un éster, una amida, un profármaco, o similar, la cantidad administrada se calcula sobre la base del compuesto precursor y de modo que el peso real que se usa se aumente de forma proporcional.

30 Síntesis químicas

En el presente documento se describen métodos para la síntesis química de los compuestos HMC. Estos y/o otros métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, Greig *et al.*, 2010a; Bahmanyar *et al.*, 2010) se pueden modificar y/o adaptar de formas conocidas con fin de proporcionar métodos de síntesis alternativos o mejorados.

35 Síntesis 1

(1*r*,4*r*-4-Amino-1-metilciclohexan-1-ol)

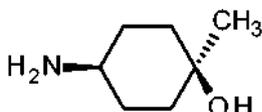


Se añadió hidróxido de paladio (50 % húmedo con agua; 2,0 g) a una solución en agitación de (1*r*,4*r*)-4-(dibencilamino)-1-metilciclohexanol (7,5 g, 24,2 mmol) en metanol (100 ml) en una autoclave de 300 ml. La autoclave se cargó con hidrógeno (50 atm; ~5 MPa) y se calentó a 80 °C durante 24 horas. La mezcla se enfrió y el catalizador se retiró por filtración. El filtrado se devolvió a la autoclave y se añadió hidróxido de paladio (50 % húmedo con agua; 3,0 g). La autoclave se cargó con hidrógeno (50 atm; ~50 MPa) y se calentó a 80 °C durante una noche. La mezcla se enfrió y se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró para dar el compuesto del título en forma de un sólido gomoso de color blanquecino (3,2 g, cuant.).

RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 2,86-2,76 (1H, m), 1,84-1,76 (2H, m), 1,75-1,63 (2H, m), 1,55-1,43 (2H, m), 1,30-1,17 (5H, m).

50 Síntesis 1A

(1*s*,4*s*)-4-Amino-1-metilciclohexan-1-ol

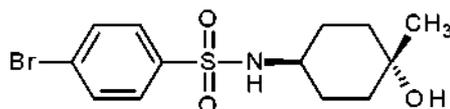


Se desbencilaron por separado cuatro lotes iguales de (1*s*,4*s*)-4-dibencilamino-1-metilciclohexan-1-ol (cada lote

tenía 15 g, total 60 g) como sigue a continuación: a (1*s*,4*s*)-4-dibencilamino-1-metilciclohexan-1-ol (15 g, 193,9 mmol) en etanol (450 ml) se añadió hidróxido de paladio al 10 % (15 g, catalizador húmeda 50 %). Las mezclas de reacción se lavaron abundantemente con nitrógeno seguido de hidrógeno gaseoso y se agitaron en una atmósfera de hidrógeno durante 16 horas a temperatura ambiente. La solución se filtró a través de Celite y se lavó con una cantidad tradicional acetato de etilo. Los filtrados de los cuatro lotes se combinaron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (23 g, 91,8 % rendimiento). El compuesto se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.  
 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,6 (m, 1H), 1,74-1,56 (m, 4H), 1,5-1,3 (m, 7H), 1,21 (s, 3H).

## 10 Síntesis 2

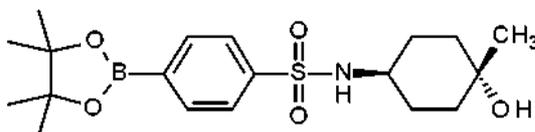
4-Bromo-*N*((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)benzenosulfonamida



Se añadió diisopropiletilamina (24 ml, 137,8 mmol) a una solución de (1*r*,4*r*)-4-amino-1-metilciclohexanol (3,6 g, 27,86 mmol) en diclorometano (150 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadió cloruro de 4-bromobenceno-1-sulfonilo (7,83 g, 30,6 mmol) en forma sólida y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido clorhídrico 1 M y el compuesto se extrajo en diclorometano. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se lavó con pentano, se filtró y se secó para dar el compuesto del título (7 g, 72 %).  
 RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 7,74 (2H, d), 7,65 (2H, d), 4,77-4,61 (1H, m), 3,33-3,23 (1 H, m), 1,85-1,75 (2H, m), 1,63-1,51 (2H, m), 1,49-1,30 (4H, m), 1,20 (3H, s).  
 LCMS: (Tiempo de proceso: 3,5 min): Tiempo de retención: 1,33 min (97 %, MS (ESI) *m/z* 346 (M - H)<sup>+</sup>).

## 25 Síntesis 3

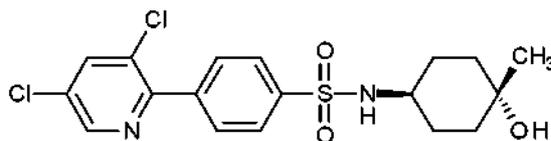
*N*((1*r*,4*r*)-4-Hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzenosulfonamida



Una solución de 4-bromo-*N*((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)benzenosulfonamida (9 g, 25,8 mmol), 4,4,4',4',5,5,5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (9,87 g, 38,9 mmol) y acetato potásico (7,6 g, 77,5 mmol), en tolueno (50 ml) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (1,8 g, 2,5 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min y se agitó a 100 °C durante 4 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título (8 g, 78 %). MS (ESI) *m/z* 394 (M-H)<sup>+</sup>. Para lotes a gran escala, el compuesto se usó sin purificación adicional. Cuando esta preparación se llevó a cabo a una escala menor, el residuo se recogió en éter, se filtró y el filtrado se concentró para dar el producto deseado.

## 40 Síntesis 4

4-(3,5-Dicloropiridin-2-il)-*N*((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)benzenosulfonamida (HMC-N-03-A)



Una mezcla de dioxano y agua (3:1; 20 ml) se desgasificó. Se añadieron 2,3,5-tricloropiridina (1,65 g, 9,0 mmol), *N*((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzenosulfonamida (1,8 g, 4,6 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,24 g, 9,0 mmol) y [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (257 mg, 0,35 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C en un horno microondas durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró, se diluyó

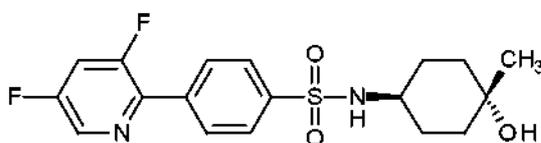
con acetato de etilo y se lavó con agua. Los extractos orgánicos se secaron ( $MgSO_4$ ) y se concentraron para dar un residuo en bruto que se purificó por columna ultrarrápida (eluyente: de un 40 a un 50 % de acetato de etilo en heptano). El producto se purificó adicionalmente por cristalización tres veces (acetato de etilo/ heptano) para dar el compuesto del título (284 mg, 15 %).

5 RMN  $^1H$ : (400 MHz;  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,59 (1H, m), 7,97 (2H, d), 7,92-7,85 (3H, m), 4,62-4,55 (1 H, m), 3,38-3,28 (1 H, m), 1,92-1,76 (2H, m), 1,8-1,35 (7H, m), 1,22 (3H, s).

10 LCMS: fase móvil A: 0,05 % de ácido trifluoroacético en agua, fase móvil B: 0,05 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo; columna: YMC ODS A, C18 (50 x 4,6 mm) 3  $\mu$ m; caudal: 1,2 ml/min; temperatura: ambiente. Tiempo de proceso: 4,5 min -el disolvente de partida B:A 20:80 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 3 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 0,5 min y a continuación se vuelve inmediatamente a B:A 20:80 durante los últimos 1,5 min. Tiempo de retención: 2,50 min,  $m/z$  415 (M + H) $^+$ .

### Síntesis 5

15 4-(3,5-Difluoropiridin-2-il)-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)benzenosulfonamida (HMC-N-02-A)



20 Una solución en agitación de dioxano : agua (9:1; 100 ml), *N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzenosulfonamida (20 g, 50,6 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (14,73 g, 75,94 mmol) y carbonato sódico (10,73 g, 101,2 mmol) se desgasificó usando argón durante 10 minutos. Se añadía [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (3,7 g, 5,06 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 minutos y se agitó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y las fracciones se concentraron hasta un volumen mínimo y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de *n*-pentano para dar el compuesto del título (8 g, 41 %).

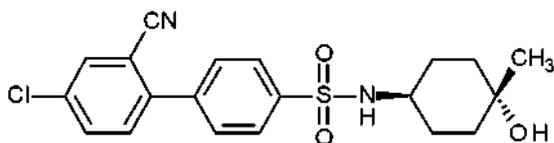
25 RMN  $^1H$ : (400 MHz; metanol- $d_4$ )  $\delta$  8,54 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 8,11 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,99 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,74 (m, 1 H), 3,20 (m, 1 H), 1,83 - 1,27 (m, 8H), 1,18 (s, 3H).

30 LCMS: fase móvil A: formiato amónico 10 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3  $\mu$ m; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 1,75 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 1,25 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 1,88 min,  $m/z$  381 (M - H) $^+$ .

35

### Síntesis 6

4'-Cloro-2'-ciano-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bifenil-4-sulfonamida (HMC-C-01-A)

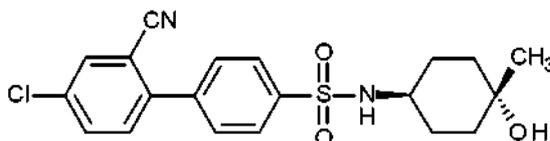


40

45 Una solución en agitación de dioxano : agua (9:1; 100 ml), *N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzenosulfonamida (12 g, 30,4 mmol), 2-bromo-5-clorobenzonitrilo (9,86 g, 45,5 mmol) y carbonato sódico (6,44 g, 60,8 mmol) se desgasificó usando argón durante 10 minutos. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (2,21 g, 3,0 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 minutos y se agitó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida seguido de lavado con *n*-pentano (dos veces) y se secó al vacío a 45-50 °C para dar el compuesto del título (5,7 g, 46,5 %).

50 RMN  $^1H$  (400 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  8,01 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,95 (m, 1 H), 7,83-7,74 (m, 3H), 7,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1 H), 3,25 - 3,17 (m, 1 H), 1,8-1,54 (m, 4H), 1,47-1,34 (m, 4H), 1,18 (s, 3H).

55 LCMS: fase móvil A: formiato amónico 10 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3  $\mu$ m; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2,5 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 0,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 1 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,167 min,  $m/z$  403 (M - H) $^+$ .

Síntesis 6A4'-Cloro-2'-ciano-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bifenil-4-sulfonamida (HMC-C-01-A)

5

En un matraz de 10 l se cargaron (1*r*,4*r*)-4-amino-1-metilciclohexan-1-ol (123,7 g, 0,957 mol) finamente dividido y diclorometano (2400 ml). Se añadió gota a gota trietilamina (534 ml, 3,830 mol). La suspensión se enfrió por debajo de 5 °C y se añadió gota a gota cloruro de 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzeno-1-sulfonilo (298,9 g, 0,957 mol) en diclorometano (768 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 25 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 40 horas. La mezcla de reacción se enfrió por debajo de 10 °C y se añadió gota a gota ácido clorhídrico acuoso 2 M (2090 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 25 °C (reacción exotérmica y vapores de color blanco observados). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con agua (2090 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron, y el residuo se lavó con diclorometano (2 x 50 ml). Los filtrados combinados se combinaron a continuación con el producto en bruto de una reacción a escala menor similar de cloruro de 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzeno-1-sulfonilo (50 g) y (1*r*,4*r*)-4-amino-1-metilciclohexan-1-ol, y todos los materiales combinados se adsorbieron directamente sobre sílice (800 g). Esto se purificó por cromatografía sobre sílice (8000 g) eluyendo inicialmente con acetato de etilo : diclorometano 20:80, y a continuación secuencialmente con mezclas de acetato de etilo : diclorometano 30:70, 40:60, 50:50, seguido de acetato de etilo puro. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para proporcionar un sólido de color amarillo. Este material se secó en un horno de vacío durante una noche a 40 °C para proporcionar el compuesto del título (406,8 g; 88 % de rendimiento global). El análisis por RMN indicó una pureza de > 97 %.

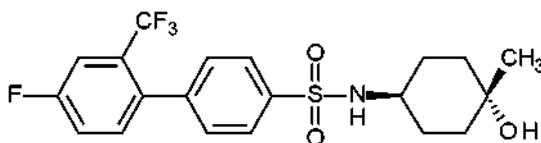
RMN <sup>1</sup>H: (270 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 8,02 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,78 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,73-7,63 (m, 3H), 7,49 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,89 (d, J = 7 Hz, 1H), 3,38 (m, 1H), 1,98-1,75 (m, 2H), 1,75-1,3 (m, 7H, m), 1,23 (s, 3H).

HPLC: fase móvil A: agua purificada + 0,1 % ácido trifluoroacético, fase móvil B: acetonitrilo + 0,1 % ácido trifluoroacético; columna: Fortis C18 4,6 x 150 mm; 3 µM; caudal: 1,0 ml/min. Tiempo de proceso: 30 min - el disolvente de partida B:A 5:95 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 15 min, se mantiene a B:A 95:5 durante los 15 min finales. Tiempo de retención 12,0 min. Espectro de masas: Bruker Esquire 3000 Plus Ion Trap MS; polaridad de ion positivo, ESI: m/z 403 (M - H)<sup>+</sup>.

30

Síntesis 74'-Fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-2'-(trifluorometil)bifenil-4-sulfonamida (HMC-C-02-A)

35

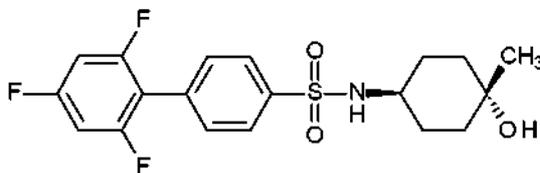


Una solución en agitación de dioxano : agua (9:1; 100 ml), *N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzenosulfonamida-il)benzenosulfonamida (20 g, 50,6 mmol), 1-bromo-4-fluoro-2-(trifluorometil)benzeno (18,45 g, 75,9 mmol) y carbonato sódico (10,73 g, 101,2 mmol) se desgasificó usando argón durante 10 minutos. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II) (3,7 g, 5,06 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 minutos y se agitó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y las fracciones se concentraron y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un volumen mínimo de diclorometano seguido de lavado con *n*-pentano (dos veces) y se secó al vacío a 45-50 °C para dar el compuesto del título (10,2 g, 47 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 7,93 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,59 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,46 (d, J = 6,6 Hz, 2H), 3,20 (m, 1H), 1,79 - 1,51 (m, 4H), 1,49 - 1,30 (m, 4H), 1,18 (s, 3H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 10 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 1,75 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 1,25 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,16 min, m/z 430 (M - H)<sup>+</sup>.

55

Síntesis 82',4',6'-Trifluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bifenil-4-sulfonamida (HMC-C-03-A)

5

Una mezcla de dioxano : agua (3:1; 20 ml) se desgasificó. Se añadieron 1-bromo-2,4,6-trifluorobenceno (1,91 g, 9,1 mmol), *N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (1,8 g, 4,6 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,24 g, 9,0 mmol) y [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (257 mg, 0,35 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C en un horno microondas durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron para dar un residuo en bruto que se purificó por columna ultrarrápida (eluyente: de un 40 a un 50 % de acetato de etilo en heptano). El producto se purificó adicionalmente por cristalización (acetato de etilo/ heptano) para dar el compuesto del título (620 mg, 34 %).

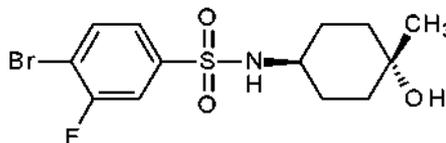
10

RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 7,95 (d, 2H), 7,58 (d, 2H), 6,80 (t, 2H), 4,62-4,52 (m, 1H), 3,41-3,30 (m, 1H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,66-1,34 (m, 6H), 1,22 (s, 3H).

15

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 10 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 5,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2,5 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 1,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,40 min m/z 400 (M + H)<sup>+</sup>.

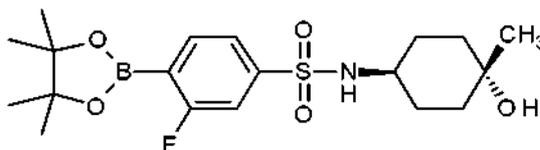
20

Síntesis 925 4-Bromo-3-fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bencenosulfonamida

30

Se añadió diisopropiletilamina (20 ml, 116,2 mmol) a una solución de (1*r*,4*r*)-4-amino-1-metilciclohexanol (3 g, 23,2 mmol) en diclorometano (150 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadió cloruro de 4-bromo-3-fluorobenceno-1-sulfonilo (6,98 g, 25,5 mmol) en forma sólida y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido clorhídrico 1 M y el compuesto se extrajo en diclorometano. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se lavó con *n*-pentano, se filtró y se secó para dar el compuesto del título (7 g, 82 %). MS (ESI) *m/z* 368 (M + H)<sup>+</sup>.

35

Síntesis 1040 3-Fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida

45

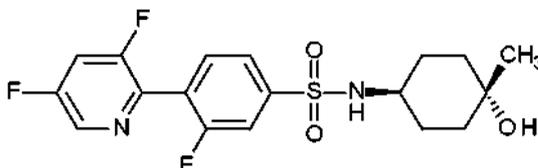
Una solución en agitación de tolueno (50 ml), 4-bromo-3-fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bencenosulfonamida (9 g, 24,6 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (9,33 g, 36,7 mmol) y acetato potásico (7,23 g, 73,7 mmol) se desgasificó usando argón durante 10 minutos. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (1,8 g, 2,5 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 minutos y se agitó a 110 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título (10 g, 98 %). Para lotes a gran escala, el compuesto se usó sin purificación adicional.

Cuando esta preparación se llevó a cabo escala menor, el residuo se recogió en éter, se filtró y el filtrado se concentró para dar el producto deseado. MS (ESI)  $m/z$  412 (M - H)<sup>+</sup>.

### Síntesis 11

5

4-(3,5-Difluoropiridin-2-il)-3-fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bencenosulfonamida (HMC-N-01-A)



10 Una solución en agitación de dioxano (50 ml), 3-fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (18 g, 43,6 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (12,68 g, 65,37 mmol) y carbonato de cesio (35,52 g, 109,0 mmol) se desgasificó usando argón durante 10 minutos. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (3,2 g, 4,4 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 minutos y a continuación se agitó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice seguido de lavado con n-pentano para dar el compuesto del título (8,19 g, 47 %).  
 15 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 8,55 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H), 7,87 - 7,71 (m, 4H), 3,24 (m, 1 H), 1,8-1,7 (m, 2H), 1,66-1,55 (m, 2H), 1,51 - 1,34 (m, 4H), 1,19 (s, 3H).

20

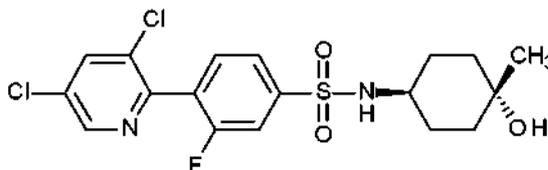
LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 uM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2,5 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 0,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 1 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 1,88 min,  $m/z$  399 (M - H)<sup>+</sup>.

25

### Síntesis 12

30

4-(3,5-Dicloropiridin-2-il)-3-fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bencenosulfonamida (HMC-N-04-A)



Una solución de 3-fluoro-*N*-((1*r*,4*r*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (0,338 g, 0,82 mmol) en dimetoxietano (10 ml) se purgó con argón durante 15 min. Se añadieron 2-bromo-3,5-dicloropiridina (0,185 g, 0,82 mmol) y carbonato sódico (0,175 g, 1,65 mmol) en agua y se desgasificaron usando argón durante 30 minutos. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,12 g, 0,16 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 minutos y a continuación se agitó a 80 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se filtró a través de Celite. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando 50 % de acetato de etilo en hexano para dar el compuesto del título (0,04 g, 11 %).

35 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 1,19 (3H, s), 1,33 - 1,52 (4H, m), 1,54-1,66 (2H, m), 1,69 - 1,82 (2H, m), 3,25 (1 H, m), 7,68 (1 H, m), 7,75 (1 H, m), 7,82 (1 H, m), 8,20 (1 H, d, *J* = 2,1 Hz), 8,65 (1 H, d, *J* = 2,1 Hz).

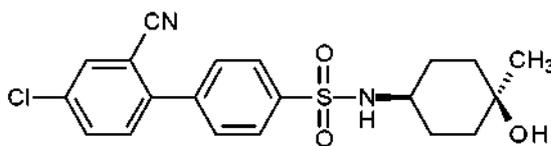
LCMS: fase móvil A: formiato amónico 10 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 uM; caudal: 1,2 ml/min. Tiempo de proceso: 5 min - el disolvente de partida B:A 35:65 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2,5 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,3 min, se reduce inmediatamente a B:A 35:65 durante los 1,2 min finales. Tiempo de retención 2,59 min  $m/z$  431 (M - H)<sup>+</sup>.

45

### Síntesis 13

50

4'-Cloro-2'-ciano-*N*-((1*s*,4*s*)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-01-B)



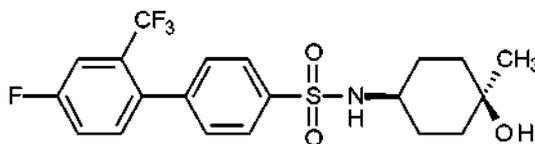
Una solución de N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (17 g, 43,0 mmol), 2-bromo-5-clorobenzonitrilo (14 g, 64,7 mmol) y carbonato sódico (9,1 g, 86 mmol) en dioxano : agua (240 ml, 9:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (3,14 g, 4,3 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 usando un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente. Las fracciones se concentraron hasta 1/10 del volumen (85 ml) y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 5,8 g, 33 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,04 - 7,97 (m, 2H), 7,79 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,69-7,64 (m, 3H), 7,48 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,45 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,3-3,15 (a, 1H), 1,74 - 1,51 (m, 6H), 1,45-1,35 (m, 2H), 1,20 (s, 3H), 1,00 (s, 1H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 uM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,62 min *m/z* 403,30 [M - 1].

#### Síntesis 14

4'-Fluoro-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-02-B)



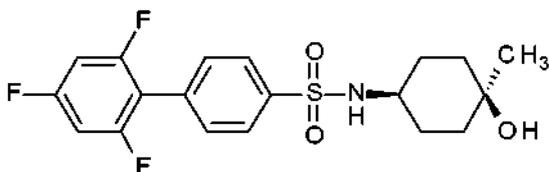
Una solución de N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (13,5 g, 34,1 mmol), 1-bromo-4-fluoro-2-(trifluorometil)benceno (12,45 g, 51,2 mmol) y carbonato sódico (7,24 g, 68,3 mmol) en dioxano : agua (230 ml, 9:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (2,49 g, 3,4 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 usando un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente. Las fracciones se concentraron hasta 1/10 del volumen (80 ml) y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 5,6 g, 20 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,97 - 7,88 (m, 2H), 7,52 - 7,40 (m, 3H), 7,31 (dd, J = 7,0, 2,4 Hz, 2H), 4,40 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,25-3,12 (a, 1H), 1,70-1,50 (m, 6H), 1,45-1,33 (m, 2H), 1,20 (s, 3H), 1,00 (s a, 1H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 uM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,79 min *m/z* 430 [M - 1].

#### Síntesis 15

2',4',6'-Trifluoro-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-03-B)



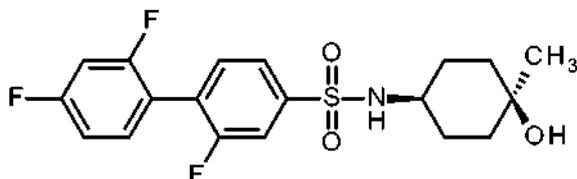
Una solución de N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (15 g, 37,9 mmol), 2-bromo-1,3,5-trifluorobenceno (12 g, 56,9 mmol) y carbonato sódico (8,03 g, 75,8 mmol) en dioxano : agua (250 ml, 9:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (2,77 g, 3,8 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 usando un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente. Las fracciones se concentraron hasta 1/10 del volumen (90 ml) y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 4,98 g, 18 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,99 - 7,92 (m, 2H), 7,61 - 7,53 (m, 2H), 6,80 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H), 4,39 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 3,25-3,12 (a, 1 H), 1,75 - 1,51 (m, 6H), 1,48 - 1,33 (m, 2H), 1,20 (s, 3H), 0,99 (s, 1 H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoníaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoníaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µm; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal a B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,65 min *m/z* 398 [M - 1].

#### Síntesis 16

2,2',4'-Trifluoro-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-04-B)



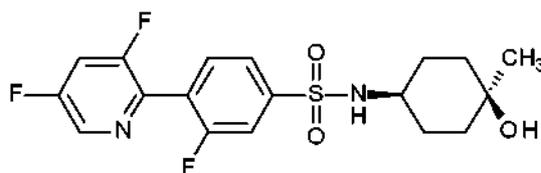
Una solución de 3-fluoro-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (3,1 g, 7,5 mmol), 1-bromo-2,4-difluorobenceno (2,1 g, 10,9 mmol) y carbonato sódico (1,6 g, 15,0 mmol) en dioxano : agua (60 ml, 5:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,548 g, 0,75 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 con un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 0,6 g, 18 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,73-7,69 (m, 2H), 7,56-7,47 (m, 1H), 7,44-7,32 (m, 2H), 7,06 - 6,91 (m, 2H), 4,41 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 3,27-3,14 (a, 1 H), 1,76 - 1,52 (m, 6H), 1,48 - 1,35 (m, 2H), 1,21 (s, 3H), 0,97 (s, 1 H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoníaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoníaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µm; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,70 min *m/z* 398 [M - 1].

#### Síntesis 17

4-(3, 5-Difluoropiridin-2-il)-3-fluoro-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil) bencenosulfonamida (HMC-N-01-B)



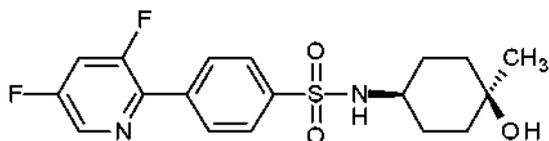
Una solución de 3-fluoro-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (22 g, 53,2 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (15,5 g, 79,9 mmol) y carbonato de cesio (52,0 g, 159,6 mmol) en dioxano : agua (100 ml) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (3,9 g, 5,3 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 usando un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente. Las fracciones se concentraron hasta 1/10 del volumen (110 ml) y se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 5,6 g, 26 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,50 (m, 1H), 7,83 - 7,67 (m, 3H), 7,41-7,33 (m, 1 H), 4,43 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 3,28-3,13 (m, 1 H), 1,74 - 1,52 (m, 6H), 1,46-1,35 (m, 2H), 1,21 (s, 3H), 0,97 (s, 1 H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,42 min *m/z* 399 [M - 1].

#### Síntesis 18

4-(3, 5-Difluoropiridin-2-il)-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bencenosulfonamida (HMC-N-02-B)



A una solución en agitación de N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (26,5 g, 67,0 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (19,5 g, 100,5 mmol) y carbonato sódico (14,22 g, 134,2 mmol) en dioxano: agua (250 ml, 9:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (4,90 g, 6,70 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 usando un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente. Las fracciones se concentraron hasta 1/10 del volumen (100 ml) y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 5,9 g, 26 % (en 2 etapas).

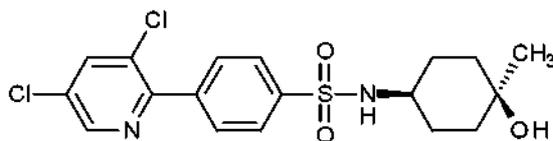
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,48 (d, J = 2,4 Hz, 1 H), 8,13 - 8,06 (m, 2H), 7,98 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,39-7,31 (m, 1 H), 4,39 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 3,25-3,1 (a, 1 H), 1,72 - 1,5 (m, 6H), 1,42-1,32 (m, 2H), 1,19 (s, 3H), 0,96 (s, 1H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,41 min *m/z* 381 [M - 1].

#### Síntesis 19

4-(3,5-Dicloropiridin-2-il)-N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)bencenosulfonamida (HMC-N-03-B)

50



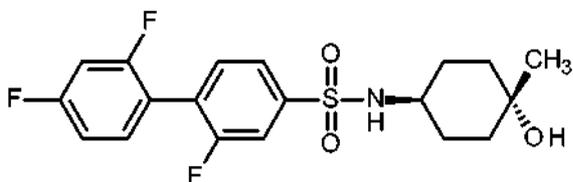
Una solución de N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (1,5 g, 3,8 mmol), 2-bromo-3,5-dicloropiridina (1,3 g, 5,7 mmol) y carbonato sódico (0,805 g, 7,6 mmol) en dioxano : agua (18 ml, 5:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,277 mg, 0,38 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. Una solución adicional de N-((1s,4s)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (4 g, 10,1 mmol), 2-bromo-3,5-dicloropiridina (3,44 g, 15,2 mmol) y carbonato sódico (2,14 g, 20,2 mmol) en dioxano:agua (54 ml, 5:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,739 g, 1,0 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. Los dos lotes anteriores se combinaron. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando gel de sílice de malla 100-200 con un 20-40 % de acetato de etilo en hexano como eluyente. Las fracciones se concentraron hasta 1/10 del volumen (30 ml) y a continuación se filtraron. El residuo obtenido se lavó con un 20 % de acetato de etilo en hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 0,79 g, 14 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,59 (m, 1 H), 8,02 - 7,94 (m, 2H), 7,90 - 7,83 (m, 3H), 4,47 (d, J = 8 Hz, 1 H), 3,25-3,1 (a, 1 H), 1,73 - 1,5 (m, 6H), 1,44-1,32 (m, 2H), 1,19 (s, 3H), 1,01 (s, 1 H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µm; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,69 min *m/z* 413 [M - 1].

#### Síntesis 20

2,2',4'-Trifluoro-N-((1r,4r)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-04-A)



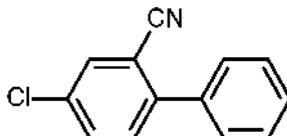
Una solución de 3-fluoro-N-((1r,4r)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (3,5 g, 8,4 mmol), 1-bromo-2,4-difluorobenceno (2,44 g, 12,7 mmol) y carbonato sódico (1,79 g, 16,9 mmol) en dioxano : agua (60 ml, 5:1) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,619 g, 0,85 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadió agua, y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante purificación por SFC: Fase móvil: CO<sub>2</sub>:metanol (05-50 en 5 min), columna: Silica 2-etilpiridina (250 x 4,6 mm, 5 µ), flujo: 3 ml/min, longitud de onda: 210-400 nm para proporcionar el compuesto del título. Rendimiento: 0,7 g, 19 % (en 2 etapas).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,78-7,64 (m, 2H), 7,62-7,45 (m, 1H), 7,44-7,34 (m, 1 H), 7,06 - 6,91 (m, 2H), 4,51 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 3,40-3,35 (a, 1 H), 1,95 - 1,83 (m, 2H), 1,67 - 1,37 (m, 6H), 1,25 (d, J = 3,3 Hz, 3H), 1,13 (s, 1 H).

LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µm; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 4,5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,56 min *m/z* 398 [M - 1].

#### Síntesis 21

## 5-Cloro-2-fenilbenzonitrilo

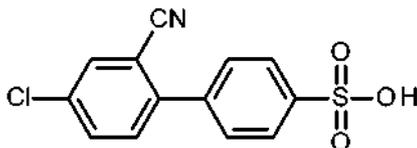


- 5 Se añadieron 2-bromo-5-cloro-benzonitrilo (297,0 g, 1,372 mol), ácido fenil borónico (184,0 g, 1,509 mol), carbonato sódico (436,3 g, 4,116 mol), 1,2-dimetoxietano (4455 ml) y agua (1485 ml) a un vaso en atmósfera de nitrógeno. El matraz se desgasificó tres veces con nitrógeno y se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (79,3 g, 0,069 mol). El matraz se desgasificó tres veces con nitrógeno y se agitó y se calentó a 70 °C y a continuación se agitó a esa temperatura durante 24 h. Se añadieron cantidades adicionales de ácido fenil borónico (36,8 g, 0,302 mol), carbonato sódico (87,3 g, 0,824 mol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (15,9 g, 0,014 mol) y la mezcla se agitó durante un período adicional de 16 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y la suspensión se filtró y el sólido se lavó con acetato de etilo (2 x 2000 ml). Los filtrados combinados se separaron y la fase orgánica se lavó con solución salina saturada (2 x 2000 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el sólido se lavó con acetato de etilo (1000 ml). Los filtrados combinados se concentraron mientras se absorbían sobre gel de sílice (600 g). El material en bruto se purificó sobre gel de sílice (6 kg) eluyendo con un 25-50 % de tolueno en heptano. Las fracciones puras se combinaron y se concentraron para dar un sólido de color blanco. El sólido se destiló azeotrópicamente con heptano (8 x 800 ml) para retirar cualquier cantidad residual de tolueno y dar el compuesto objetivo. Rendimiento = 215,9 g (73,6 %).
- 15 RMN <sup>1</sup>H (270 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 8,18 - 8,12 (m, 1 H), 7,86 (dd, J = 8,4 Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,7 - 7,45 (m, 6 H).

20

Síntesis 22

## Ácido 4-(4-cloro-2-cianofenil)benceno-1-sulfónico



25

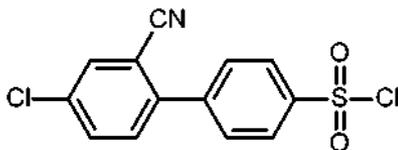
- En un matraz de 5 l se cargaron 5-cloro-2-fenilbenzonitrilo (407,8 g, 1,909 mol) en bruto y cloroformo (2325 ml). La solución de color amarillo pálido se enfrió a menos de 5 °C y se añadió ácido clorosulfónico (343 ml, 5,15 mol), manteniendo la temperatura a menos de 10 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y la solución de color pardo oscuro se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a 20 °C y el residuo se disolvió en acetato de etilo (2325 ml) - se observó exoterma a 33 °C. Se añadió agua (490 ml) (exoterma a 64 °C) seguido de solución salina saturada (1920 ml), y la mezcla se enfrió a 19 °C. La suspensión espesa se filtró (filtración muy lenta) y el residuo se lavó con agua (2 x 1 l) y acetato de etilo (2 x 1,5 l). La torta de filtro se secó al vacío a 40 °C durante 64 horas para proporcionar 435 g de material en forma de un sólido de color amarillo. Este se suspendió en acetato de etilo (1740 ml) a temperatura ambiente durante 20 minutos. La suspensión se filtró y el residuo se lavó con acetato de etilo (435 ml). La torta de filtro se secó al vacío a 40-60 °C durante dos noches para proporcionar un sólido de color crema (366,3 g), que contenía 289 g del compuesto del título (52 % rendimiento). El análisis mediante Karl Fischer mostró que el producto contenía un 4,3 % de agua.
- 30 RMN <sup>1</sup>H (270 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 8,16 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 7,85 (dd, J = 2,3 Hz, 8,5 Hz, 1 H), 7,73 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,65 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,54 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

40

Síntesis 23

## Cloruro de 4-(4-cloro-2-cianofenil)benceno-1-sulfonilo

45



- En un matraz de 5 l se cargaron ácido 4-(4-cloro-2-cianofenil)benceno-1-sulfónico en bruto (366,3 g, que contenía 289 g de ácido 4-(4-cloro-2-cianofenil)benceno-1-sulfónico, 0,98 mol) y tolueno (3000 ml). Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (423 ml, 5,83 mol) seguido de dimetilformamida (5 ml, 0,0646 mol). La mezcla de reacción se

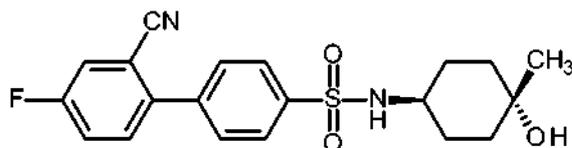
50

calentó a 75 °C y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió, se concentró al vacío, y el residuo se repartió entre acetato de etilo (3000 ml) y agua (1500 ml) y la fase orgánica se lavó con solución salina saturada (1500 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro (50 g) y se filtró. El residuo se lavó con acetato de etilo (2 x 100 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron para proporcionar el compuesto del título (297,6 g, 93 % rendimiento) en forma de un sólido de color amarillo. El análisis por RMN indicó una pureza de ~95 %.

RMN <sup>1</sup>H (270 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 8,16 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,87 (dd, J = 2,1 Hz, 8,2 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,64 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,54 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

#### 10 Síntesis 24

##### 2'-Ciano-4'-fluoro-N-((1r,4r)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-05-A)



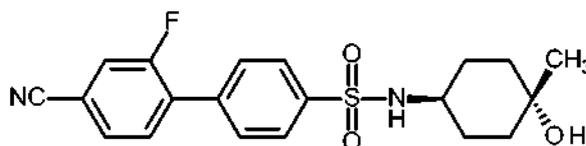
15 Una solución en agitación de N-((1r,4r)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (1,6 g, 4,05 mmol), 2-bromo-5-fluorobenzonitrilo (2,03 g, 10,15 mmol), carbonato sódico (1,07 g, 10,1 mmol) en dioxano: agua (30:3 ml) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,296 g, 0,405 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min y se agitó a 110 °C durante 6 h. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice. El residuo obtenido se lavó con hexano seguido de n-pentano para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 1,1 g, 70 %.

25 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,04 - 7,97 (m, 2 H), 7,71 - 7,64 (m, 2 H), 7,55 - 7,49 (m, 2 H), 7,39 - 7,46 (m, 1 H), 4,46 (d, J = 6,6 Hz, 1 H), 3,45 - 3,32 (m, 1 H), 1,92 - 1,82 (m, 2 H), 1,65 - 1,35 (m, 6 H), 1,23 (s, 3H), 1,11 (s a, 1 H).

30 LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 uM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2,50 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,50 min (ESI) m/z 387 [M - 1].

#### 35 Síntesis 25

##### 4'-Ciano-2'-fluoro-N-((1r,4r)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida (HMC-C-06-A)



40 Una solución en agitación de N-((1r,4r)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencenosulfonamida (1,6 g, 4,05 mmol), 4-bromo-3-fluorobenzonitrilo (2,03 g, 10,1 mmol), carbonato sódico (1,07 g, 10,1 mmol) en dioxano/agua (30/3 ml) se desgasificó usando argón durante 10 min. Se añadió [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,296 g, 0,405 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó durante otros 10 min y se agitó a 110 °C durante 6 h. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice. El residuo obtenido se lavó con hexano seguido de n-pentano para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 1,19 g, 75,79 %.

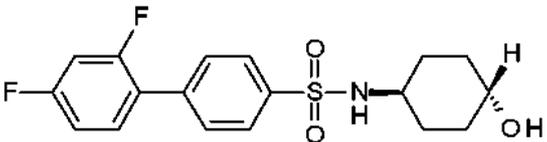
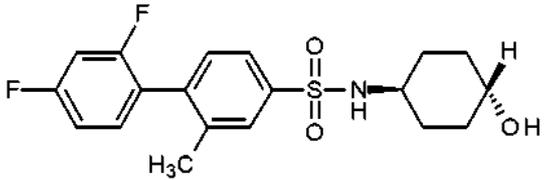
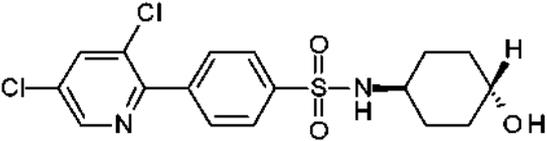
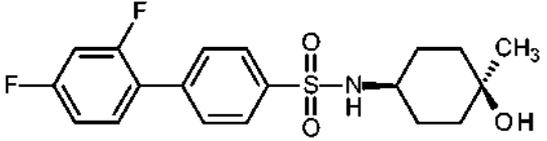
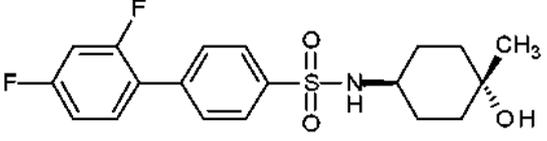
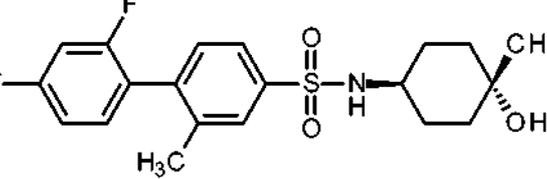
50 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,03 - 7,96 (m, 2 H), 7,73 - 7,66 (m, 2 H), 7,62 - 7,56 (m, 2 H), 7,54 - 7,48 (m, 1 H), 4,51 (d, J = 6,65 Hz, 1 H), 3,42 - 3,30 (m, 1 H), 1,95 - 1,82 (m, 2 H), 1,66 - 1,55 (m, 2 H), 1,53 - 1,37 (m, 4 H), 1,23 (s, 3H), 1,12 (s a, 1 H).

55 LCMS: fase móvil A: formiato amónico 5 mM en agua + 0,1 % de amoniaco, fase móvil B: acetonitrilo + 5 % de fase móvil A + 0,1 % de amoniaco; columna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 uM; caudal: 1,4 ml/min. Tiempo de proceso: 5 min - el disolvente de partida B:A 30:70 se aumenta de forma lineal hasta B:A 95:5 durante los primeros 2,50 min, se mantiene a B:A 95:5 durante 1,5 min, se reduce de forma lineal hasta B:A 30:70 durante 0,5 min y se mantiene a B:A 30:70 durante los 0,5 min finales. Tiempo de retención 2,52 min (ESI) m/z 387 [M - 1].

Compuestos adicionales

Los siguientes compuestos también se prepararon para su uso como compuestos de referencia en los estudios biológicos que se describen en el presente documento:

5

Código	Estructura
ABD599	
ABD735	
ABD836	
ABD899	
ABD900	
REF001	

Estudios biológicos

Se evaluó la potencia usando un ensayo de viabilidad basado en la supervivencia de la línea celular de macrófagos J774. Los macrófagos están estrechamente relacionados con los osteoclastos y se han usado anteriormente como sistema de modelo para la supervivencia de osteoclastos (véase, por ejemplo, Luckman *et al.*, 1998, "Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages", *J. Bone Miner. Res.*, vol. 13, pág. 1668-1678). El modelo es indicativo tanto de los efectos en la protección ósea en enfermedades tales como osteoporosis, osteoartritis y artritis reumatoide, como de los efectos en la inflamación dado que, al igual que los osteoclastos, los macrófagos J774 dependen para la supervivencia de la activación continuada de NFκB.

Se midió la estabilidad metabólica por determinación de la tasa de desaparición del compuesto en presencia de preparaciones microsomales de hígado humano, que se cuantificó mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida y espectrometría de masas convencional (LC-MS/MS).

20

La solubilidad se midió equilibrando el compuesto en fluido intestinal simulado en estado de ayuno (FaSSIF) y se cuantificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Además se caracterizaron los efectos antiinflamatorios por evaluación de la producción de interleuquina-6 (IL-6) mediante macrófagos derivados de Thp-1 humanos estimulados con un lipopolisacárido (LPS) bacteriano de estímulo proinflamatorio. LPS actúa como un receptor de la superficie celular, receptor-4 de tipo Toll que activa las rutas de señalización de NFκB e IRF para producir IL-6. La reducción de IL-6 en este ensayo estimulado es indicativa de efectos antiinflamatorios con utilidad en el tratamiento de afecciones en las que la producción de IL-6 es anómala.

También se llevaron a cabo estudios *in vivo* para evaluar el potencial de estos compuestos como fármacos.

Se evaluó la farmacocinética en ratas y se evaluaron los efectos en la enfermedad en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno.

### Estudio Biológico 1

Ensayo de viabilidad de macrófagos J774 con resazurina

Se determinó la potencia *in vitro* de los compuestos de ensayo por incubación con macrófagos J774 y posterior determinación de la viabilidad celular usando resazurina.

La resazurina es un colorante redox usado habitualmente como indicador de viabilidad de células cultivadas (véase, por ejemplo, Anoopkumar-Dukie, 2005, British Journal of Radiology, vol. 78, pág. 945-947). No es tóxica para las células y es estable en el medio de cultivo, permitiendo una medición continua de la proliferación celular *in vitro* ya sea un ensayo cinético o de punto final. El ensayo se basa en la capacidad de las células viables metabólicamente activas para reducir la resazurina (que es de color azul y no fluorescente) en resorufina y dihidroresorufina (que es de color rojo y fluorescente) usando los electrones de especies reductoras, tales como dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) y dinucleótido de flavina y adenina (FADH). Esta transformación, de forma oxidada a forma reducida, se puede medir colorimétrica o fluorométricamente. Los agravios que perjudican la viabilidad y proliferación celulares también afectan a la capacidad de las células para reducir la resazurina, y la tasa de reducción de colorante es directamente proporcional al número de células viables presentes.

Para medidas de fluorescencia, se usan por lo general longitudes de onda de excitación de 530-560 nm y de emisión de 590 nm. Para medidas colorimétricas, se mide por lo general la absorbancia a 570 nm (forma reducida) y 600 nm (forma oxidada). Se lleva a cabo un cálculo sencillo para determinar las cantidades relativas de las dos especies: una alta proporción de resorufina (forma reducida) con respecto a resazurina (forma oxidada) es un indicador de que las células proliferan y son viables. Una baja proporción indica que las células son quiescentes y no viables.

Se sembraron en placas células J774 a  $10^4$  células por pocillo en 100 µl de αMEM (medio α de Eagle modificado) en placas de 96 pocillos y se permitió que se adhirieran durante una noche. Al día siguiente, se prepararon los compuestos de ensayo en forma de soluciones 100 mM en DMSO. Estas soluciones de trabajo se diluyeron en DMSO y a continuación se diluyeron 1000x en medio de cultivo (αMEM) antes de añadirse directamente a los pocillos de un modo tal que se obtuviera la concentración de compuesto final deseada. Después de 72 horas de incubación a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub>, se añadió resazurina (Alamar Blue, Biosource International) a cada pocillo (1 : 10 v/v, 10 µl). La placa se incubó a continuación a 37 °C durante 3 horas y se midió la fluorescencia a 590 nm con un ancho de banda de 25 nm.

Los resultados medios de cada compuesto de ensayo se expresaron como el porcentaje (%) del valor de control medio que refleja la viabilidad celular. Los valores medios de las concentraciones sometidas a ensayo se representaron a continuación y se calculó el valor de CI<sub>50</sub> por ajuste de los datos de una ecuación de CI<sub>50</sub> de 4 parámetros usando el software de Grafit (Erithacus Software). Cada experimento se repitió dos veces y los datos se representaron como el valor medio de CI<sub>50</sub> de ambos experimentos.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 1 Ensayo de viabilidad de macrófagos J774 con resazurina		
Compuesto	CI <sub>50</sub> (µM) <sup>(1)</sup>	CI <sub>50</sub> (µM) <sup>(2)</sup>
ABD599	0,19	0,41
ABD735	0,10	0,07
ABD836	0,28	1,45

ABD900	0,56	3,64
ABD899	0,08	0,27
REF001	0,12	0,05
HMC-C-01-A	0,13	1,89
HMC-C-02-A	0,26	14,7
HMC-C-03-A	0,14	0,41
HMC-C-04-A		0,50
HMC-C-05-A		2,46
HMC-C-06-A		0,71
HMC-N-01-A	0,13	2,66
HMC-N-02-A	0,18	4,59
HMC-N-03-A	0,17	0,62
HMC-N-04-A	0,18	
HMC-C-01-B		0,16
HMC-C-02-B		1,74
HMC-C-03-B		0,20
HMC-C-04-B		0,06
HMC-N-01-B		0,14
HMC-N-02-B		0,36
HMC-N-03-B		0,08
<p><sup>(1)</sup> Resultados de un ensayo de viabilidad de macrófagos con resazurina llevado a cabo en un intervalo de concentraciones de 6 puntos de 10 <math>\mu</math>M a 10 nM con n = 3 duplicados por concentración. Los datos son la media de numerosos 2 independientes.</p> <p><sup>(2)</sup> Resultados de un ensayo de viabilidad de macrófagos con resazurina llevado a cabo en un intervalo de concentraciones de 12 puntos de 10 <math>\mu</math>M a 0,5 nM con n = 4 duplicados por concentración. Los datos son la media de 3 experimentos independientes.</p>		

Estos datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento, y particularmente HMC-C-01-A y HMC-C-01-B; HMC-C-03-A y HMC-C-03-B; HMC-C-04-A y HMC-C-04-B; HMC-C-06-A; HMC-N-01-B; HMC-N-02-B; y HMC-N-03-B muestran una excelente potencia en el ensayo de viabilidad de macrófagos con resazurina y ninguna pérdida de potencia, en comparación con los compuestos de referencia.

## Estudio Biológico 2

### Estabilidad microsomal hepática humana

La estabilidad metabólica de los compuestos de ensayo se midió por determinación de la tasa de desaparición del compuesto cuando se incubó en presencia de microsomas hepáticos humanos. Los microsomas hepáticos se preparan a partir del retículo endoplasmático de hepatocitos y son la fuente principal de las enzimas más importantes (los citocromos P450) implicados en el metabolismo de fármacos. El estudio de estabilidad de fármacos en presencia de microsomas hepáticos se acepta como un modelo valioso que permite una rápida predicción de la estabilidad del fármaco *in vivo*.

Se obtuvieron microsomas hepáticos humanos de una fuente comercial. Los compuestos de ensayo (1  $\mu$ M) se incubaron en microsomas hepáticos mezclados (masculinos y femeninos). Las muestras se incubaron durante un período de 60 minutos y se retiraron hasta en 6 puntos temporales y se analizaron por LC-MS/MS para la presencia/cantidad de compuestos de ensayo.

Los microsomas (concentración de proteína final de 0,25 o 0,5 mg/ml), tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, y los compuestos de ensayo (concentración final 1  $\mu$ M; diluidos de una solución de trabajo 10 mM para dar una concentración final de DMSO de un 0,1 %) se incubaron a 37 °C antes de la adición de fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH, concentración final 1 mM) para iniciar la reacción. El volumen de incubación final fue de 100  $\mu$ l. Se incluyó una incubación de control para cada compuesto sometido a ensayo, donde se añadió

tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 en lugar de NADPH. En compuesto de control positivo terfenadina se incluyó en cada experimento y todas las de incubaciones se llevaron a cabo una vez para cada compuesto.

5 Cada compuesto se incubó durante 0, 5, 15, 30, 45 o 60 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100  $\mu$ l de acetonitrilo enfriado en hielo que contenía un estándar interno (glipizida 0,001 mM) en los puntos temporales apropiados. Las placas de incubación se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para precipitar la proteína y se analizaron alícuotas de 0,1 ml usando LC-MS/MS, con las condiciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2 Condiciones de LC-MS/MS	
HPLC:	Schimidzu Agilent
MS/MS:	API 4000, API 4000 Q-Trap
Software:	Analyst 1.5
Modo de ionización:	Turbo pulverización, y ionización en modo positivo
Modo de barrido:	Monitorización de reacción múltiple (MRM)
Columna:	Waters, Xterra, MS-C18 (2) 5 $\mu$ m 50 x 3,0 mm
Temperatura de la columna (°C):	40
Fase A:	0,1 % de ácido fórmico en agua
Fase B:	0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo
Inyecciones de estándar (ml):	1, 2, 3, 5, 7, 10
Inyecciones de ensayo (ml):	1, 2, 3, 10, 20, 50
Caudal (ml/min):	0,8-1

10 A partir de un gráfico del logaritmo natural de la proporción del área de pico (es decir, la proporción de área de pico del compuesto : área de pico del estándar interno) frente al tiempo, se determinó el gradiente de la línea. Posteriormente, se calcularon la semivida ( $t_{1/2}$ ) y el aclaramiento intrínseco ( $CL_{int}$ ) usando las siguientes ecuaciones, donde V = volumen de incubación ( $\mu$ l/mg proteína microsomal):

15 Constante de velocidad eliminada (k) = (- Gradiente)

$$\text{Semivida } (t_{1/2}) \text{ (min)} = 0,063 / k$$

20 Aclaramiento intrínseco ( $CL_{int}$ ) ( $\mu$ l/min/millón de células) = (V x 0,693) /  $t_{1/2}$

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 3 Estabilidad microsomal hepática humana		
Compuesto	$T_{1/2}$ (min) <sup>(1)</sup>	$T_{1/2}$ (min) <sup>(2)</sup>
ABD599	287	
ABD735	524	
ABD836	> 900	
ABD899	72	105
ABD900		87
REF001	43	
HMC-C-01-A	82	
HMC-C-02-A	55	

## ES 2 641 758 T3

HMC-C-03-A	84	
HMC-C-04-A		100
HMC-C-05-A		123
HMC-C-06-A		240
HMC-N-01-A	175	
HMC-N-02-A	367	
HMC-N-03-A	258	
HMC-N-04-A	156	
HMC-C-01-B		70
HMC-C-02-B		18
HMC-C-03-B		48
HMC-C-04-B		107
HMC-N-01-B		127
HMC-N-02-B		168
HMC-N-03-B		70

<sup>(1)</sup> Los compuestos se incubaron con microsomas hepáticos humanos con una concentración de proteína final de 0,25 mg/ml con toma de muestras en 5 puntos temporales: 0, 5, 15, 30, y 60 minutos. Se realizó un duplicado por punto temporal.

<sup>(2)</sup> Los compuestos se incubaron con microsomas hepáticos humanos con una concentración de proteína final de 0,5 mg/ml con toma de muestras en 6 puntos temporales: 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se realizaron dos duplicados por punto temporal.

Los datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran una estabilidad metabólica equivalente a la de los compuestos de referencia.

### 5 Estudio Biológico 3

#### Solubilidad acuosa

10 La solubilidad acuosa se midió por equilibrio de los compuestos con fluido intestinal simulado en estado de ayuno (FaSSIF) y se cuantificó espectrofotométricamente.

FaSSIF se preparó como se describe a continuación:

15 Preparación de FaSSIF blanco: se disolvieron 0,21 g de microgránulos de hidróxido sódico (NaOH), 1,97 g de dihidrógeno fosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 3,09 g de cloruro sódico (NaCl) en 400 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 6,5 usando ácido clorhídrico 1 M y se añadió agua desionizada adición hasta un volumen final de 500 ml.

20 Preparación de FaSSIF: se disolvieron 0,056 g de SIF en polvo (que contenía taurocolato sódico y lecitina) (Phares AG) en 25 ml de FaSSIF blanco y se agitó hasta que se disolvió completamente el polvo. La solución se dejó en reposo durante 2 horas durante las que se volvió opalescente; se usó en 24 horas. La composición final de la solución se caracterizó como sigue a continuación:

25 Taurocolato sódico: 3 mM  
Lecitina: 0,75 mM  
Osmolaridad:  $270 \pm 10$  mOsmol  
pH: 6,5

30 La solubilidad acuosa se determinó fijando una concentración conocida del compuesto de ensayo (disuelto en DMSO) en FaSSIF seguido de incubación durante 16 horas. La densidad óptica se midió al final del periodo de incubación para los compuestos de ensayo y una referencia usada para determinar la solubilidad. En resumen, se prepararon dos muestras para cada determinación: una muestra de referencia que consistió en una solución de trabajo del compuesto de ensayo en DMSO diluida en la solución del sistema (un tampón de baja absorción exento de fosfato) y propanol; y una muestra de ensayo (preparada por triplicado) que consistió en 0,5 ml de FaSSIF fijado con compuesto de ensayo a 0,2 mM. Cada muestra se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas con

35

## ES 2 641 758 T3

agitación constante a 250 rpm. Al final del periodo de incubación, se filtraron 0,3 ml de cada muestra a través de una placa de filtro pION (PION, Woburn MA), se diluyó 1:1 con propanol y se realizó un barrido usando espectrofotometría con  $\lambda_{\max}$  (190-400 nM) usando un equipo Spectra Max Plus - Versión 2.1000 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), con el software de determinación de solubilidad mSOL Explorer (pION, Woburn, MA).

5

La solubilidad de FaSSIF se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Solubilidad de FaSSIF, } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{\left[ \frac{150}{75} \right] * \left[ \frac{\text{DO de la muestra}}{\text{DO de la referencia}} \right] * \text{Cr} * \text{peso molecular}}{10^6}$$

en la que:

10

"DO" es la densidad óptica;

"Cr" es la concentración de la referencia (33,4 mM); y

"peso molecular" es para el compuesto de ensayo (por ejemplo, 381,44 para ABD735).

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

15

Tabla 4 Solubilidad de FaSSIF		
Compuesto	Solubilidad (mg/ml) <sup>(1)</sup>	Solubilidad (mg/ml) <sup>(2)</sup>
ABD599	0,03	
ABD735	0,02	
ABD836	0,03	
ABD899	0,06	0,13
ABD900		0,12
REF001	0,05	
HMC-C-01-A	0,06	
HMC-C-02-A	0,04	
HMC-C-03-A	0,03	
HMC-C-04-A		0,08
HMC-C-05-A		0,19
HMC-C-06-A		0,11
HMC-N-01-A	0,03	
HMC-N-02-A	0,02	
HMC-N-03-A	> 0,08	
HMC-N-04-A	0,06	
HMC-C-01-B		0,08
HMC-C-02-B		0,07
HMC-C-03-B		0,15
HMC-C-04-B		0,13
HMC-N-01-B		0,12
HMC-N-02-B		0,12
HMC-N-03-B		0,10

<sup>(1)</sup> Se procesaron tres duplicados por el estudio a pH 6,5.  
<sup>(2)</sup> Se procesaron dos duplicados por estudio a pH 6,8.

Los datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran una solubilidad equivalente a la de los compuestos de referencia.

#### Estudio Biológico 4

##### 5 Ensayo de liberación de IL-6 de macrófagos Thp1

La potencia *in vitro* de los compuestos de ensayo en células humanas se determinó por incubación con macrófagos Thp1 y posterior estimulación con un estímulo inflamatorio (lipopolisacárido (LPS) bacteriano) seguido de medición de liberación de interleuquina-6 (IL-6) celular.

El ensayo es fuertemente indicativo de los efectos en la inflamación. LPS es un ligando para el receptor 4 de tipo Toll (TLR4), que es un miembro de la familia de receptores de tipo Toll de los receptores de la superficie celular. Este receptor es importante en la activación del sistema inmune innato, las funciones principales del cual son:

- 15 (a) reclutar células inmunes en los sitios de infección a través de la producción de citoquinas tales como IL-6;
- (b) activar la cascada del complemento, para identificar bacterias, células activadas y eliminar tanto células muertas como complejos de anticuerpo;
- 20 (c) activar la retirada de sustancias extrañas mediante células tales como macrófagos y células dendríticas; y
- (d) activar la presentación de antígeno, parte del sistema inmune adaptativo.

TLR4 ejerce sus efectos por activación de una cascada de señalización que da como resultado la activación de diversos factores de transcripción que incluyen NFκB y los miembros 3, 5, y 7 de la familia del factor de transcripción regulador de interferón (IRF) (IRF-3, IRF-5, y IRF-7). La activación de estos factores de transcripción, y particularmente NFκB y IRF-5 impulsa la síntesis y la secreción de citoquinas tales como interleuquina 6 (IL-6).

La sobreproducción/expresión de IL-6 está asociada a diversos trastornos, que incluyen autoinmunidad, inflamación y cáncer. IL-6 se sintetiza principalmente mediante los macrófagos y los linfocitos T y está implicada en gran medida en gobernar la transición de inflamación aguda o crónica. Hace esto modificando la composición del infiltrado de células sanguíneas blancas en el espacio inflamatorio, trasladándolo de neutrófilos a monocitos/macrófagos (véase, por ejemplo, Gabay, 2006). Además, IL-6 ejerce efectos estimuladores en los linfocitos T y B (favoreciendo de ese modo las respuestas inflamatorias crónicas) así como en osteoclastos (estimulando de ese modo la renovación de los huesos). Estos efectos están implicados en la patología de diversas enfermedades que incluyen osteoporosis, artritis reumatoide, diabetes, aterosclerosis, depresión, enfermedad de Alzheimer, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Behçet, mieloma múltiple, y cáncer de próstata. Además, los pacientes con cáncer avanzado o metastásico tienen niveles en circulación de IL-6 mayores de lo normal. La disminución de los niveles de IL-6 en macrófagos es por lo tanto terapéuticamente beneficiosa.

Se sembraron en placas células Thp1 con una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo o  $1,7 \times 10^5$  células/pocillo en 500 µl o 150 µl de medio completo RPMI que contenía un 1 % de penicilina-estreptomicina y un 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente en placas de 24 pocillos o placas de 96 pocillos, respectivamente y se dejó que se adhirieran durante la noche. Al día siguiente, las células se estimularon con ácido forbol mirístico (PMA) a una concentración final de 100 nM (placas de 24 pocillos) o 200 nM (placas de 96 pocillos) para inducir la diferenciación y se mantuvieron hasta 8 días con un cambio de medio a los 5 días si las células se cultivaron hasta 8 días. Los compuestos de ensayo se prepararon como soluciones 100 nM en DMSO y a continuación se diluyeron en serie en DMSO antes de la dilución en el medio de cultivo.

Los compuestos diluidos se añadieron a los cultivos 1 hora antes de la estimulación con 100 ng/ml de LPS. Después de una incubación de 16 o 18 horas a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo celular se recogió y se sometió a ensayo para los niveles de IL-6 humana usando el kit de ELISA duo-set de IL-6 humana (R&D Systems). Los resultados medios para cada compuesto de ensayo (n = 3) se expresaron como el porcentaje (%) del valor medio de control. Los valores medios de las concentraciones sometidas a ensayo se representaron a continuación y se calculó el valor de CI<sub>50</sub> para la inhibición de IL-6 por ajuste de los datos a una ecuación de CI<sub>50</sub> de 4 parámetros usando el software de Grafit versión 6.0.12 (Erithacus Software Ltd., de Dr. Robin Leatherbarrow) o GraphPad Prism versión 5.04 para Windows (GraphPad Software La Jolla, California, USA, www.graphpad.com). Cada experimento se repitió dos veces y los datos se presentan como el valor medio de CI<sub>50</sub> de ambos experimentos.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 5		
Datos de ensayo de liberación de IL-6 de macrófagos		
Compuesto	CI <sub>50</sub> (mM) <sup>(1)</sup>	CI <sub>50</sub> (mM) <sup>(2)</sup>
ABD599		0,07

ABD899		0,03
ABD900		0,09
HMC-C-01-A	0,04	0,18
HMC-C-02-A	0,001	0,97
HMC-C-03-A	0,004	0,05
HMC-C-04-A		0,13
HMC-C-05-A		1,02
HMC-C-06-A		0,19
HMC-N-01-A	0,13	0,28
HMC-N-02-A	0,15	0,29
HMC-N-03-A	0,05	
HMC-C-01-B		0,06
HMC-C-02-B		0,29
HMC-C-03-B		0,02
HMC-C-04-B		0,03
HMC-N-01-B		0,03
HMC-N-02-B		0,02
HMC-N-03-B		0,02

<sup>(1)</sup> Se sembraron en placas células Thp1 a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en 500  $\mu$ l de medio completo RPMI que contenía un 1 % de penicilina-estreptomina y un 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente en placas de 24 pocillos durante 8 días con un cambio de medio a los 5 días. Los compuestos se sometieron a ensayo por triplicado en una curva de respuesta de concentración de 6 puntos a concentraciones de 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0,0001  $\mu$ M, midiendo los niveles de IL-6 16 horas después de la estimulación con LPS. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon usando Grafit versión 6.0.12 (Erihtacus Software).

<sup>(1)</sup> Se sembraron en placas células Thp1 a una concentración de  $1,7 \times 10^5$  células/pocillo en 150  $\mu$ l de medio completo RPMI que contenía un 1 % de penicilina-estreptomina y un 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente en placas de 96 pocillos durante 3 días. Los compuestos se sometieron a ensayo por triplicado en una curva de respuesta de concentración de 9 puntos a concentraciones de 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 y 0,001  $\mu$ M, midiendo los niveles de IL-6 18 horas después de la estimulación con LPS. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon usando GraphPad Prism versión 5.04 para Windows (GraphPad Software).

Estos datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran una excelente potencia en la inhibición de la liberación de IL-6 de macrófagos humanos, indicando su utilidad en el tratamiento de trastornos en los que se regula positivamente IL-6. Los compuestos HMC-C-01-A, HMC-C-03-A, HMC-C-06-A, HMC-C-01-B, HMC-C-03-B, HMC-C-04-B, HMC-N-01-B, HMC-N-02-B y HMC-N-03-B muestran una actividad particularmente buena en la reducción de la liberación de IL-6.

#### Estudio Biológico 5

#### 10 Estudios farmacocinéticos en roedores

Se estudiaron la absorción y la estabilidad metabólica usando un ensayo de farmacocinética *in vivo*.

15 Se dosificaron tres ratas macho Sprague-Dawley, de 8-12 semanas de edad, con compuestos de ensayo administrados por vía oral o intravenosa (nivel de dosis de 1 mg/kg de peso corporal por vía intravenosa o 5 mg/kg de peso corporal por vía oral). Los compuestos de ensayo se formularon en un 0,5 % de carboximetilcelulosa (CMC)/0,1 % de Tween-80 para administración a través de la ruta oral, o en un 5 % de DMSO/10 % de solutol en solución salina para la administración a través de la ruta intravenosa. Para el compuesto HMC-C-01-A la administración oral se formuló en un 2 % de dimetilacetamida/20 % de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en agua. Se dio a los animales acceso libre a alimento durante todo el estudio excepto ayuno durante una noche y hasta 2 horas después de la dosis en el día de dosificación.

20 Se extrajeron muestras de sangre del plexo retroorbital en los siguientes puntos temporales y se colocaron en microtubos que contenían una solución de  $K_2EDTA$  al 20 %:

## ES 2 641 758 T3

Dosificación oral: dosis previa; 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 horas posterior a la dosis.

Dosificación intravenosa: dosis previa; 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, y 24 horas posterior a la dosis.

5 Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener plasma, que se transfirió a un recipiente separado y se congeló a -20 °C.

10 Para el análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante precipitación de proteínas con acetonitrilo fijado con estándar interno (500 ng/ml de glipizida) en una proporción 1:4 con plasma. A continuación, las muestras se agitaron vorticialmente durante 5 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 20.600 x g a 4 °C. Se recogieron 100 µl del sobrenadante para el análisis. Las muestras de estándares se prepararon de forma similar, después de fijación de muestras de plasma de rata de blanco con 10 µl de analito.

15 La concentración del compuesto de ensayo en las muestras de plasma de rata se determinó usando LC-MS/MS, con las condiciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6 Condiciones de LC-MS/MS	
HPLC:	Schimidzu Agilent
MS/MS:	API 4000
Software:	Analyst 1.5
Modo de ionización:	Turbo pulverización, modo negativo
Modo de barrido:	Monitorización de reacción múltiple (MRM)
Columna	Waters, Xterra, MS-C18 (2) 5 µm 50 x 3,0 mm; Discovery Grace Smart RP183µ, 150 x 2,1,3 µM; Waters Symmetry Shelf C18 75 x 4,6, 3,5 µM; Agilent Zorbax XDB, 150 x 4,6, 5 µM
Temperatura de la columna (°C):	40
Fase A:	Acetonitrilo
Fase B:	0,1 % de ácido fórmico
Caudal (ml/min):	0,8-1,2

20 Los parámetros farmacocinéticos para los compuestos de ensayo se calcularon mediante Phoenix WinNonlin versión 6.3 (Pharsight Corp, CA) usando métodos no compartimentados convencionales. Las concentraciones de plasma de pico ( $C_{max}$ ) y el tiempo de la concentración de plasma de pico ( $T_{max}$ ) fueron los valores observados. El área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo (AUC) se determinó mediante el uso de una regla trapezoidal lineal hasta la última concentración medible ( $AUC_{last}$ ) y después de esto por extrapolación de la fase de eliminación terminal al infinito ( $AUC_{inf}$ ). La constante de velocidad de eliminación terminal ( $k_{el}$ ) se determinó mediante análisis de regresión de la parte terminal lineal de la curva de log concentración de plasma-tiempo. La semivida de fase de eliminación ( $t_{1/2}$ ) se calculó como  $0,693 / k_{el}$ . La biodisponibilidad oral provisional (F) se calculó dividiendo la AUC (0-24 horas) después de administración oral entre la AUC ajustada (0-8 horas) después de administración intravenosa (es decir,  $F = AUC(p.o.) \times Dosis (i.v.) / AUC(i.v.) \times Dosis (p.o.)$ ) y se informa como un porcentaje (%).

Los datos de farmacocinética se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 7 Datos de farmacocinética				
Compuesto	Biodisponibilidad, F (%)	AUC i.v. (ng/ml/min)	AUC p.o. (ng/ml/min)	$T_{1/2}$ (h)
ABD735	83	1081	8965 ‡	3,8
ABD836	55	2142	5927	5,3
ABD899	50	2133	10740 ‡	10,8
REF001	50	963	4766 ‡	7,2
HMC-C-01-A	89	900	4002	6,2
HMC-C-02-A	39	546	1069	3,2

HMC-C-03-A	55	1427	3910	2,4
HMC-N-01-A	64	740	1408	13,4
HMC-N-02-A	43	3053 †	3303	6,3
HMC-N-03-A	8	5102 †	962	3,1
HMC-N-04-A	66	1279	4203	2,9
HMC-C-01-B	67	1539	5121	5,7
HMC-C-03-B	116	816 *	9432	8,3
HMN-C-04-B	59	1589 *	9360	5,5
HMC-N-01-B	60	2824	8454	9,1
HMC-N-02-B	66	1931	6412	6,0
HMC-N-03-B	84	1380*	11609	7,4
† Dosificado a 2 mg/kg por vía intravenosa. * Dosificado a 0,5 mg/kg por vía intravenosa. ‡ Dosificado a 10 mg/kg por vía oral.				

Estos datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento tienen unas excelentes propiedades farmacocinéticas orales equivalentes a las de los compuestos de referencia. Esto los hace adecuados para su uso como fármacos orales.

5

#### Estudio Biológico 6

Artritis inducida por colágeno en ratón

- 10 Se usaron ratones DBA/1j macho de siete a ocho semanas de edad para todos los procedimientos. Los animales se alojaron en grupos de 10, y se mantuvieron a 21 °C ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con alimento y agua a voluntad. Se preparó adyuvante de Freund completo (CFA) por emulsión de colágeno bovino de tipo II a 4 mg/ml con una suspensión de 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en adyuvante de Freund incompleto (IFA) (0,85 ml de aceite de parafina y 0,15 ml de monooleato de manida) en una proporción 1:1 (v/v). Todos los
- 15 ratones se inmunizaron por vía subcutánea con 200 µg de colágeno bovino de tipo II en CFA. 21 días después, todos los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en IFA.

Los ratones comenzaron a desarrollar signos y síntomas de artritis después de la inmunización de "refuerzo".

- 20 Para la evaluación macroscópica de la artritis, se monitorizaron los siguientes signos en cada pata de cada ratón tres veces por semana y se resumieron para generar el índice artrítico (IA) (el IA máximo para un animal es 16):

- 0 = sin ningún efecto visible de artritis.  
 1 = edema y/o eritema de un dedo.  
 25 2 = edema y/o eritema de dos dedos.  
 3 = edema y/o eritema de más de dos dedos.  
 4 = artritis grave en todas las patas y dedos.

- 30 Los animales se clasificaron en grupos de tratamiento con un índice artrítico medio de 2,5 y a continuación se dosificaron una vez al día durante 14 días con compuesto mediante sonda gástrica oral para los compuestos de ensayo, o mediante inyección subcutánea a una dosis de 10 mg/kg para el control positivo, etanorcept. Después de la finalización del experimento, los ratones se sacrificaron.

- 35 Los datos se analizaron generando una media del índice artrítico en cada grupo de tratamiento. El índice artrítico medio se comparó a continuación con el índice artrítico de los animales de control (sin tratar) usando la siguiente fórmula para generar un porcentaje de inhibición de la enfermedad.

$$\% \text{ de inhibición de enfermedad} = 100 - \left[ \frac{\text{índice artrítico medio: animales tratados}}{\text{índice artrítico medio: animales sin tratar}} * 100 \right]$$

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 8 Inhibición de artritis		
Compuesto	Dosis (mg / kg / día)	% de inhibición de enfermedad
ABD735	10	44
ABD899	10	77
HMC-C-01-A	10	40
HMC-C-01-A	3	60
HMC-C-01-A	1	50
HMC-C-01-A	0,3	60
HMC-N-01-A	10	45
HMC-C-02-A	10	61
HMC-N-02-A	10	36
HMC-C-01-B	10	26
HMC-N-01-B	10 → 1 (*)	38
(*) Reducido de 10 a 1 mg/kg/día debido a la mortalidad.		

Los datos para algunos de los compuestos también se ilustran en las Figuras 1 y 2.

5 La Figura 1 muestra seis gráficos, cada uno del índice artrítico medio en función del tiempo (día de dosificación) para compuesto de ensayo dosificado a 10 mg/kg/día mediante sonda gástrica oral (círculos abiertos) y control (círculos sólidos), para cada uno de: (A) HMC-C-02-A (superior izquierdo), (B) HMC-C-01-A (superior medio), (C) HMC-N-02-A (superior derecho), (D) HMC-N-01-A (inferior izquierdo), (E) HMC-C-01-B (inferior medio), (F) HMC-N-01-B (inferior derecho).

10 La Figura 2 muestra dos gráficos, cada uno del índice artrítico en función del tiempo (día de dosificación) para compuesto de ensayo (círculos abiertos, cuadrados abiertos), control (círculos sólidos) y control positivo, el fármaco comercializado etanorcept (triángulos), para cada uno de (A) ABD899 a 10 mg/kg/día (izquierda), (B) HMC-C-01-A a 0,3 mg/kg/día y 3 mg/kg/día (derecha).

15 Estos datos indican que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran una excelente actividad oral *in vivo* en la prevención del progreso de artritis grave establecida.

20 Además, los datos muestran la actividad excepcional del compuesto HMC-C-01-A, que muestra una mayor eficacia que el tratamiento comercializado, etanorcept, a bajas dosis. Esta actividad es particularmente sorprendente dado que HMC-C-01-A no es el compuesto más activo en el Estudio Biológico 1 o el Estudio Biológico 4. Además, la actividad de HMC-C-01-A es mayor que la del compuesto estrechamente relacionado, HMC-C-01-B, que es más activo que HMC-C-01-A en los Estudios Biológicos 1 y 4, mostrando que se demuestra que la identificación de los compuestos con eficacia superior ni es trivial ni es predecible.

## 25 Estudio Biológico 7

### Dosis máxima tolerada

30 Se evaluó la seguridad aguda de los compuestos en ratas con el fin de permitir la determinación de la dosis máxima tolerada (MTD), una indicación de la seguridad del compuesto en animales. Cuanto mayor es MTD, mayor es la seguridad potencial del compuesto que se somete ensayo.

35 Se dosificaron dos ratas macho y dos ratas hembra Sprague-Dawley, de 8-12 semanas de edad, con cada nivel de dosis en un diseño de estudio de dosis ascendente. Los compuestos de ensayo se administraron por vía oral en forma de una suspensión formulada en un 0,5 % de carboximetilcelulosa (CMC)/0,1 % de Tween-80 en un volumen de dosis de 10 ml/kg. Se dio a los animales acceso libre a alimento a lo largo del estudio.

40 Los animales se observaron en al menos dos ocasiones durante la primera hora después de la dosificación, con una separación aproximada de 30 minutos, y después de eso a intervalos cada hora durante el resto del día de dosificación durante al menos 4 horas. En los días posteriores, los animales se observaron al menos una vez por la mañana y una vez hacia el final del día. Se registraron en cada observación la naturaleza y la gravedad, cuando

fuera apropiado, de los signos clínicos y el tiempo. Las observaciones incluyeron cambios en la piel, pelaje, ojos, y membranas mucosas, y también en el sistema respiratorio, circulatorio, autónomo, y nervioso central, así como la actividad somatomotora y el patrón de comportamiento. Se prestó una atención particular a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño, y coma.

5 Con la finalización del estudio, los resultados se expresaron como la dosis máxima tolerada para cada compuesto, siendo esta la mayor de cada una sin toxicidad inaceptable.

10 La dosis máxima sin efectos secundarios inaceptables se determinó que era la MTD (expresada en mg/kg).

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 9 Dosis máxima tolerada		
Compuesto	Dosis máxima tolerada (mg/kg)	
	Hembras	Machos
ABD735	20	10
ABD899	30	30
REF001	7,5	10
HMC-C-03-A	30	30
HMC-N-03-A	50	50
HMC-C-01-A <sup>(1)</sup>	70	70
HMC-C-01-A <sup>(2)</sup>	> 500	> 500
HMC-N-01-A	80	80
HMC-C-02-A	> 200	> 200
HMC-N-02-A	> 200	> 200

<sup>(1)</sup> Dosificada a ratas Sprague Dawley como se describe.  
<sup>(2)</sup> Dosificada a ratas Han Wistar.

15 Estos datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran *un gran aumento* de seguridad en comparación con los compuestos de referencia ABD735, ABD899 y REF001.

20 Los datos también demuestran que la mejora de la seguridad aguda ni es trivial ni es predecible y que los patrones de sustitución similares, por ejemplo los que se encuentran en REF001 pueden conducir a una disminución en la seguridad aguda. Además, los datos muestran la seguridad excepcional de los compuestos HMC-C-01-A, HMC-C-02-A, HMC-N-01-A, y HMC-N-02-A, y particularmente de HMC-C-01-A.

25 Los aumentos en la dosis máxima tolerada observados en los compuestos HMC que se describen en el presente documento proporcionan un aumento del margen de seguridad en comparación con los compuestos de referencia y recalcan el potencial de los compuestos HMC como fármacos orales.

### Estudio Biológico 8

#### Ensayo de citotoxicidad y genotoxicidad GreenScreen HC

30 GreenScreen HC es un ensayo basado en células de mamífero que mide la genotoxicidad y citotoxicidad de compuestos y mezclas químicos.

35 El término genotóxico se usa para describir sustancias que son capaces de causar daños al material genético (ADN) dentro de una célula, que pueden tener finalmente efectos mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos en seres humanos.

40 El ensayo GreenScreen informa del estrés genotóxico como el aumento de la fluorescencia de un derivado modificado genéticamente de la línea celular linfoblastoide humana TK6 p53 competente. En las células modificadas, las secuencias reguladoras de ADN que estimulan la transcripción del gen *GADD45a* controlan la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP). *GADD45a* tiene un papel fundamental en la integridad genómica, y el estrés genotóxico induce su transcripción. La exposición a un compuesto genotóxico aumenta por lo tanto la expresión de

GFP, que se observa como un aumento de fluorescencia y que se monitoriza mediante detección fluorescente usando un lector de placas o un citómetro de flujo. En el ensayo GreenScreen HC la fluorescencia se normaliza en la medición de absorbancia óptica para corregir la variación en el rendimiento celular causada por la pérdida de viabilidad celular o citotoxicidad. El umbral definido estadísticamente para un resultado positivo en el ensayo GreenScreen HC es 1,5, es decir, un 50 % de inducción sobre y por encima de la línea basal para el control tratado con vehículo.

La citotoxicidad se mide en el ensayo GreenScreen junto con la genotoxicidad y los resultados de la evaluación de la citotoxicidad se usan para normalizar las mediciones de la genotoxicidad como se ha descrito anteriormente.

En el ensayo GreenScreen HC, la viabilidad celular se evalúa usando un ensayo de captación de yoduro de propidio. El yoduro de propidio es un agente intercalante y una molécula fluorescente que se puede usar para teñir células. Se usa habitualmente para evaluar cuantitativamente el contenido de ADN para evaluar la viabilidad celular o el contenido de ADN en el análisis de ciclo celular y se puede usar para diferenciar células necróticas, apoptóticas y normales (véase, por ejemplo, Dengler *et al.*, 1995, *Anticancer Drugs*, vol. 6, No. 4, pág. 522-532). La exposición a un compuesto citotóxico aumenta la captación de yoduro de propidio, que se monitoriza mediante absorbancia óptica y es proporcional a la proliferación celular. Los compuestos citotóxicos son los que muestran una disminución observada en la supervivencia relativa de población por debajo de un umbral de significación establecido en un 90 % en comparación con el control tratado con vehículo, para una o más concentraciones de ensayo.

Se genera una serie de diluciones de cada compuesto de ensayo en paralelo en una microplaca de color negro de 96 pocillos con una base ópticamente transparente. Se añade un compuesto genotóxico estándar (metanosulfonato de metilo, MMS) como comprobación de control de calidad intraplaca. Las placas se analizan en puntos temporales de 24 horas y 48 horas usando un lector de microplacas, que proporciona mediciones de absorbancia de luz y fluorescencia para las células y las soluciones en los pocillos de las microplacas.

Además de las mediciones de viabilidad celular y genotoxicidad que se han descrito anteriormente, el ensayo GreenScreen incorpora una evaluación de los efectos de la activación metabólica en el ensayo, el "ensayo GreenScreen HC S9". Para conseguir esto, las células se incuban tanto en presencia como en ausencia de extracto hepático de sobrenadante postmitocondrial (conocido como "S9"). S9 se usa de forma rutinaria en toxicología genética para complementar los ensayos celulares con el metabolismo en fase I de mamífero. Para evaluar la activación metabólica, los compuestos se incuban con la cepa TK6 en presencia de una mezcla de fracción de S9 de un 1 % v/v durante 3 horas con un tiempo de recuperación posterior de 45 horas. Después del periodo de recuperación, se miden la señal de fluorescencia de GFP y la viabilidad celular (evaluada mediante captación de yoduro de propidio) usando un citómetro de flujo. Se usa ciclofosfamida, un control usado habitualmente en estudios de genotoxicidad que utilizan activación metabólica, como el control positivo del ensayo. En el ensayo GreenScreen HC S9, la genotoxicidad se evalúa por inducción en la expresión de GFP cuantificada usando la fluorescencia media de la muestra y la citotoxicidad usando el ensayo de captación de yoduro de propidio que se ha descrito anteriormente. El umbral definido estadísticamente para un resultado de genotoxicidad positivo es de 1,3, es decir un 30 % de inducción sobre y por encima de la línea basal para el control tratado con vehículo y el resultado se informa como positivo o negativo. Los compuestos citotóxicos son los que muestran una disminución observada de la supervivencia relativa de población por debajo de un umbral de significación establecido en un 90 % en comparación con el control tratado con vehículo, para una o más concentraciones de ensayo.

Se obtuvieron líneas celulares de indicador transfectado de forma estable a partir de la línea celular TK6 linfoblastoide humana p53 competente. La línea celular indicadora porta un plásmido episomalmente replicante que porta la región promotora corriente arriba y otras secuencias reguladoras del gen humano GADD45a unidas a un gen de proteína fluorescente verde (GFP) optimizado humano. La línea celular de control porta un plásmido idéntico excepto por la retirada de 4 pares de bases al comienzo del gen EGFP, de un modo tal que no se produce GFP. Ambos plásmidos también portan un gen que confiere resistencia a higromicina B a la línea celular, lo que permite una selección continuada de la presencia del plásmido (200 mg/ml de higromicina B; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Ambas líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con GlutaMAX™ y ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico 25 mM (Invitrogen Corporation) complementado con un 10 % (v/v) de suero de caballo donante inactivado térmicamente (Lonza Wokingham Ltd, Wokingham, UK), piruvato sódico 10 mM (Invitrogen Corporation) y 5000 U/ml de penicilina G sódica con 5000 mg/ml de sulfato de estreptomina (Invitrogen Corporation)) a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada.

Cada placa de ensayo se prepara para evaluar cada uno de los compuestos de ensayo en nueve diluciones seriadas 2 veces, conteniendo tanto la cepa de indicador como la línea celular de control las mismas modificaciones genéticas que la cepa de ensayo, pero no produciendo GFP a causa de un pequeño cambio en la secuencia al comienzo del gen GFP insertado. Se llevaron a cabo exposiciones de cuarenta y ocho horas en microplacas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano, ópticamente transparente, de paredes de color negro, estériles. Se incluyeron pocillos con duplicados de concentraciones tanto "alta" (50 µg/ml) como "baja" (10 µg/ml) de metanosulfonato de metilo como controles positivos intraplaca para proporcionar la aceptación de datos. Otros pocillos de control incluyeron células tratadas con vehículo (1 % v/v de DMSO) como control negativo, medio de ensayo solo para comprobar la contaminación, y compuesto de ensayo con medio de ensayo para determinar

cualquier fluorescencia inherente y/o absorbancia óptica debida a color o precipitación.

Se aplicaron membranas transpirables (BreathEasy, Diversified Biotech, USA) a las microplacas antes de su agitación vigorosa (20 segundos). Esto fue seguido por una incubación estática durante 48 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Después de 48 horas, las microplacas se agitaron vigorosamente durante 10 segundos para resuspender las células antes de la adquisición de datos espectrofotométricos. Los datos de fluorescencia se normalizaron con respecto a los datos de absorbancia para dar un valor de "luminosidad" con respecto al promedio de los controles tratados con vehículo y se representaron frente a la concentración del compuesto. Un aumento de luminosidad de un 50 % se clasificó como un resultado positivo para genotoxicidad: esto refleja un aumento de más de tres veces la desviación típica de los datos de fluorescencia de las células tratadas con vehículo y las células no tratadas con genotoxina. Los datos de absorbancia se normalizaron con respecto al control tratado con vehículo y se representaron como citotoxicidad. Una citotoxicidad de un 90 % refleja una caída estadísticamente significativa en el rendimiento celular y se registra como un efecto tóxico inhibidor del crecimiento.

Los datos sin procesar recogidos de las microplacas de ensayo GreenScreen HC, usando la microplaca se analizaron automáticamente usando la plantilla de software de GreenScreen HC para producir un resumen de resultados de los siguientes parámetros: concentraciones eficaces más bajas (LEC) que causan resultados positivos en el ensayo de exclusión de yoduro de propidio (es decir, pérdida de viabilidad celular) a 24 horas y 48 horas en presencia y ausencia de fracción S9; efectos negativos o positivos en la genotoxicidad.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Compuesto	Citotoxicidad, LEC (mM)			Genotoxicidad
	24 h	48 h, -S9	48 h, +S9	
ABD735	0,31	0,31	5	Negativa
ABD836	0,04	0,01	40	Positiva
ABD899 (1)	< 0,001	< 0,001	0,32	Positiva
ABD899 (2)	0,64	0,08	81,9	Negativa
ABD900	0,29	0,07	74,1	Negativa
REF001	0,039	0,039	0,63	Positiva
HMC-C-01-A	0,47	0,12	60	Negativa
HMC-C-02-A	> 1000	60	120	Negativa
HMC-C-03-A	0,24	0,06	15	Negativa
HMC-N-01-A	0,94	0,12	60	Negativa
HMC-N-02-A	0,94	0,47	120	Negativa
HMC-N-03-A	0,94	0,24	30	Negativa
HMC-N-04-A	0,47	0,12	30	Negativa
HMC-C-01-B	0,08	0,005	4,82	Negativa
HMC-C-03-B	0,17	0,08	10,8	Positiva
HMC-N-01-B	0,01	0,05	5,85	Negativa
HMC-N-02-B	0,04	0,01	10,2	Negativa

(1) Se sometió a ensayo un lote a escala de laboratorio en el intervalo de 1,3 µM a 0,3 pM.  
(2) Se sometió a ensayo un lote a escala media en el intervalo de 164 µM a 0,003 µM.

Estos datos indican que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran una citotoxicidad y genotoxicidad aumentadas o al menos similares que los compuestos de referencia y, en particular, son significativamente mejores que ABD836 y REF001.

Los datos también demuestran que los cambios requeridos para mejorar el perfil de citotoxicidad o genotoxicidad no son ni triviales ni predecibles. Esto destaca particularmente en los perfiles de los compuestos estrechamente relacionados ABD836 y HMC-N-02-A.

Además, los datos muestran la seguridad excepcional con respecto a la citotoxicidad general de los compuestos HMC-C-02-A, HMC-C-01-A, HMC-N-02-A, y HMC-N-01-A.

Estudio Biológico 9

5 Ensayo de canal iónico hERG

10 La inhibición del canal iónico del gen relacionado con éter-a-go-go (hERG) media la repolarización de la corriente IKr en el potencial de acción cardiaco, indicando de ese modo que contribuye a la actividad eléctrica que coordina el latido del corazón. Cuando la capacidad de hERG para conducir la corriente eléctrica a través de la membrana celular se inhibe o queda comprometida puede dar como resultado un trastorno potencialmente fatal denominado síndrome de QT largo. Esta asociación entre hERG y el síndrome de QT largo ha hecho de la inhibición de hERG una importante antídiana que se debe evitar durante el desarrollo de fármacos.

15 Se sometió a ensayo la actividad de los compuestos frente al canal iónico hERG. El ensayo se llevó a cabo usando el método automatizado de parche Q, ruta pinzada usando células de ovario de hámster chino transfectadas de forma estable (hERG-CHO). Las células hERG-CHO se cultivaron en medio de mezcla de nutrientes de Kaighn F-12 (Invitrogen) + un 10 % de FBS a 37 °C durante 1-3 días. Las células se mantuvieron a 30 °C durante 24 a 48 horas antes de pinzar el parche con el fin de aumentar la amplitud de la corriente de hERG. Posteriormente, las células se recogieron mediante tripsinización, y se mantuvieron en medio exento de suero (SFM) en el estado de preparación de las células de parche Q durante hasta 6 horas a temperatura ambiente antes de lavarse y resuspenderse en solución extracelular y aplicarse a los sitios de la pinza de parche para el registro de datos.

25 Protocolo de tensión de pinza de parche: después de que se consiguiera la configuración celular completa, la célula se mantuvo a -80 mV. Se suministró un pulso de 50 milisegundos a -40 mV para medir la corriente de pérdida, que se restó de la corriente de cola en línea. A continuación la célula se despolarizó a +20 mV durante 2 segundos, seguido de un pulso de un segundo a -40 mV para revelar la corriente de cola de hERG. Este paradigma se suministró una vez cada 5 segundos para monitorizar la amplitud de la corriente.

30 Solución extracelular: NaCl 137 mM, KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, tampón HePES 10 mM (el pH se ajustó a 7,4 con NaOH).

35 Después de que se consiguiera la configuración celular completa, se aplicó en primer lugar la solución extracelular (control) y la célula se estabilizó durante 2 minutos con solución extracelular. A continuación se aplicó el compuesto de ensayo de concentraciones bajas a concentraciones altas de forma acumulada. La célula se incubó con cada concentración de ensayo durante 5 minutos. Durante cada incubación, la célula se estimuló repetidamente usando el protocolo de tensión que se ha descrito anteriormente, y se monitorizó forma continua la amplitud de corriente de cola.

40 Criterios de aceptación:

- (1) Corriente de cola de pico > 100 pA en control.
- (2) Reducción inicial < 30 % y la reducción se detiene antes de la primera aplicación del compuesto ensayo.
- (3) Corrientes de pérdida < 50 % de las corrientes de cola de pico de control en cualquier momento.
- (4)  $r_s < 20$  MQ en todo el experimento.

50 El grado de inhibición (%) se obtuvo por medición de la amplitud de la corriente de cola, inducida mediante un pulso de ensayo de un segundo a -40 mV después de un pulso de dos segundos a +20 mV, antes y después de incubación con el compuesto de ensayo. La diferencia en la corriente se normalizó con respecto al control y se multiplicó por 100 con el fin de obtener el porcentaje de inhibición.

55 Las curvas de respuesta de concentración (logarítmica) se ajustaron a una ecuación logística (tres parámetros suponiendo el bloqueo completo de la corriente a concentraciones de compuesto de ensayo muy elevadas) para generar estimaciones de la concentración inhibidora del 50 % (CI<sub>50</sub>). La relación concentración-respuesta de cada compuesto se construyó a partir de los porcentajes de reducción de la amplitud de corriente mediante concentraciones secuenciales.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 11 Inhibición de canal iónico hERG		
Compuesto	CI <sub>50</sub> (PM) <sup>(1)</sup>	% de inhibición a 30 µM
ABD599	4,9	85

ABD735	-	62,5
ABD836	-	50
ABD899	2,9	100 <sup>(2)</sup>
ABD899		53 <sup>(3)</sup>
ABD900		51
REF001	-	60
HMC-C-01-A	19,3	79
HMC-C-02-A	25	57
HMC-C-03-A	> 30	45
HMC-C-04-A		69
HMC-N-01-A	183	2
HMC-N-02-A	231	31
HMC-N-03-A	> 30	13
HMC-N-04-A	> 30	26
HMC-C-01-B		74
HMC-C-02-B		94
HMC-C-03-B		36
HMC-N-01-B		27
HMC-N-02-B		23
HMC-N-03-B		47
HMC-N-04-B		60

<sup>(1)</sup> Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon usando una ecuación logística de cuatro parámetros calculada de forma automática en Grafit versión 6.0.12 (Erithacus Software Ltd., de Dr. Robin Leatherbarrow).

<sup>(2)</sup> Se sometió a ensayo un lote a escala de laboratorio.

<sup>(3)</sup> Se sometió a ensayo un lote a escala media.

Los datos demuestran que los compuestos HMC que se describen en el presente documento tienen las propiedades de seguridad cardiaca que se requieren para un fármaco oralmente activo, y tienen ventajas de seguridad en comparación con los compuestos de referencia, tales como ABD599 y ABD899, mostrando HMC-N-01-A, HMC-N-02-A y HMC-N-03-A un perfil particularmente positivo.

#### Estudio Biológico 10

##### Estudios de leucocitos primarios humanos

El sistema inmune humano implica un complejo conjunto de células y órganos que se pueden ver afectados de forma adversa por fármacos o compuestos químicos. Esto da como resultado un aumento de la susceptibilidad a infecciones, tumores, respuestas alérgicas, reacciones autoinmunes y otras formas de enfermedades del sistema inmune. Por lo tanto, la evaluación de la inmunotoxicidad es un componente importante en la evaluación de seguridad de los nuevos compuestos farmacéuticos, y el perfil ideal para un fármaco antiinflamatorio potencial que actúa a través de la modulación del sistema inmune es el que demuestra selectividad para ciertos subconjuntos de células del sistema inmune con ningún efecto en los otros, evitando de ese modo la activación o supresión inmune general. Por ejemplo, un fármaco que reduce la viabilidad o actividad de los monocitos sin ningún efecto en los neutrófilos se esperaría que poseyera propiedades antiinflamatorias con aplicación en diversas enfermedades sin comprometer la capacidad de un paciente para responder, y eliminar, infecciones.

La capacidad de un compuesto de referencia (ABD735) para influir en la viabilidad de las células sanguíneas blancas humanas se investigó usando células obtenidas a partir de células blancas humanas. Los efectos de un compuesto de referencia (ABD735) se sometieron a ensayo en los siguientes tipos de células sanguíneas blancas humanas: neutrófilos, monocitos, linfocitos B, y linfocitos T, que comprenden tanto poblaciones CD4 positivo (T cooperador) y CD8 positivo (T citotóxico). Cada uno de estos tipos de células tiene una función diferente en el sistema inmune humano.

Los neutrófilos también se conocen como granulocitos. Son las células sanguíneas blancas más abundantes en el hombre y forman parte del sistema inmune innato. Los neutrófilos actúan como respuesta primaria a la fase aguda de la inflamación causada por infección bacteriana.

5 Los monocitos son parte del sistema inmune innato encontrado en la circulación. Los monocitos de sangre periférica se diferencian para formar macrófagos, que son los precursores de diversas células implicada en la modulación de la respuesta inmune, incluyendo las células dendríticas. La función primaria de los monocitos-macrófagos es actuar como células efectoras inmunes. Están implicados en gran medida en la patogénesis de varias afecciones inflamatorias crónicas que incluyen artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

10 Los linfocitos T son parte del sistema inmune adaptativo y desempeñan un papel fundamental en la inmunidad. Existen varios subconjuntos de linfocitos T, cada uno de los cuales posee una función diferente en el sistema inmune. Los linfocitos T citotóxicos también se conocen como linfocitos T CD8+ debido a la presencia de una molécula denominada CD8 en su superficie. Su papel es destruir las células infectadas y las células tumorales, pero  
15 en condiciones inflamatorias, también pueden actuar para exacerbar la enfermedad. Los linfocitos T cooperadores también se conocen como linfocitos T CD4+ debido a la presencia de una molécula denominada CD4 en su superficie. La función de los linfocitos T cooperadores es ayudar en la maduración de los linfocitos B y activar los linfocitos T citotóxicos.

20 Los linfocitos B son parte del sistema inmune adaptativo. Sus funciones principales son preparar anticuerpos y actuar como células presentadoras de antígeno, lo que permite que los linfocitos T reconozcan los antígenos extraños.

25 Los efectos de un compuesto de referencia (ABD735) en la viabilidad de neutrófilos, monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ y linfocitos B se evaluó en condiciones tanto de reposo como estimuladas. Las condiciones de reposo se usaron para evaluar los efectos probables en las células normales que se encuentran en la sangre humana, y las condiciones estimuladas se usaron para evaluar los efectos del compuesto en condiciones de enfermedad.

30 Los efectos en la viabilidad celular se evaluaron usando citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica biofísica basada en láser que se emplea en el recuento de células, la clasificación de células, y la detección de biomarcadores, mediante la suspensión de las células en una corriente de fluido y haciéndolas pasar por un aparato de detección electrónica. Permite el análisis simultáneo de múltiples parámetros de las características físicas y químicas de hasta miles de partículas por segundo. La clasificación de las células usando citometría de flujo requiere el uso de marcadores celulares específicos. Para cuantificar el número de células, se usan perlas contadoras como  
35 estándar interno. Las perlas contadoras son una suspensión calibrada de microperlas que se añaden a un volumen conocido de muestra de modo que se conoce el volumen de muestra por perla. Esto permite la determinación absoluta del número de células en una muestra. Además, para los linfocitos B y T, se midió la proliferación celular usando un colorante conocido como colorante de proliferación celular (eFluor® 450). eFluor® 450 es un colorante orgánico que se puede conjugar con marcadores específicos de célula. Emite fluorescencia cuando se excita con un  
40 láser de una forma proporcional al número de células unidas por el conjugado. Por lo tanto, su señal proporciona una indicación de la proliferación de tipos específicos de células.

*Aislamiento de neutrófilos y evaluación del impacto en la supervivencia:*

45 Se aislaron neutrófilos de sangre completa (recogida de donantes sanos) mediante un gradiente de densidad de dos etapas Histopaque® 1077 e Histopaque® 1119. Las células polimorfonucleares se lavaron en medio RPMI complementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina) y se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI complementado con un 10 % de suero de ternera fetal (FCS) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina). A continuación, se añadieron 50 µl de la suspensión de células a una placa de 96 pocillos, con y sin compuesto de referencia (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o control (DMSO al 0,3 %), con  
50 o sin dexametasona (1 µM) y se incubaron a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después de la incubación, las células se fijaron y se añadió un volumen exacto de perlas contadoras a cada tubo para calcular el número de células vivas.

55 *Aislamiento de monocitos y evaluación del impacto en la supervivencia:*

Se recogieron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos (todos ellos hombres) y se aislaron por centrifugación en una capa de Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). A continuación, las células se resuspendieron ( $3 \times 10^6$  células/ml) en RPMI complementado con un 10 % de FCS y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina) y se añadió 1 ml de suspensión celular a una placa de 48 pocillos, que a continuación se incubó durante 1 hora a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el sobrenadante se aspiró para retirar las células no adherentes, lo que fue seguido por dos etapas de lavado para asegurar la retirada de las células no adherentes. Las células adheridas (monocitos) se estimularon a continuación con LPS (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) o factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF) (10 ng/ml) en ausencia (control) o presencia del compuesto de referencia (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) durante 48 horas a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las placas se centrifugaron y los monocitos se lavaron en PBS antes de la adición de PBS más EDTA (10 mM) e incubación a  
65

4 °C durante 20 minutos para ayudar a desprender las células, lo que se facilitó mediante pipeteado. Los monocitos se añadieron a tubos Falcon y se lavaron por centrifugación con PBS antes de que se añadiera un volumen exacto de perlas contadoras a cada tubo para calcular el número de células vivas.

5 *Aislamiento de linfocitos B y evaluación del impacto en la supervivencia:*

Se recogieron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos (todas ellas mujeres) y se aislaron por centrifugación en una capa de Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). A continuación, las células se resuspendieron en RPMI complementado con un 10 % de FCS y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin). La suspensión celular se añadió a una placa de 96 pocillos con o sin el compuesto de referencia (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o control (DMSO al 0,3 %) con o sin a combinación de *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) e interleuquina-2 (SAC/IL-2) (1:10,000 y 2 ng/ml) y se incubaron a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Después de la incubación, las células se tiñeron con anti-CD19 humano antes de que se añadiera un volumen exacto de perlas contadoras a cada tubo para calcular el número de células vivas.

15 *Aislamiento de linfocitos B y evaluación del impacto en la proliferación:*

Se recogieron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos (todas ellas mujeres) y se aislaron por centrifugación en una capa de Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). A continuación, las células se tiñeron con colorante de proliferación celular, que mide la proliferación de las células (eFluor® 450) y se resuspendieron en RPMI complementado con un 10 % de FCS y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin). La suspensión celular se añadió a una placa de 96 pocillos con o sin el compuesto de referencia (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o control (DMSO al 0,3 %) con o sin a combinación de *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) e interleuquina-2 (SAC/IL-2) (1:10,000 y 2 ng/ml) y se incubaron a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Después de la incubación, las células se tiñeron con anti-CD19 humano, un marcador de linfocitos B, antes de que se analizaran en un citómetro de flujo. Se consideró que las células con baja cantidad de e450 habían proliferado.

*Aislamiento de linfocitos T y evaluación del impacto en la supervivencia:*

30 Se recogieron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos (todas ellas mujeres) y se aislaron por centrifugación en una capa de Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). A continuación, las células se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI complementado con un 10 % de FCS y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin). La suspensión celular se añadió a una placa de 96 pocillos con o sin el compuesto de referencia (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o control (DMSO al 0,3 %) con o sin fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/ml) y se incubaron a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Después de la incubación, las células se tiñeron con anti-CD8 o CD4 humano antes de que se añadiera un volumen exacto de perlas contadoras a cada tubo para calcular el número de células vivas.

40 *Aislamiento de linfocitos T y evaluación del impacto en la proliferación:*

Se recogieron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos (todas ellas mujeres) y se aislaron por centrifugación en una capa de Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). A continuación, las células se tiñeron con colorante de proliferación celular (eFluor® 450) y se resuspendieron en RPMI complementado con un 10 % de FCS y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin). La suspensión celular se añadió a una placa de 96 pocillos con o sin el compuesto de referencia (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o control (DMSO al 0,3 %) con o sin fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/ml) y se incubaron a 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Después de la incubación, las células se tiñeron con anti-CD8 o CD4 humano antes de que se analizaran en un citómetro de flujo. Se consideró que las células con baja cantidad de e450 habían proliferado.

50 Los resultados medios (n = 3) para el compuesto referencia (ABD735) se expresaron como el número de veces de cambio frente al valor medio del control. A continuación, los datos se representaron gráficamente usando software de Grafit (Erithacus Software). Cada experimento se repitió tres veces y los datos se presentan como el valor medio de todos los experimentos.

55 Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 12 Viabilidad celular en presencia de ABD735 (3 µM)		
Tipo de célula	Estimulación	Veces de cambio en la viabilidad
Neutrófilos	-	1,0
	Dexametasona	0,8
Linfocitos B	-	0,9

	SAC/IL-2	1,1
Linfocitos T CD4+	-	0,9
	Fitohemaglutinina	0,6
Linfocitos T CD8+	-	0,8
	Fitohemaglutinina	0,7
Monocitos	-	0,7
	M-CSF	1,1
	LPS	1,0
	TNF $\alpha$	0,5

Tabla 13 Proliferación celular en presencia de ABD735 (3 $\mu$ M)		
Tipo de célula	Estimulación	Veces de cambio en la proliferación
Linfocitos B	-	0,9
	SAC/IL-2	0,6
Linfocitos T CD4+	-	1
	Fitohemaglutinina	0,6
Linfocitos T CD8+	-	0,7
	Fitohemaglutinina	0,3

Se han mostrado anteriormente los resultados de una concentración elevada individual (3  $\mu$ M) del compuesto de referencia (ABD735) a través de los tipos de leucocitos. En este ensayo, 0,5 veces de cambio o inferior es significativo de pérdida de viabilidad, y 0,6 veces de cambio o inferior es significativo de reducciones en la proliferación.

Se puede observar a partir de estos datos que el compuesto de referencia (ABD735) reduce selectivamente la viabilidad de los monocitos en presencia únicamente de TNF $\alpha$ , y no en presencia de M-CSF o LPS. Además, el compuesto de referencia (ABD735) tiene muy poco efecto en la viabilidad de las demás poblaciones de leucocitos lo que indica que los compuestos de esta serie no son generalmente inmunosupresores. También se muestra que el compuesto de referencia (ABD735) reduce la proliferación de linfocitos, observándose los efectos más profundos en los linfocitos T CD8+ estimulados. Un perfil tal como este, con reducción selectiva en la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos, es un perfil mecanístico atractivo para el tratamiento de enfermedades de inflamación tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, y esclerosis múltiple, así como para el tratamiento de leucemias que incluyen: linfoma de linfocitos T, tal como linfoma de linfocitos T extranodal, linfoma de linfocitos T cutáneo, linfoma macrocítico anaplásico, y linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico; linfoma de linfocitos B, tal como linfomas Hodgkin y no Hodgkin, incluyendo linfoma de linfocitos B macrocítico difuso, linfoma folicular, linfoma del tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítico microcítico, linfoma de células del manto, y linfoma de Burkitt; y otras leucemias, tales como leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple.

#### Estudio Biológico 11

Estudio de artritis inducida por pristano en ratas

Se usaron ratas de Lewis hembra para todos los procedimientos. Los animales se alojaron en grupos de 5, y se mantuvieron a 21  $^{\circ}$ C  $\pm$  2  $^{\circ}$ C con un ciclo de luz/obscuridad de 12 horas con alimento y agua a voluntad. Se indujo la artritis mediante la administración de 0,3 ml de pristano por vía intradérmica en la base de la cola. Las ratas comenzaron a desarrollar signos y síntomas de artritis aproximadamente siete días después de la inyección de pristano.

Para la evaluación macroscópica de la artritis, se monitorizaron los siguientes signos en cada pata de cada ratón tres veces por semana y se resumieron para generar el índice artrítico (IA) (el IA máximo para un animal es 16):

- 0 = sin ningún efecto visible de artritis.  
1 = edema y/o eritema de un dedo.

2 = edema y/o eritema de dos dedos.

3 = edema y/o eritema de más de dos dedos.

4 = artritis grave en todas las patas y dedos incluyendo deformación de extremidades y anquilosamiento de la articulación.

5 Los animales se clasificaron en grupos de tratamiento antes de la administración de pristano y se dosificaron una vez al día durante 28 días con compuesto de ensayo a dosis de 3 y 10 mg/kg/día mediante sonda gástrica oral, o mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 0,05 mg/kg para el control positivo, metotrexato. Después de la finalización del experimento, las ratas se sacrificaron.

10 Los datos se analizaron generando una media del índice artrítico en cada grupo de tratamiento. El índice artrítico medio se comparó a continuación con el índice artrítico de los animales de control (sin tratar) usando la siguiente fórmula para generar un porcentaje de inhibición de la enfermedad.

$$\% \text{ de inhibición de enfermedad} = 100 - \left[ \frac{\text{índice artrítico medio: animales tratados}}{\text{índice artrítico medio: animales sin tratar}} * 100 \right]$$

15 Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 14 Inhibición de artritis		
Compuesto	Dosis (mg / kg / día)	% de inhibición de enfermedad
ABD899	3	21
ABD899	10	ND(1)
HMC-C-01-A	3	40
HMC-C-01-A	10	67
HMC-N-01-A	3	39
HMC-N-01-A	10	60
<sup>(1)</sup> La dosificación se terminó en el día 10 debido a efectos adversos.		

20 Los datos para algunos de los compuestos también se ilustran en la Figura 3.

25 La Figura 3 muestra seis gráficos, cada uno del índice artrítico medio en función del tiempo (día de dosificación) para el compuesto de ensayo (círculos abiertos), control (círculos sólidos), y control positivo, metotrexato (triángulos) para cada uno de: (A) ABD899 dosificado a 3 mg/kg/día (superior izquierdo), (B) HMC-C-01-A dosificado a 3 mg/kg/día (superior medio), (C) HMC-N-01-A dosificado a 3 mg/kg/día (superior derecho), (D) ABD899 dosificado a 10 mg/kg/día (inferior izquierdo), (E) HMC-C-01-A dosificado a 10 mg/kg/día (inferior medio), y (F) HMC-N-01-A dosificado a 10 mg/kg/día (inferior derecho).

30 Estos datos indican que los compuestos HMC que se describen en el presente documento muestran una excelente actividad oral *in vivo* en la prevención del progreso de la artritis inducida por pristano, mientras que el compuesto ABD899 tiene un efecto limitado en la enfermedad en este modelo, a pesar de la buena actividad en el Estudio Biológico 6. Además, los compuestos HMC-C-01-A y HMC-N-01-A se toleraron bien por parte de los animales durante la dosificación prolongada, mientras que ABD899 se toleró mal de un modo tal que fue necesario terminar la dosificación y retirar los animales que la recibían del estudio (mostrado en la Figura 3, panel D). Además, el compuesto HMC-C-01-A mostró una eficacia particularmente buena en el modelo, que fue equivalente al de la terapia de primera línea comercializada para artritis reumatoide, metotrexato.

Los datos muestran además que la identificación de compuestos con eficacia superior ni es trivial ni es previsible.

40 Lo expuesto anteriormente ha descrito los principios, las realizaciones preferentes, y los modos de operación de la presente invención. Sin embargo, no se debería interpretar que la invención está limitada por las realizaciones particulares discutidas. En su lugar, las realizaciones descritas anteriormente se deberían considerar como ilustrativas en lugar de restrictivas. Se debería entender que los expertos en la materia pueden realizar variaciones en esas realizaciones sin apartarse del alcance de la presente invención.

## REFERENCIAS

Se citan diversas publicaciones en el presente documento con el fin de describir y desvelar más completamente la invención y el estado de la técnica con el que está relacionado la invención. Las citas completas de estas publicaciones se proporcionan a continuación. Cada una de estas publicaciones se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad en la presente divulgación, en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación individual se incorpora por referencia.

- 5 Akahoshi *et al.*, 2008, "Promoter polymorphisms in the IRF3 gene confer protection against systemic lupus erythematosus", *Lupus*, vol. 17 pág. 568-574.
- 10 Astry *et al.*, 2011, "A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis", *J Interferon Cytokine Res.*, vol. 31, pág.927-940.
- Bahmanyar *et al.*, 2010, "Aminotriazolopyridines and their use as kinase inhibitors", documento de publicación de patente internacional número WO 2010/027500 A1 publicado el 11 de marzo de 2010.
- 15 Baud *et al.*, 1999, "Signalling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain", *Genes Dev.*, vol. 13, pág. 1297-1308.
- Baud *et al.*, 2009, "Is NFκB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls", *Nat. Rev. Drug Disc.*, vol. 8, pág. 33-40.
- 20 Billiau, 2010, "Etanercept improves linear growth and bone mass acquisition in MTX-resistant polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis", *Rheumatology (Oxford)*, vol. 49, pág. 1550-1558.
- Bladh *et al.*, 2006, "Novel sulphonamide derivatives as glucocorticoid receptor modulators for the treatment of inflammatory diseases", documento de publicación de patente internacional número WO 2006/046916 A1 publicado el 4 de mayo de 2006.
- 25 Brennan *et al.*, 1992, "Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints", *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, pág. 1907-1912.
- Brennan *et al.*, 1996, "Cytokines in autoimmunity", *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 8, pág. 872-877.
- Chen *et al.*, 2012, "High-affinity and selective dopamine D3 receptor full agonists", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, vol. 22, pág. 5612-5617.
- 30 Childs, L.M., *et al.*, 2001, "Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 16, n.º 2, pág. 338-347.
- Dallas *et al.*, 2011, "Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection", *J. Clin. Invest.*, vol. 121, pág. 2534-2542.
- 35 Dimitris *et al.*, 1998, "The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease", *Ann Intern Med.*, vol. 128, n.º 2, pág. 127-137.
- Dvorak *et al.*, 1996, "Comparative ultrastructural morphology of human basophils stimulated to release histamine by anti-IgE, recombinant IgE-dependent histamine-releasing factor, or monocyte chemotactic protein-1", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 98, pág. 355-370.
- Feldmann *et al.*, 1994, "TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis", *Circ. Shock*, vol. 43, pág. 179-184.
- 40 Feldmann *et al.*, 1996, "Rheumatoid arthritis", *Cell*, vol. 85, pág. 307-310.
- Feldmann *et al.*, 2001, "The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis", *Curr. Dir. Autoimmun.*, vol. 3, pág. 188-199.
- Firestein, 2005 "Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", *J. Clin. Rheumatol.*, vol. 11. pág. S39-S44.
- 45 Fu *et al.*, 2011, "Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus", *Arthritis Rheum.*, vol. 63, pág. 749-754.
- Gabay, 2006, "Interleukin-6 and chronic inflammation", *Arthritis Research & Therapy*, vol. 8 (Supl 2), S3.
- Galli *et al.*, 1989, "IgE, Mast Cells and the Allergic Response", *Ciba Foundation Symposium*, vol. 147, pág. 53-73.
- 50 Gottlieb, 2005, "Psoriasis: Emerging Therapeutic Strategies", *Nat. Rev. Drug Disc.*, vol. 4, pág. 19-34.
- Greig *et al.*, 2006, "Development and characterization of biphenylsulfonamides as novel inhibitors of bone resorption", *J. Med. Chem.*, Vol 49: pp 7487-7492.
- Greig *et al.*, 2008, "Biphenyl-4-yl-sulfonic acid arylamides and their use as therapeutic agents", documento de publicación de patente internacional número WO 2008/114022 A1 publicado el 25 de septiembre de 2008.
- 55 Greig *et al.*, 2010a, "Aryl-phenyl-sulfonamido-cycloalkyl compounds and their use", documento de publicación de patente internacional número WO 2010/032009 A1 publicado el 25 de marzo de 2010.
- Greig *et al.*, 2010b, "Aryl-phenyl-sulfonamido-phenylene compounds and their use", documento de publicación de patente internacional número WO 2010/032010 A1 publicado el 25 de marzo de 2010.
- 60 Greig *et al.*, 2013, "Development of triarylsulfonamides as novel anti-inflammatory agents", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, vol. 23, pág. 816-820.
- Hadida *et al.*, 2007, "Heterocyclic modulators of ATP-binding cassette transporters", documento de publicación de patente internacional número WO 2007/056341 A1 publicado el 18 de mayo de 2007.
- Hu *et al.*, 2011, "A meta-analysis of the association of IRF5 polymorphism with systemic lupus erythematosus International", *Journal of Immunogenetics*, vol. 38, pág. 411-417.
- 65 Jimi *et al.*, 2004, "Selective inhibition of NF-κB blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo", *Nat. Med.*, vol. 10, pág. 617-624.

- Joosten *et al.*, 1996, "Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra", *Arthritis Rheum.*, vol. 39, pág. 797-809.
- 5 Karsenty *et al.*, 2002, "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development", *Dev. Cell.*, vol. 2, pág. 389-406.
- Klareskog *et al.*, 2006, "Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis", *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, vol. 2, pág. 425-433.
- Korzenik *et al.*, 2006, "Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease", *Nat. Rev. Drug Disc.*, vol. 5, pág. 197-209.
- 10 Krausgruber *et al.*, 2011, "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses", *Nat. Immunol.*, vol. 12, pág. 231-238.
- Li *et al.*, 2008, "A tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease", *Nature Medicine*, vol. 14, n.º 8, pág. 863-868.
- Liu, 2005, "Molecular mechanism of TNF signalling and beyond", *Cell Res.*, vol. 15, pág. 24-27.
- 15 Long, 2012, "Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling", *Bone Key Rep.*, vol. 1, p. 59.
- Malemud *et al.*, 2010, "Myeloid-related protein activity in Rheumatoid Arthritis", *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, vol. 2, pág. 97-111.
- Mantovani, 2009, "Inflaming metastasis", *Nature*, vol. 457, pág. 36-37.
- 20 Mazzucchelli *et al.*, 1996, "Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease", *J. Pathol.*, vol. 178, n.º 2, pág. 201-206.
- McInnes *et al.*, 2007, "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, pág. 429-442.
- Minamino *et al.*, 2012, "IRF-2 regulates B-cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms", *Int Immunol.*, vol. 24, pág. 573-581.
- 25 Mount *et al.*, 2005, "Rheumatoid arthritis market", *Nat. Rev. Drug Disc.*, vol. 2, pág. 11-12.
- O'Shea *et al.*, 2013, "Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases", *Annals of Rheumatic Disease*, vol. 72, Supplement 2, pág. 111-115.
- Ogata *et al.*, 2012, "Safety and Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis", *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.*, vol. 5, pág. 27-42.
- 30 Parameswaran *et al.*, 2010, "Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages", *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, vol. 20, pág. 87-103.
- Philchenkov *et al.*, 2004, "Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities", *Exp. Oncol.*, Vol 26, pp 82-97.
- 35 Pisetsky, 2012, "Advances in the treatment of inflammatory arthritis", *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 26, pág.251-261.
- Ralston *et al.*, 2005, "Aryl alkyl sulfonamides as therapeutic agents for the treatment of bone conditions", documento de publicación de patente internacional número WO 2005/118528 A2 publicado el 15 de diciembre de 2005.
- 40 Rincon, 2012 "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases", *Trends in Immunology*, vol. 33, n.º 11, pág. 571-577.
- Roodman, 2006, "Regulation of osteoclast differentiation", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1068, pág. 100-109.
- Scott *et al.*, 2010, "Rheumatoid Arthritis", *Lancet*, vol. 376, pág. 1094-1108.
- Sharif *et al.*, 2012, "IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 71, pág. 1197-1202.
- 45 Smolen *et al.*, 2003, "Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis", *Nat. Rev. Drug Disc.*, vol. 2, pág. 473-488.
- Steger *et al.*, 2011, "Denosumab for the treatment of bone metastases in breast cancer: evidence and opinion", *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 3, pág. 233-243.
- Sugiyama *et al.*, 1995, "Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis", *Eur. Respir. J.*, vol. 8, pág. 1084-1090.
- 50 Sun, 2010, "Mechanical loading, cartilage degradation and arthritis", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1211, pág. 37-50.
- Takaoka *et al.*, 2005, "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors", *Nature*, vol. 434, pág. 243-249.
- 55 Takayanagi, 2009, "Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone", *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 5, pág. 667-676.
- Tanaka *et al.*, 2003, "Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function", *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 21, pág. 123-133.
- Tsutsumi *et al.*, 2005, "Dipeptidyl peptidase IV inhibitor", documento de publicación de patente internacional número WO 2005/025554 A2 publicado el 24 de marzo de 2005.
- 60 van den Berg *et al.*, 1999, "Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1", *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 13, pág. 577-597.
- van den Berg, 2002, "Is there a rationale for combined TNF and IL-1 blocking in arthritis?", *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 20, pág. S21-S25.
- 65 Volejnikova *et al.*, 1997, "Monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse", *Am. J. Pathol.*, vol. 150, n.º 5, pág. 1711-1721.

Wang *et al.*, 2010, "Selective ligands for the dopamine 3 (D<sub>3</sub>) receptor and methods of using same", documento de publicación de patente internacional número WO 2010/025235 A1 publicado el 4 de marzo de 2010.

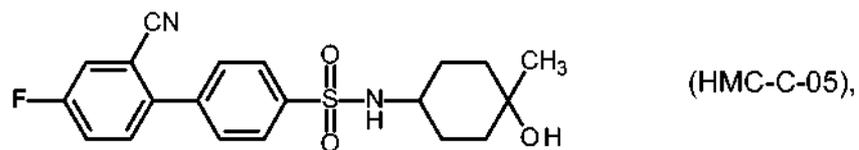
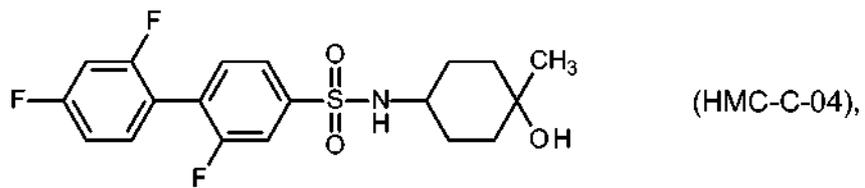
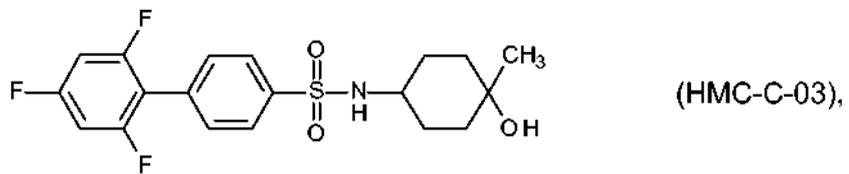
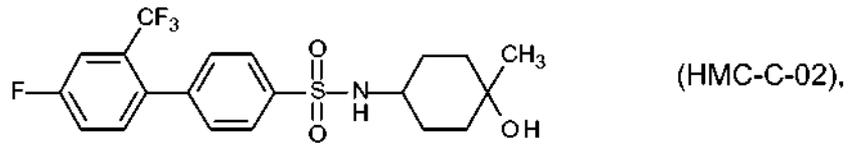
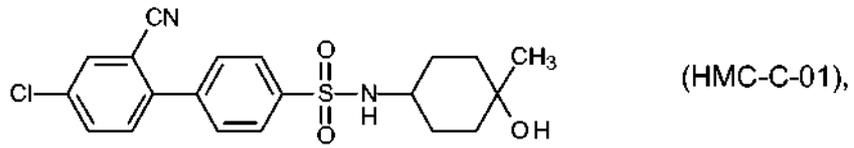
Zhang *et al.*, 2012 "Regulation of T helper cell differentiation by interferon regulatory factor family members", *Immunol. Res.*, vol. 54 pág. 169-176.

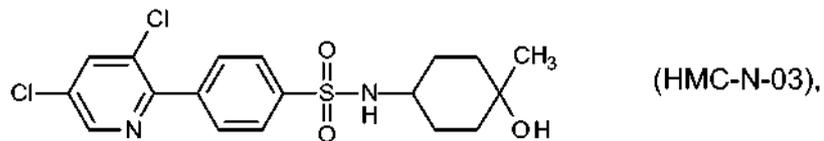
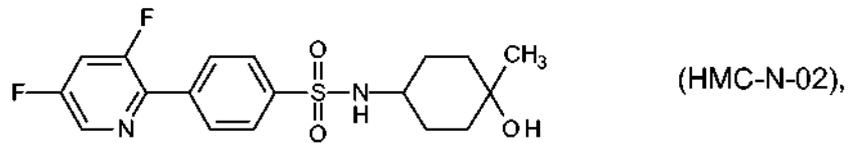
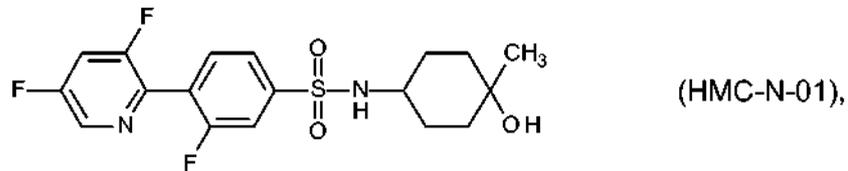
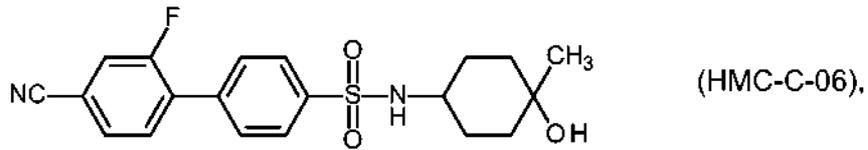
5 Zheng *et al.*, 1998, "Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: Possible involvement in CD68+ macrophage-like cell migration", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 70, n.º 1, pág. 121-129.

REIVINDICACIONES

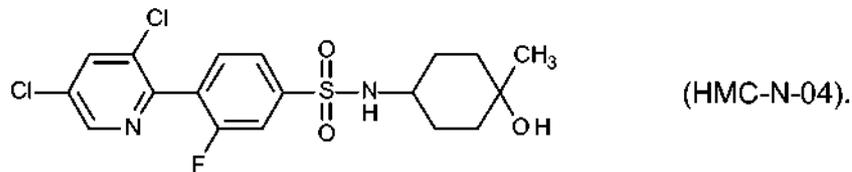
1. Compuesto seleccionado entre los compuestos de las siguientes fórmulas, o una sal, un hidrato o un solvato de los mismos farmacéuticamente aceptables:

5



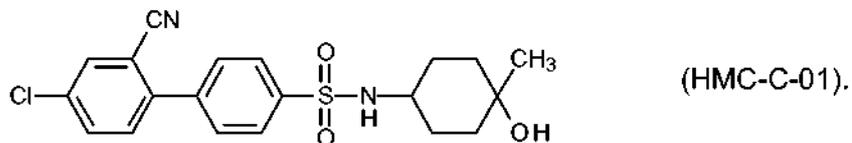


y



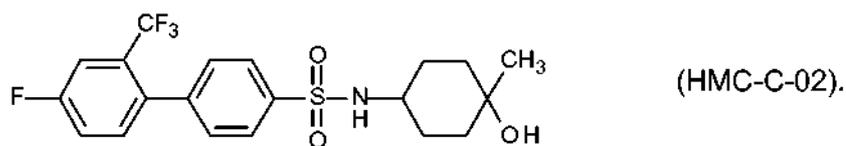
5

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



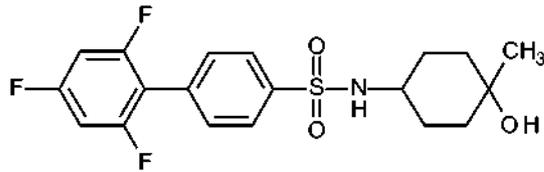
10

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



15

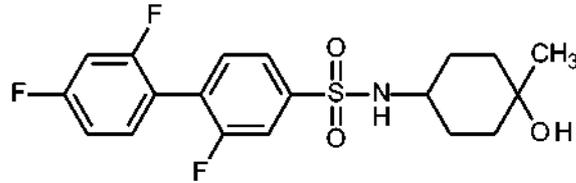
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



(HMC-C-03).

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

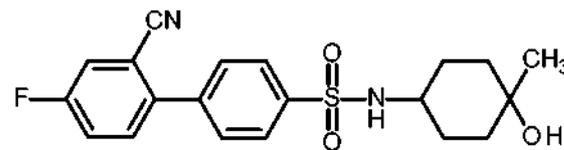
5



(HMC-C-04).

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

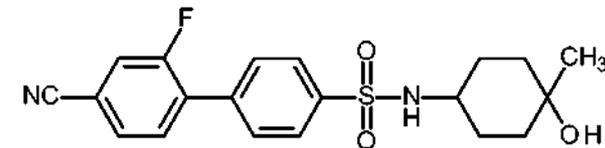
10



(HMC-C-05).

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

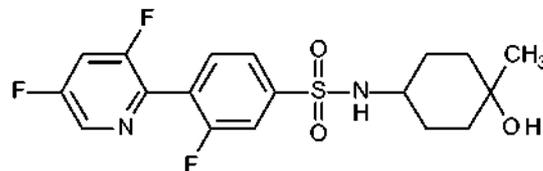
15



(HMC-C-06).

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

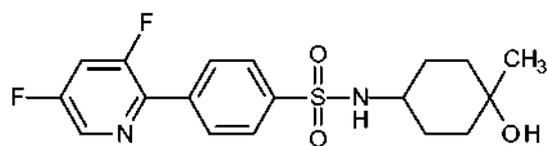
20



(HMC-N-01).

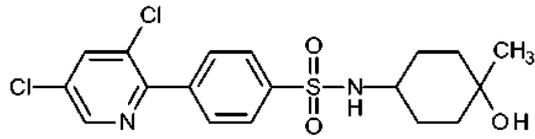
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

25



(HMC-N-02).

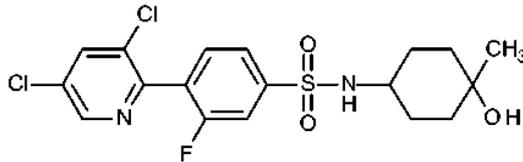
10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



(HMC-N-03).

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

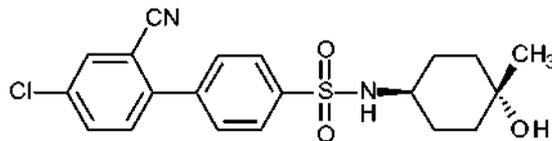
5



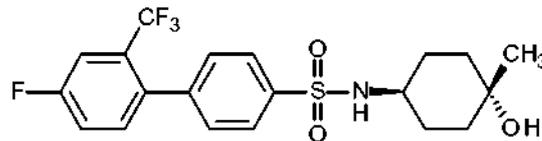
(HMC-N-04).

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto seleccionado entre los compuestos de las siguientes fórmulas, o una sal, un hidrato o un solvato de los mismos farmacéuticamente aceptables:

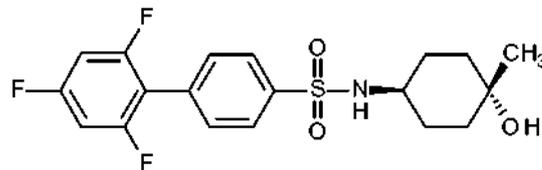
10



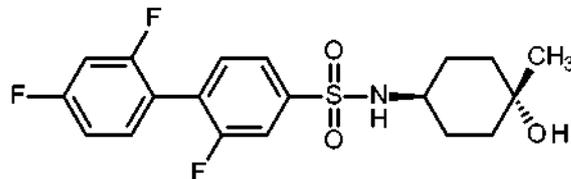
(HMC-C-01-A),



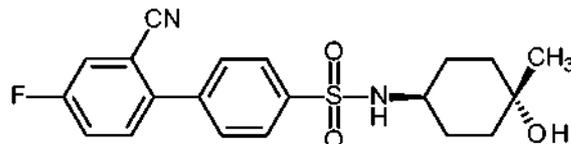
(HMC-C-02-A),



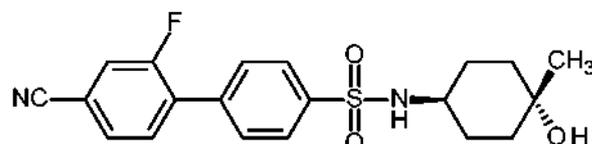
(HMC-C-03-A),



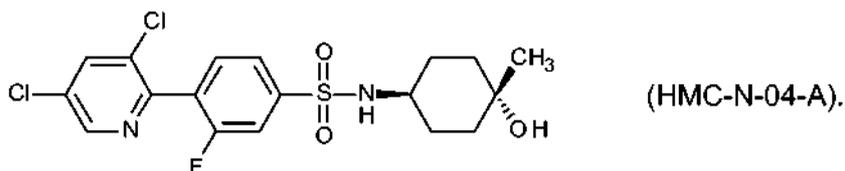
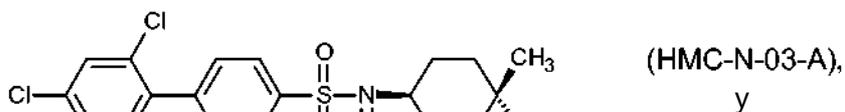
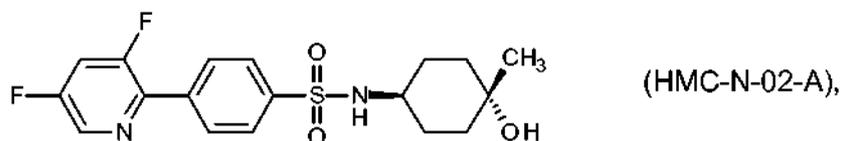
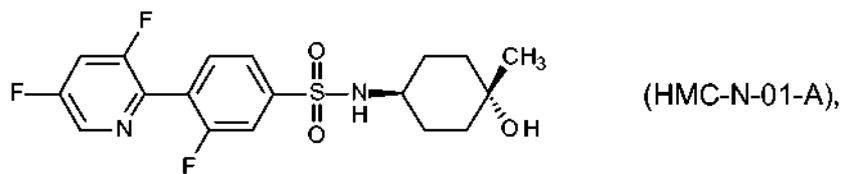
(HMC-C-04-A),



(HMC-C-05-A),

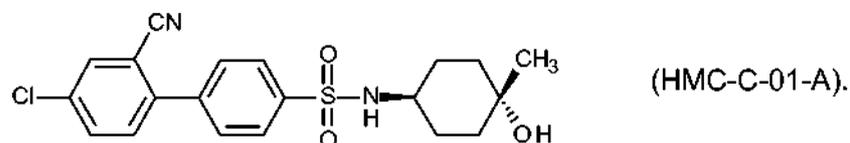


(HMC-C-06-A),



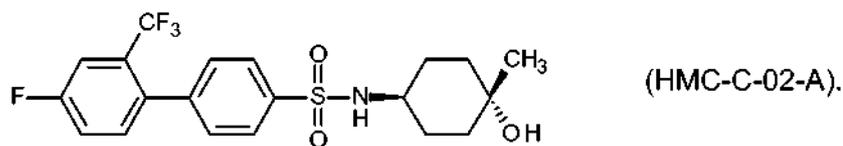
13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

5



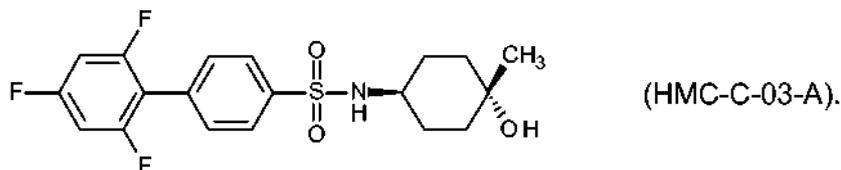
14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

10



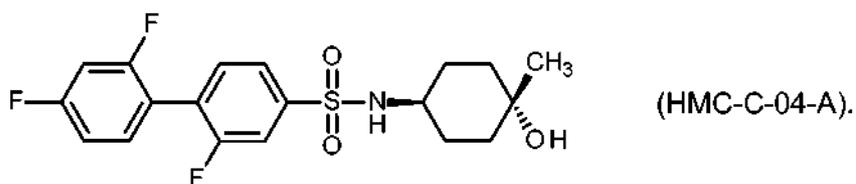
15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

15



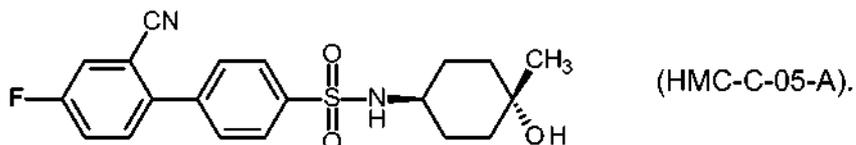
16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

20



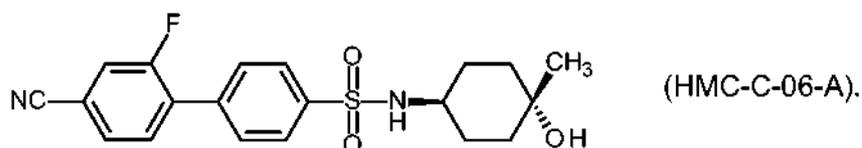
17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

5



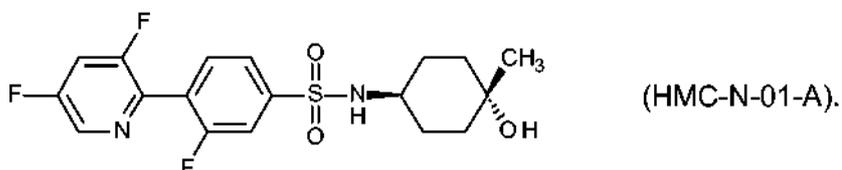
18. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

10



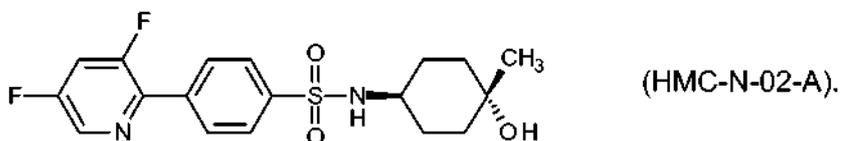
19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

15



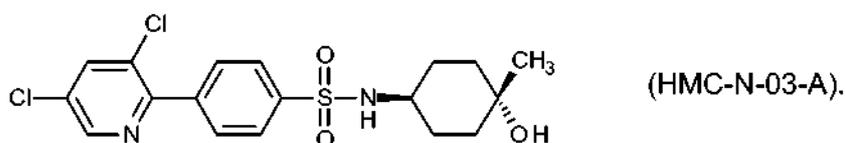
20. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

20



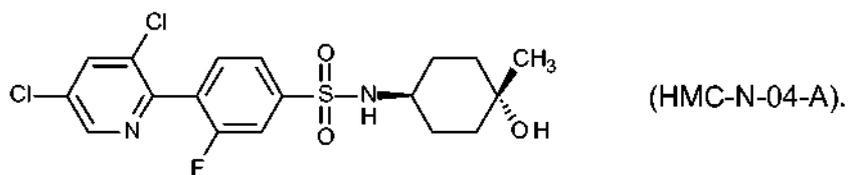
21. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

25



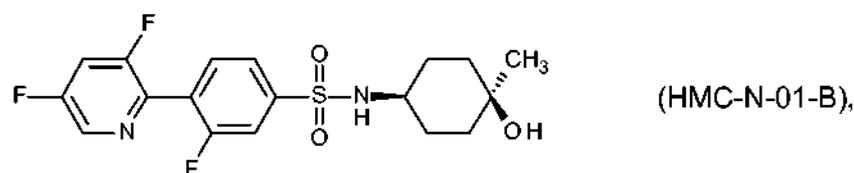
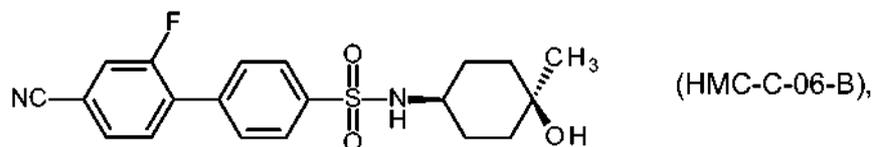
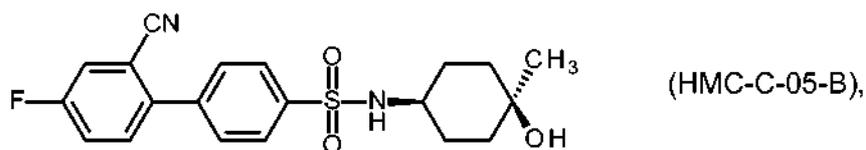
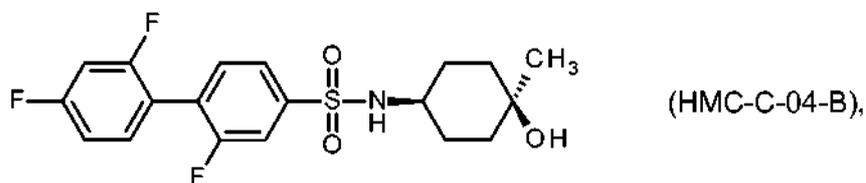
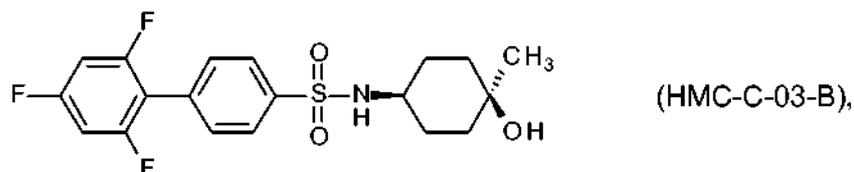
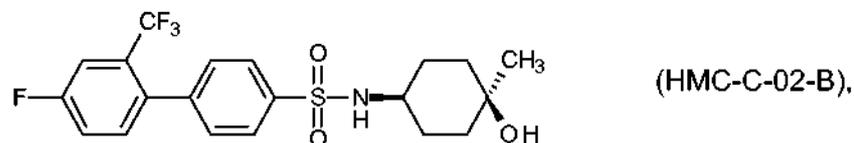
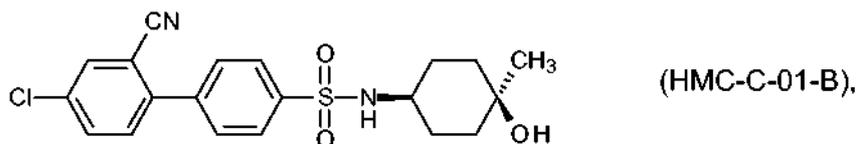
22. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

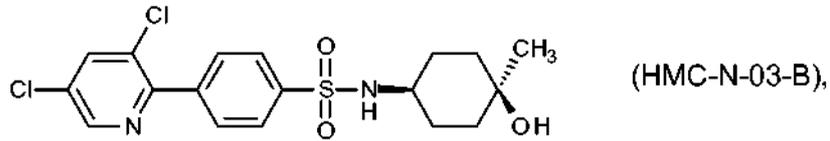
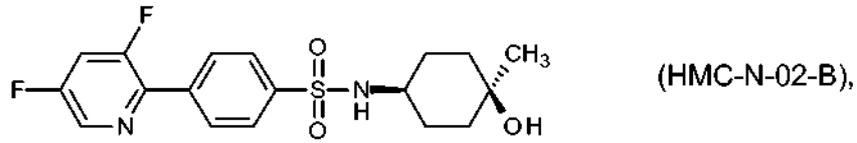
30



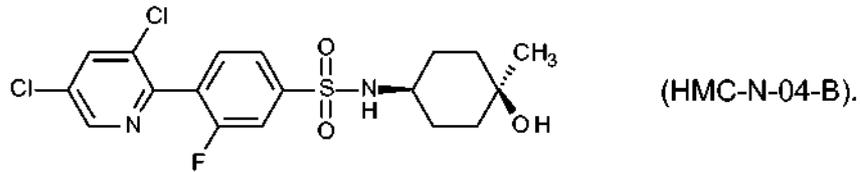
23. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto seleccionado entre los compuestos de las siguientes fórmulas, o una sal, un hidrato o un solvato de los mismos farmacéuticamente aceptables:

5

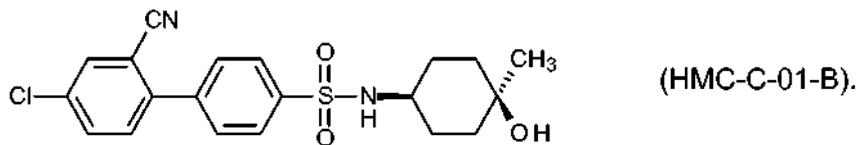




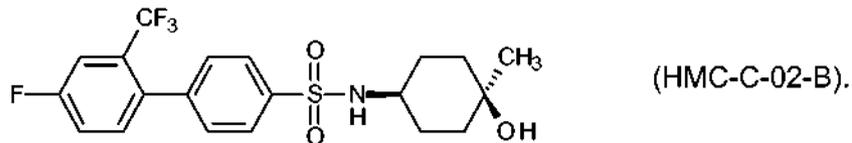
y



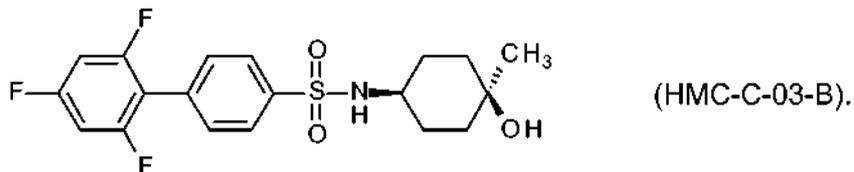
- 5 24. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



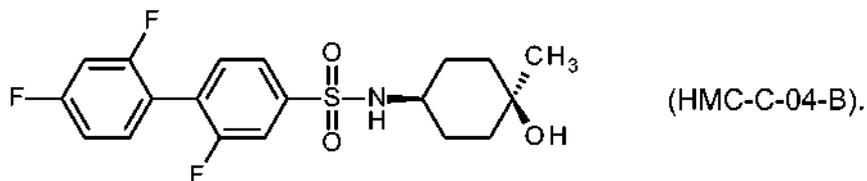
- 10 25. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



- 15 26. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

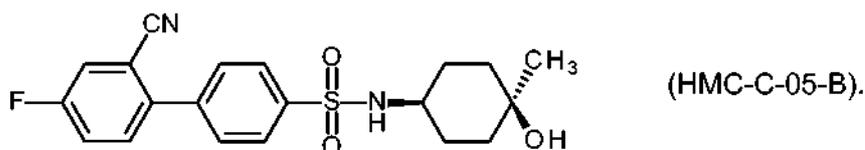


- 20 27. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



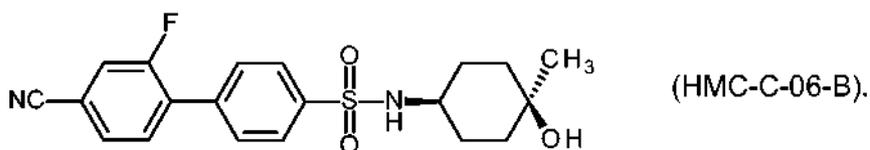
28. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

5



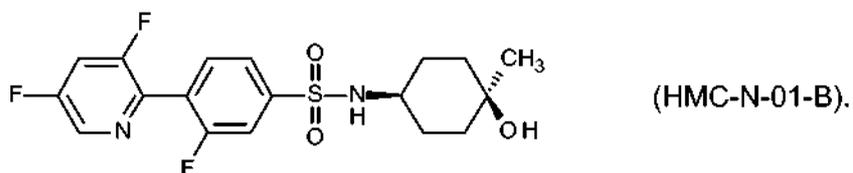
29. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

10



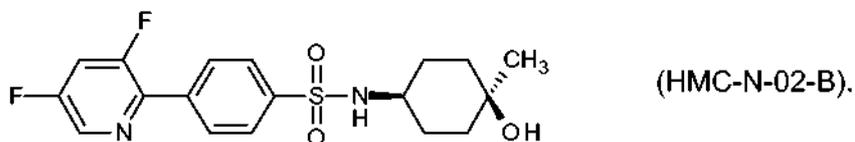
30. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

15



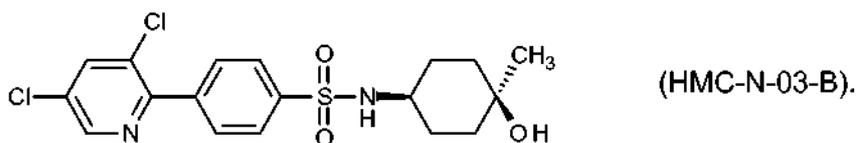
31. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

20

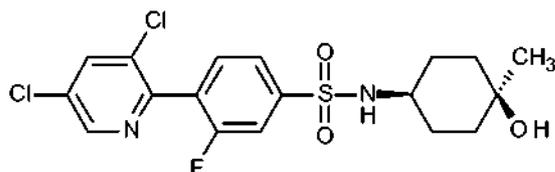


32. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:

25



33. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que es un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, un hidrato o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables:



(HMC-N-04-B).

34. Composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 5
35. Método para preparar una composición que comprende la etapa de mezclar un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
36. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 10
37. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- 15
- artritis reumatoide; psoriasis; artritis psoriática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); asma; aterosclerosis; enfermedad inflamatoria del intestino; espondilitis anquilosante; esclerosis múltiple; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren;
- 20
- un trastorno asociado a pérdida ósea, tal como pérdida ósea asociada a la actividad excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer, o enfermedad de Paget;
- cáncer, tal como un tumor maligno hematológico, tal como mieloma múltiple, leucemia o linfoma, o un cáncer de tumor sólido, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama (femenino y/o masculino), cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer de tiroides, ameloblastoma de células basales o melanoma;
- 25
- un trastorno asociado a fibrosis, tal como esclerosis sistémica o esclerodermia; o una vasculitis infrecuente, tal como enfermedad de Behçet.
38. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- 30
- artritis reumatoide; psoriasis; artritis psoriática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); asma; aterosclerosis; enfermedad inflamatoria del intestino; o espondilitis anquilosante.
39. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- esclerosis múltiple; lupus eritematoso sistémico; o síndrome de Sjogren.
- 35
40. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- un trastorno asociado a pérdida ósea, tal como pérdida ósea asociada a la actividad excesiva de osteoclastos en artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedad ósea asociada a cáncer o enfermedad de Paget.
- 40
41. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- 45
- cáncer, tal como un tumor maligno hematológico, tal como mieloma múltiple, leucemia, o linfoma, o un cáncer de tumor sólido, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama (femenino y/o masculino), cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer de tiroides, ameloblastoma de células basales o melanoma.
42. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- un trastorno asociado a fibrosis, tal como esclerosis sistémica o esclerodermia.
- 50
43. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el tratamiento es tratamiento de:
- una vasculitis infrecuente, tal como enfermedad de Behçet.

**FIGURA 1**

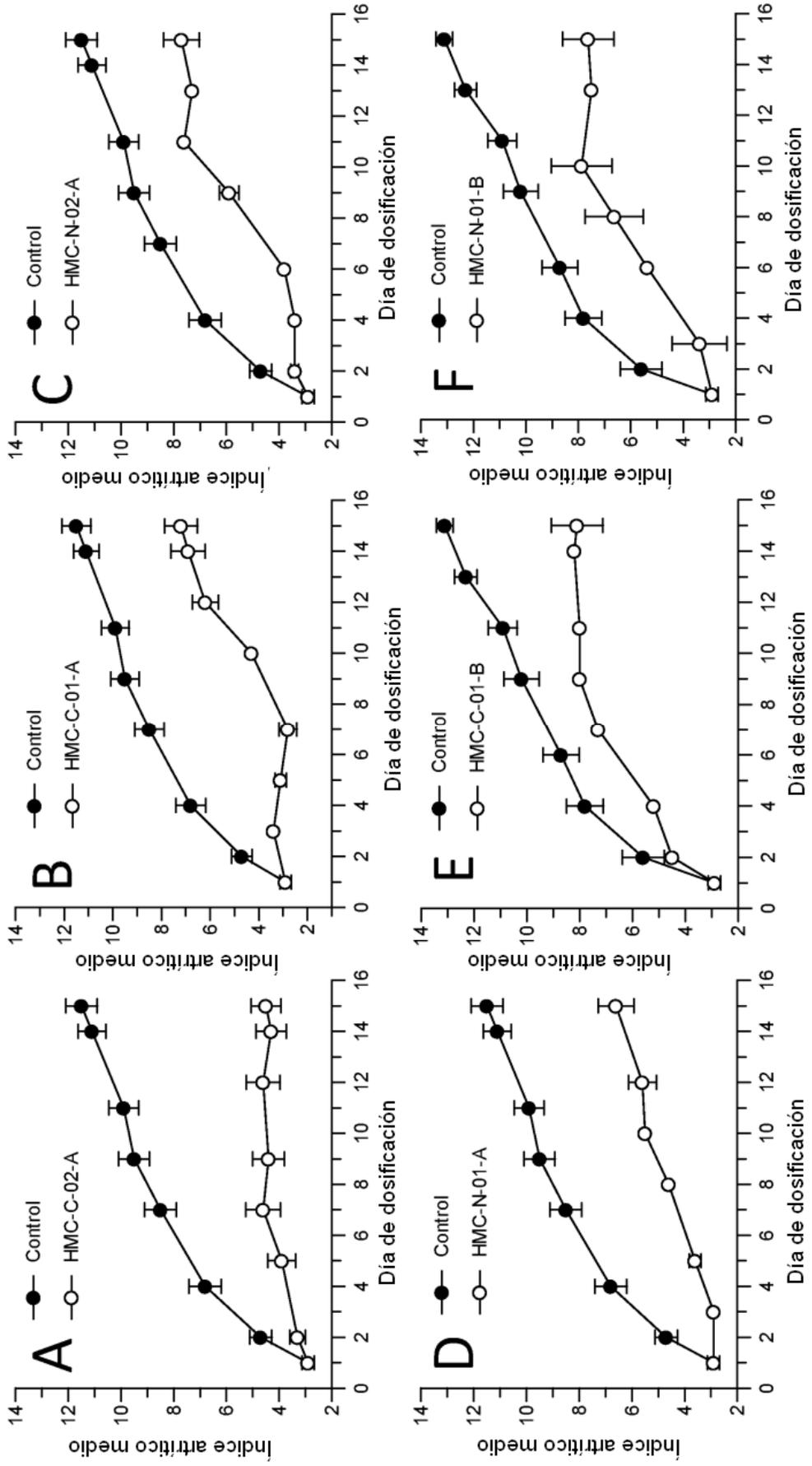


FIGURA 2

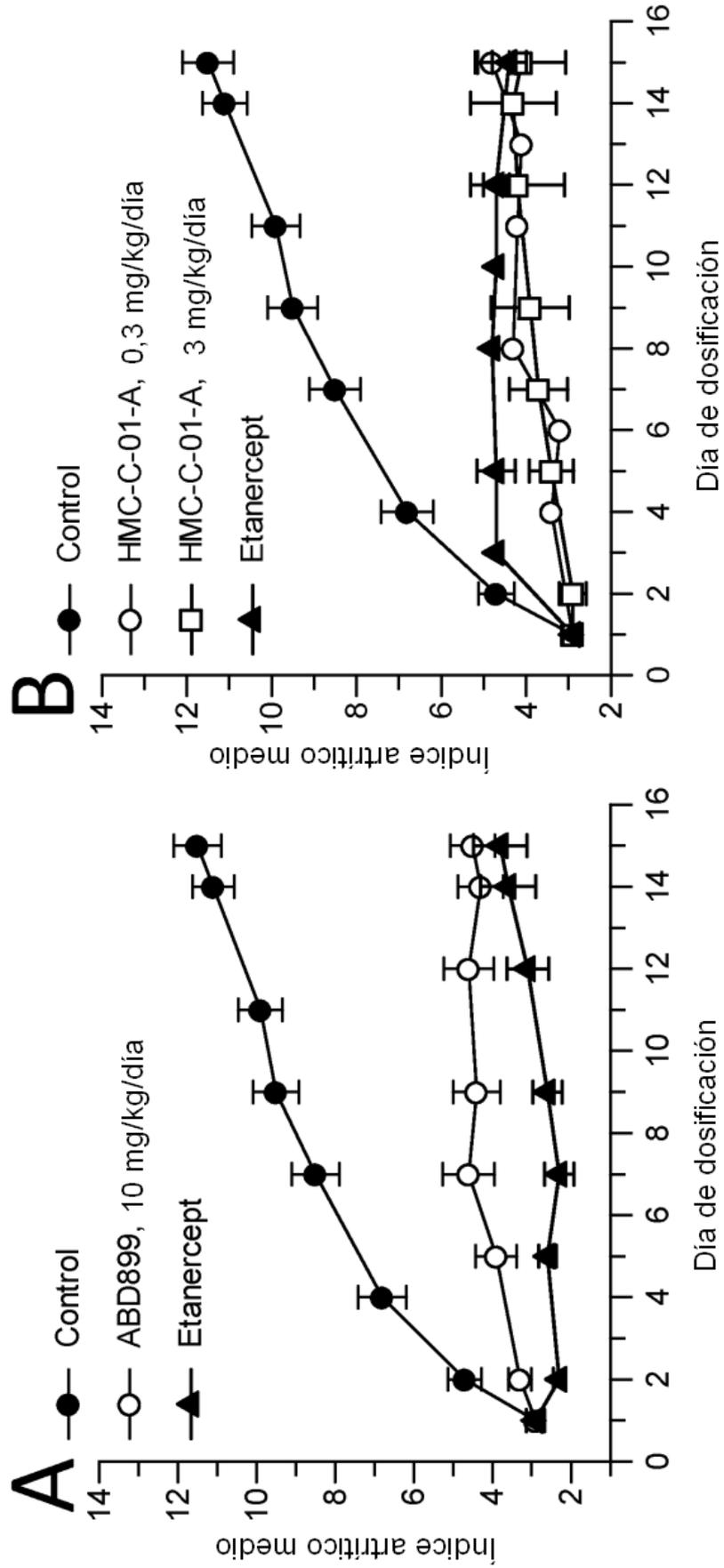


FIGURA 3

