

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 985**

51 Int. Cl.:

A61K 31/541 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2013 PCT/EP2013/061914**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13189771**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2013 E 13727625 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2863950**

54 Título: **Aminotriazolopiridina para su uso en el tratamiento de la inflamación, y composiciones farmacéuticas de la misma**

30 Prioridad:

22.06.2012 US 201261663520 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VAN 'T KLOOSTER, GERBEN ALBERT
 ELEUTHERIUS;
 BRYNS, REGINALD CHRISTOPHE XAVIER;
 VAN ROMPAEY, LUC JULIAAN CORINA y
 NAMOUR, FLORENCE SYLVIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 985 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

Aminotriazolopiridina para su uso en el tratamiento de la inflamación, y composiciones farmacéuticas de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso médico de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I. En particular, la presente invención se refiere a un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones. En particular, el compuesto inhibe JAK, una familia de tirosina quinasas, y más en particular JAK1. La presente invención también
10 proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto y los métodos para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades, que incluyen afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones por medio de la administración de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I.

15 Las quinasas Janus (JAK) son tirosina quinasas citoplasmáticas que transducen la señalización de citoquinas a partir de receptores de membrana para factores de transcripción STAT. Se describen cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Tras la unión de la citoquina a su receptor, los miembros de la familia JAK se auto- y/o trans-fosforilan entre sí, seguido por la fosforilación de los STAT que entonces migran al núcleo para modular la transcripción. La transducción de la señal intracelular JAK-STAT sirve a los interferones, la mayoría de las interleucinas, así como también una variedad de citoquinas y factores endocrinos, tales como EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTF, GM-CSF y PRL (Vainchenker W. *et al.* (2008)).
20

La combinación de modelos genéticos y la investigación de inhibidores de JAK de molécula pequeña revelaron el potencial terapéutico de varios JAK.

25 JAK1 es un objetivo en el área de enfermedades inmuno-inflamatorias. JAK1 se heterodimeriza con las otras JAK para transducir la señalización pro-inflamatoria impulsada por citoquinas. Por lo tanto, la inhibición de JAK1 es de interés para las enfermedades inmuno-inflamatorias con citoquinas asociadas a patologías que utilizan la señalización de JAK1, tales como IL-6, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-23, o IFN γ , así como también para otras enfermedades impulsadas por la transducción de señales mediada por JAK.

30 En los papeles de los miembros de la familia JAK, existe un cierto solapamiento, dado que la mayoría de las vías de señalización implican más de una JAK, sin embargo, para algunos factores de crecimiento tales como la eritropoyetina y la trombopoyetina, solamente JAK2 está implicada.

JAK3 desempeña un papel importante en el bloqueo de la función inmune a través de la transmisión de señales generadas por la interleucina (IL)-2.

35 Por otro lado, TYK2 parecería trabajar en combinación con JAK2 y JAK3 con el fin de transducir la señalización de citoquinas tales como IL-12 y IL-23.

40 El papel de las enzimas JAK se ha estudiado sobre todo por el uso de ratones, donde cada uno de los miembros de la familia JAK ha sido eliminado. Los ratones eliminados por JAK1 exhiben un fenotipo letal perinatal y también tienen un desarrollo y función linfocítica defectuosos como resultado de la señalización defectuosa por citoquinas a través de JAK1. La deficiencia de JAK2 da como resultado la letalidad embrionaria en el día 12 como consecuencia de un fallo en la eritropoyesis definitiva. Los ratones deficientes en JAK3 tienen un fenotipo de inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por su sigla en inglés), pero no tienen defectos no inmunes. (Verstovsek de 2009, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 636 a 642).

45 Como se ha observado con los inhibidores de JAK, la inhibición no selectiva puede estar relacionada con efectos tales como la anemia, una mayor tasa de infecciones, un menor recuento de neutrófilos y linfocitos, una disminución de la hemoglobina, y niveles elevados de colesterol. (Elie Dolgin, 2011, *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 717 a 718).

Por lo tanto, el desarrollo de un inhibidor de JAK selectivo sería beneficioso con el fin de minimizar tales efectos secundarios.

50 El documento WO2010/141796 describe el compuesto de la Fórmula (I) como intermedio para la preparación de inhibidores de JAK.

Antecedentes de la invención

La degeneración del cartílago es el sello distintivo de diversas enfermedades, entre las cuales la artritis reumatoide y la osteoartritis son las más destacadas. La artritis reumatoide (RA, por su sigla en inglés) es una enfermedad degenerativa crónica de las articulaciones, caracterizada por la inflamación y la destrucción de las estructuras

articulares. Cuando la enfermedad no se controla, conduce a la discapacidad y el dolor considerable debido a la pérdida de funcionalidad de las articulaciones e incluso la muerte prematura. El objetivo de la terapia de la RA, por lo tanto, no es sólo frenar la enfermedad, sino alcanzar la remisión con el fin de detener la destrucción de las articulaciones. Además de la gravedad de la evolución de la enfermedad, la alta prevalencia de RA (~ 0,8% de los adultos están afectados en todo el mundo) significa un alto impacto socioeconómico. (Para revisiones sobre la RA, referirse a Smolen y Steiner (2003); Lee y Weinblatt (2001); Choy y Panayi (2001); O'Dell (2004) y Firestein (2003)).

JAK1 está implicada en la transducción de señales intracelulares para muchas citoquinas y hormonas. Las patologías asociadas con cualquiera de estas citoquinas y hormonas se pueden mejorar por los inhibidores de JAK1. Por lo tanto, varios trastornos de alergia, inflamación y autoinmunes que se podrían beneficiar del tratamiento con los compuestos descritos en esta invención incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por su sigla en inglés), fibrosis de tejidos, inflamación eosinofílica, eosofagitis, enfermedades inflamatorias intestinales (por ej., la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, psoriasis, miositis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, y esclerosis múltiple (Kopf *et al.*, 2010).

La psoriasis es una enfermedad que puede afectar a la piel. La causa de la psoriasis no se entiende completamente, sin embargo, se cree que es una enfermedad relacionada y mediada inmune ligada a la liberación de citoquinas, en particular TNF α , lo que provoca la inflamación y la rápida reproducción de las células de la piel. Esta hipótesis ha sido corroborada por la observación de que la medicación inmunosupresora puede despejar las placas de psoriasis (Zenz R., Eferl R., Kenner L., *et al.* (2005). "*Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins*". *Nature* 437 (7057): 369 a 375).

La psoriasis también puede provocar inflamación de las articulaciones, lo que se conoce como artritis psoriásica. Entre el 10 y el 30% de todas las personas con psoriasis también tienen artritis psoriásica (Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) (18 de noviembre de 2004). "*Guideline on Clinical Investigation of Medicinal Products indicated for the treatment of Psoriasis*"). Debido a su carácter recurrente crónico, tratar la psoriasis es un desafío. Recientemente se ha demostrado que la inhibición de JAK podría resultar en la mejora con éxito de la afección psoriásica. (Punwani *et al.*, (2012) "*Preliminary clinical activity of a topical JAK1/2 inhibitor in the treatment of psoriasis*" *J. Am. Acad. Dermatol.*, 67, 4, 658 a 664).

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por su sigla en inglés) es un grupo de afecciones inflamatorias del colon e intestino delgado. Los principales tipos de IBD son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Recientemente, se ha encontrado a través de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por su sigla en inglés) que la proteína tirosina fosfatasa de las células T (TCPTP, por su sigla en inglés) es una fosfatasa receptora de JAK/STAT y el factor de crecimiento que se ha vinculado a la patogénesis de la diabetes tipo 1, artritis reumatoide, y la enfermedad de Crohn por GWAS (Zikherman *et al.*, *J. Clin. Invest. Dic. de 2011*; 121 (12): 4618 a 4621). Por lo tanto, la inhibición de la vía de JAK podría proporcionar una forma de tratamiento de la IBD.

Los miembros de la familia JAK se han implicado en afecciones adicionales, que incluyen trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan *et al.*, 2007, *Mol. Immunol.* 44 (10): 2497 a 506), donde se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular, JAK2 también pueden ser de uso en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. De manera adicional, la familia JAK, en particular JAK1, JAK2 y JAK3, se ha relacionado con cánceres, en particular leucemias, por ej., leucemia mieloide aguda (O'Sullivan *et al.*, 2007, *Mol. Immunol.* 44 (10): 2497 a 506; Xiang *et al.*, 2008, "*Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia*" *Blood First Edition Paper*, publicada previamente en línea del 26 de diciembre de 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) y la leucemia linfoblástica aguda (Mullighan *et al.*, 2009)), linfoma cutáneo de células T (Zhang *et al.*, 1996, *PNAS*, 93, 9148 a 9153) o tumores sólidos, por ej., leiomioma uterino (Constantinescu *et al.*, 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33 (3): 122 a 131), cáncer de próstata (Tarn *et al.*, 2007, *British Journal of Cancer*, 97, 378 a 383) y cáncer de mama (Berishaj *et al.*, 2007, *Breast Cancer Research* 9: R32). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1, pueden también tener utilidad en el tratamiento de cánceres (leucemias y tumores sólidos, por ej., leiomioma uterino, cáncer de próstata).

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

Las terapias actuales no son satisfactorias y por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de identificar compuestos adicionales que pueden ser de uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide.

De manera adicional, estas afecciones son afecciones crónicas que requieren terapia a largo plazo, y la ingesta repetida del fármaco. El tratamiento a largo plazo podría ser una pesada carga para el paciente y el médico por

igual, dado que el paciente puede ser o llegar a ser intolerante al fármaco, y, de manera adicional, la alta dosificación o la alta frecuencia de dosificación puede dar como resultado efectos secundarios incómodos, y/o una baja conformidad del paciente, donde el paciente puede, de manera ocasional, deliberada o accidental, perder una dosis. El impacto de la no adhesión varía a lo largo de las enfermedades crónicas, y oscila de mínimo a muy significativo (Ingersoll *et al.*, 2008 *J. Behav. Med.*; 31(3): 213 a 224).

Por lo tanto, hay una necesidad de identificar más compuestos para reforzar el arsenal del profesional de la salud, y compuestos con régimen de dosificación de baja frecuencia para mejorar la vida de los pacientes.

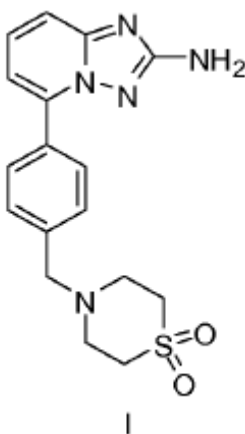
En la búsqueda para descubrir nuevos medicamentos, a menudo se fijan criterios para identificar el mejor candidato adecuado, por lo tanto, muchos compuestos son evaluados rápidamente en un modelo *in vitro*, e igualmente rápidamente se descartan si no cumplen con dichos criterios. Los estudios *in vitro* por lo general tienen un rendimiento más alto que los estudios *in vivo* y son de gran ayuda con el proceso de toma de decisiones. Por lo tanto, por lo general se espera que el modelo *in vitro* sea predictivo del comportamiento *in vivo* del fármaco, y los compuestos que *prima facie* no parecen ofrecer un perfil adecuado *in vitro*, se descartan. En este contexto, cuando se investigó el compuesto de acuerdo con la Fórmula I, mostró un perfil *in vitro* de bajo interés, sin embargo, los estudios *in vivo* revelaron propiedades inesperadas en los seres humanos en particular.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I puede ser útil como un medicamento. En un aspecto particular, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es un inhibidor de JAK, y más en particular JAK1.

También se describen métodos para la producción del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I y métodos para la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular, la artritis reumatoide, por medio de la administración del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de la invención para su uso en medicina que tiene una Fórmula I:



El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, de manera sorprendente, exhibe *in vivo* en los humanos un perfil muy diferente de otras especies animales, lo que contrasta con las predicciones *in vitro*. De hecho, *in vivo* se ha demostrado que, en los humanos, la vida media terminal aparente del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es significativamente más larga que en las otras especies de animales por al menos 3 veces. Esto provoca la acumulación en los humanos, que da como resultado un efecto terapéutico mantenido durante un período prolongado de tiempo, lo cual de este modo permite la dosificación de una vez al día a una vez por semana. De este modo, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I puede proporcionar ventajas que incluyen un régimen de dosificación de baja frecuencia y/o un incremento de la conformidad del paciente. En particular, se podría reducir el impacto de la no adherencia, si el paciente olvida tomar una dosis.

En un aspecto particular, se proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, y un portador, excipiente o diluyente. En un aspecto particular, la composición farmacéutica de manera adicional además puede comprender componentes activos para uso terapéutico adecuados para su uso en combinación con el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I. En un aspecto más particular, el componente activo para uso terapéutico adicional es un compuesto para el tratamiento de la artritis. En un aspecto más particular, el componente activo para uso terapéutico adicional es un compuesto para el tratamiento de la artritis reumatoide.

De manera adicional, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, útil en las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria, es aceptable para uso farmacéutico como se ha preparado y utilizado.

En un aspecto adicional de la invención, esta invención proporciona un compuesto de la Fórmula (I) para su uso en un método de tratamiento de un mamífero, en particular seres humanos, susceptibles de o que sufren de una afección seleccionada entre las enumeradas en la presente memoria, y en especial afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, más en particular, la artritis reumatoide, dicho método comprende la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de la composición farmacéutica o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I como se describe en la presente memoria.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, y un portador, excipiente o diluyente farmacéutico adecuado para su uso en medicina. En un aspecto particular, la composición farmacéutica es para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide.

También se describen métodos para sintetizar el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, con protocolos de síntesis representativos y las vías descritas más adelante en la presente memoria.

Otros objetivos y ventajas serán evidentes para aquéllos con experiencia en la técnica a partir de una consideración de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Muestra la Puntuación Clínica CIA de rata después del tratamiento con los compuestos descritos en la presente memoria.

Figura 2: Muestra la evolución del diámetro del tobillo en el modelo de CIA de rata después del tratamiento con los compuestos descritos en la presente memoria.

Figura 3: Muestra el perfil metabólico *in vitro* del compuesto de acuerdo con la Fórmula II

Figura 4: Muestra la proporción entre la exposición (expresada como AUC) para la Fórmula I:Fórmula II medida en la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula II.

Figura 5: Muestra los valores para los niveles de exposición de los compuestos descritos después de la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula II expresados como un múltiplo del valor de IC₅₀.

Figura 6: Muestra los valores combinados de los niveles de exposición durante un período de 24 h de los compuestos de acuerdo con la Fórmula I y la Fórmula II después de la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula II expresada como múltiplo del valor de IC₅₀.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los siguientes términos están destinados a tener los significados presentados con los mismos a continuación y son útiles en la comprensión de la descripción y alcance pretendido de la presente invención.

Al describir la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos y métodos de uso de tales compuestos y composiciones, los siguientes términos, si están presentes, tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. También se debe entender que cuando se describe en la presente memoria, cualquiera de los restos definidos a continuación puede estar sustituido con una variedad de sustituyentes, y que las definiciones respectivas están destinadas a incluir tales restos sustituidos dentro de su alcance como se establece a continuación. A menos que se indique lo contrario, el término "sustituido" se define como se indica a continuación. Se debe entender además que los términos "grupos" y "radicales" se pueden considerar como intercambiables cuando se utilizan en la presente memoria.

Los artículos “un” y “una” se pueden utilizar en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un análogo” significa un análogo o más de un análogo.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “JAK” se refiere a la familia de quinasas Janus (JAK) que son tirosina quinasas citoplasmáticas que transducen la señalización de citoquinas a partir de receptores de membrana para factores de transcripción STAT. Se describen cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 y el término JAK se puede referir a todos los miembros de la familia JAK de manera colectiva o uno o más de los miembros de la familia JAK como indica el contexto.

10 El término “aceptable para uso farmacéutico” significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o la agencia correspondiente en países distintos de los Estados Unidos, o que se enumeran en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida por lo general para su uso en animales, y más en particular, en seres humanos.

15 El término “sal aceptable para uso farmacéutico” se refiere a una sal del compuesto de acuerdo con la Fórmula I que es aceptable para uso farmacéutico y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. En particular, dichas sales son no tóxicas y pueden ser sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos y sales de adición de base. De manera específica, dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclohexanoico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, 20 ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas 25 cuando un protón ácido presente en el compuesto original se reemplaza por un ion metálico, por ej., un ión de metal alcalino, un ión alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Las sales incluyen de manera adicional, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando el compuesto 30 contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. El término “catión aceptable para uso farmacéutico” se refiere a un contraión catiónico aceptable de un grupo funcional ácido. Tales cationes son ejemplificados por sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, cationes de tetraalquilamonio, y similares.

35 El término “vehículo aceptable para uso farmacéutico” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra el compuesto de acuerdo con la Fórmula I.

40 El término “solvato” se refiere a formas del compuesto que se asocian con un disolvente, por lo general por medio de una reacción de solvólisis. Esta asociación física incluye enlaces de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, etanol, ácido acético y similares. El compuesto de acuerdo con la Fórmula I se puede preparar por ej., en forma cristalina y puede estar solvatado o hidratado. Los solvatos adecuados incluyen solvatos aceptables para uso farmacéutico, tales como hidratos, y además incluyen tanto solvatos estequiométricos como solvatos no estequiométricos. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo, cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. El término “solvato” abarca tanto la fase de solución como solvatos aislables. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

45 El término “sujeto” incluye a los humanos. Los términos “humano”, “paciente” y “sujeto” se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria.

El término “cantidad efectiva para uso terapéutico” significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. La “cantidad efectiva para uso terapéutico” puede variar dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, etc., del sujeto a ser tratado.

50 El término “prevenir” o “prevención” se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, provocar que por lo menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar expuesto a un agente que provoca una enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes de la aparición de la enfermedad).

55 El término “profilaxis” se relaciona con “prevención”, y se refiere a una medida o procedimiento con el propósito que es para evitar que, en lugar de para tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitativos de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular para los pacientes del hospital en riesgo de trombosis, debido, por ejemplo, a la inmovilización; y la administración de un agente anti-malaria, tales como cloroquina, antes de una visita a una región geográfica donde la malaria es

endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

El término “tratar” o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una forma de realización, a una mejora de la enfermedad o trastorno (es decir, el detenimiento de la enfermedad o la reducción de la manifestación, la extensión o gravedad de por lo menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra forma de realización, el término “tratar” o “tratamiento” se refiere a una mejora de por lo menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En aún otra forma de realización, el término “tratar” o “tratamiento” se refiere a la modulación de la enfermedad o el trastorno, ya sea de manera física, (por ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológica, (por ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una forma de realización adicional, el término “tratar” o “tratamiento” se refiere a retrasar la progresión de la enfermedad.

10 Como se utiliza en la presente memoria el término “afección inflamatoria” se refiere al grupo de afecciones que incluyen, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma, rinitis), enfermedades inflamatorias intestinales (por ej., la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ej., complicaciones después de cirugía de bypass o estados de endotoxinas crónicas que contribuyen a, por ej., una insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas que implican cartílago, tales como la de las articulaciones. En particular, el término se refiere a la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y las enfermedades inflamatorias intestinales.

20 Como se utiliza en la presente memoria, el término “enfermedad autoinmune” se refiere al grupo de enfermedades que incluyen enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, que incluyen afecciones tales como COPD, asma (por ej., asma intrínseca, asma extrínseca, asma por polvo, o asma infantil) en particular asma crónica o inveterada (por ej., asma tardía e hiperresponsividad de las vías respiratorias), bronquitis (que incluyen asma bronquial), lupus eritematoso sistémico (SLE, por su sigla en inglés), lupus eritematoso cutáneo (CLE, por su sigla en inglés), esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I y las complicaciones asociadas con la misma, eczema atópico (dermatitis atópica), dermatitis de contacto y además dermatitis eccematosa, enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. En particular, el término se refiere a la COPD, asma, diabetes mellitus tipo I y la enfermedad inflamatoria intestinal.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término “enfermedad proliferativa” se refiere a afecciones tales como cáncer (por ej., leiomiomas uterino o cáncer de próstata), trastornos mieloproliferativos (por ej., policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis), leucemia (por ej., leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda), mieloma múltiple, psoriasis, reestenosis, esclerodermis o fibrosis. En particular, el término se refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término “cáncer” se refiere a un crecimiento maligno o benigno de células en la piel o en los órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, de mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Un cáncer tiende a infiltrarse en el tejido adyacente y a propagarse (metastatizar) a órganos distantes, por ej., al hueso, hígado, pulmón o cerebro. Como se utiliza en la presente memoria, el término cáncer incluye ambos tipos de células tumorales metastásicas, tales como, pero no se limitan a, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y mastocitoma y tipos de carcinoma de tejidos, tales como, pero no se limitan a, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer primario de hígado, cáncer de ovario, cáncer de próstata y leiomiomas uterino.

40 Como se utiliza en la presente memoria el término “leucemia” se refiere a enfermedades neoplásicas de la sangre y los órganos que forman la sangre. Tales enfermedades pueden provocar la disfunción de la médula ósea y el sistema inmunológico, lo que hace que el huésped sea altamente susceptible a la infección y el sangrado. En particular el término leucemia hace referencia a la leucemia mieloide aguda (AML, por su sigla en inglés) y leucemia linfoblástica aguda (ALL, por su sigla en inglés).

Como se utiliza en la presente memoria el término “rechazo de trasplantes” se refiere al rechazo agudo o crónico de las células, tejido u órgano sólido de alo- o xenoinjertos de, por ej., islotes pancreáticos, células madre, médula ósea, piel, músculo, tejido corneal, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago, o enfermedades de injerto contra huésped.

50 Como se utiliza en la presente memoria el término “enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos” incluye afecciones tales como osteoartritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurogénica o neuropática, artropatía, formas endémicas de la artritis deformante como osteoartritis endémica, enfermedad de Meleni y enfermedad de Handigodu; degeneración resultante de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término “malformaciones congénitas del cartílago” incluye afecciones tales como condrolisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria, y trastornos relacionados.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “enfermedad asociada con hipersecreción de IL6” incluye afecciones tales como la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferativa mesangial.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “enfermedad asociada con hipersecreción de interferones” incluye afecciones tales como lupus eritematoso sistémico y cutáneo, lupus nefritis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, psoriasis, artritis reumatoide.

10 El término “compuesto de la invención” y expresiones equivalentes, pretenden incluir el compuesto de acuerdo con la Fórmula I o Fórmula II (como dicte el contexto) como se ha descrito con anterioridad, dicha expresión incluye las sales aceptables para uso farmacéutico, y los solvatos, por ej., hidratos, y los solvatos de las sales aceptables para uso farmacéutico, donde el contexto lo permita. Del mismo modo, la referencia a intermedios, estén o no ellos mismos reivindicados, pretende abarcar sus sales, y solvatos, donde el contexto lo permita.

15 Otros derivados del compuesto de la invención tienen actividad tanto en sus formas de ácidos y derivadas de ácidos, pero en la forma sensible a ácidos a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con tejidos o liberación retardada en el organismo de mamíferos (véase, Bundgard, H., *Design of Prodrugs*, págs. 7 a 9, 21 a 24, Elsevier, Amsterdam 1985).

20 Como se utiliza en la presente memoria, el término “variante isotópica” se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, una “variante isotópica” de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos, tales como, por ejemplo, deuterio (^2H o D), carbono-13 (^{13}C), nitrógeno-15 (^{15}N), o similares. Se entenderá que, en un compuesto en el que se hace dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando están presentes, pueden variar, de manera tal que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser $^2\text{H}/\text{D}$, cualquier carbono puede ser ^{13}C , o cualquier nitrógeno puede ser ^{15}N , y que la presencia y la colocación de tales átomos se pueden determinar dentro de la experiencia de la técnica. Del mismo modo, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, en el caso, por ejemplo, donde los compuestos resultantes se pueden utilizar para estudios de distribución tisular de sustrato y/o fármacos. Los isótopos radiactivos de tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son en particular útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios rápidos de detección. De manera adicional, se pueden preparar compuestos que están sustituidos con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , y sería útil en estudios de Tomografía de Emisión de Positrones (PET, por su sigla) para examinar la ocupación del receptor del sustrato.

30 Todas las variantes isotópicas del compuesto proporcionado en la presente memoria, sean radiactivas o no, están destinadas a ser abarcadas dentro del alcance de la invención.

35 El término “tautómeros” se refiere a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto en particular, y que varían en el desplazamiento de átomos de hidrógeno y electrones. De este modo, dos estructuras pueden estar en equilibrio a través del movimiento de π electrones y un átomo (por lo general H). Por ejemplo, los enoles y cetonas son tautómeros debido a que se interconvierten rápidamente por medio de un tratamiento con ácido o base. Otro ejemplo de tautomería es las formas aci- y nitro- de fenilnitrometano, que están igualmente formados por tratamiento con ácido o base.

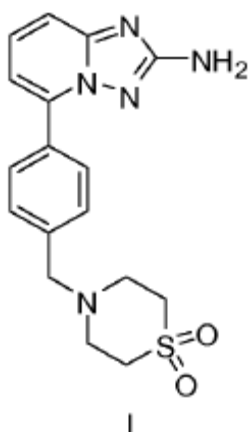
Las formas tautoméricas pueden ser relevantes para la consecución de la reactividad química óptima y la actividad biológica de un compuesto de interés.

40 **La invención**

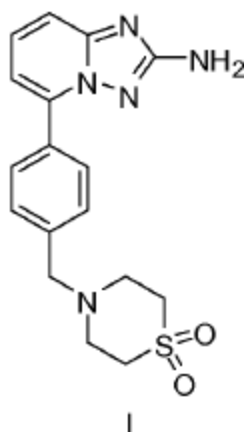
La presente invención se basa en el descubrimiento de que el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I puede ser útil como un medicamento. En un aspecto particular, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es un inhibidor de JAK, y más en particular JAK1.

45 También se describen métodos para la producción del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I y métodos para la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular, la artritis reumatoide, por medio de la administración del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I.

50 Por consiguiente, en una primera forma de realización de la invención, se proporciona un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en medicina que tiene una Fórmula I:



En otra forma de realización de la invención, se proporciona un compuesto de la invención, que es un inhibidor de JAK, para su uso en medicina que tiene una Fórmula I:



- 5 El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, de manera sorprendente, exhibe *in vivo* en los humanos un perfil muy diferente de otras especies animales, lo que contrasta con las predicciones *in vitro*. De hecho, *in vivo*, se ha demostrado que en los seres humanos, la vida media terminal aparente del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es significativamente más larga que en las otras especies de animales por al menos 3 veces. Esto provoca la acumulación en los seres humanos que resulta en un efecto terapéutico mantenido durante
- 10 un período prolongado de tiempo, lo cual de este modo permite la dosificación de una vez al día a una vez por semana. De este modo, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I puede proporcionar ventajas que incluyen un régimen de dosificación de baja frecuencia y/o el incremento de la conformidad del paciente. En particular, se podría reducir el impacto de la no adherencia, si el paciente olvida tomar una dosis.

En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I no es una variante isotópica.

- 15 En un aspecto, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I está presente como la base libre.

En un aspecto, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es una sal aceptable para uso farmacéutico.

En un aspecto, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es un solvato del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I.

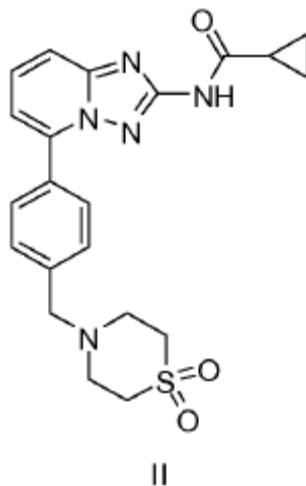
- 20 En un aspecto, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es un solvato de una sal aceptable para uso farmacéutico de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I.

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es un inhibidor de JAK. En particular, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es un potente inhibidor de la JAK1, sin embargo, puede inhibir la JAK2, JAK3 y TYK2 con una potencia inferior.

- 25 En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, y un portador, excipiente o diluyente.

En aún una forma de realización adicional, la composición farmacéutica además comprende un agente terapéutico

adicional. En un aspecto particular, el otro compuesto es un compuesto para el tratamiento de la artritis. En un aspecto más particular, el otro compuesto es un compuesto para el tratamiento de la artritis reumatoide. En una forma de realización más particular, el agente terapéutico adicional es un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II:



5

Composiciones farmacéuticas

Quando se emplea como un producto farmacéutico, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se administra de manera típica en forma de una composición farmacéutica. Tales composiciones se pueden preparar de una manera muy conocida en la técnica farmacéutica y comprenden por lo menos un compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I. Por lo general, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se administra en una cantidad efectiva para uso farmacéutico. La cantidad del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I administrada de hecho será determinada de manera típica por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado de la invención de acuerdo con la Fórmula I, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

15

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por una variedad de vías que incluyen oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, intravenosa, intramuscular, e intranasal. Dependiendo de la vía de administración prevista, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I de esta invención se formula preferiblemente en forma de composiciones, ya sea orales o inyectables o como pomadas, como lociones o como parches todo para la administración transdérmica.

20

Las composiciones para administración oral pueden tomar la forma de soluciones líquidas a granel o suspensiones, o polvos a granel. Más comúnmente, sin embargo, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitarias para facilitar la dosificación exacta. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente, vehículo o portador farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas, o jeringas previamente llenadas de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas previamente medidas. En tales composiciones, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es por lo general un componente minoritario (de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso o preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 40% en peso) siendo el resto varios vehículos o portadores y ayudas de procesamiento útiles para formar la forma de dosificación deseada.

25

30

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

35

Las composiciones inyectables de manera típica se basan en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros portadores inyectables conocidos en la técnica. Como antes, el compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I en tales composiciones de manera típica es un componente minoritario, a menudo es de aproximadamente 0,05 a 10% en peso, donde el resto es el portador inyectable y similares.

40

Las composiciones transdérmicas de manera típica se formulan como una pomada o crema tópica que contiene los componentes activos, por lo general en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15% en peso. Cuando se formulan como una pomada, los componentes activos de manera típica se combinarán con una base de pomada parafínica o miscible en agua. De manera alternativa, los componentes activos se pueden formular en una crema con, por ejemplo, una base cremosa de aceite en agua. Tales formulaciones transdérmicas son muy conocidas en la técnica y por lo general incluyen componentes adicionales para mejorar la penetración dérmica de la estabilidad de los componentes activos o la formulación. Todas estas formulaciones y componentes transdérmicos conocidos están incluidos dentro del alcance de esta invención.

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I también se puede administrar por medio de un dispositivo transdérmico. En consecuencia, la administración transdérmica se puede conseguir por el uso de un parche ya sea del depósito o tipo de membrana porosa, o de una variedad de matriz sólida.

Los componentes descritos con anterioridad para composiciones administrables por vía oral, inyectables o administrables por vía tópica son meramente representativos. Otros materiales, así como también técnicas de procesamiento y similares se exponen en la Parte 8 de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I también se puede administrar en formas de liberación sostenida o desde sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. Una descripción de materiales de liberación sostenida representativos se puede encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas que se pueden preparar de acuerdo con esta invención.

Formulación 1 – Comprimidos

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seca en una proporción en peso aproximada de 1:2. Una cantidad menor de estearato de magnesio se puede añadir como un lubricante. La mezcla se puede conformar en comprimidos de 240 a 270 mg (80 a 90 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I por comprimido) en una prensa de comprimidos.

Formulación 2 – Cápsulas

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un diluyente de almidón en una proporción en peso aproximada de 1:1. La mezcla se puede cargar en cápsulas de 250 mg (125 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I por cápsula).

Formulación 3 – Líquido

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I (125 mg), se puede mezclar con sacarosa (1,75 g) y goma de xantano (4 mg) y la mezcla resultante se puede mezclar, pasarse a través de un tamiz U.S. de malla Núm. 10, y luego mezclarse con una solución previamente preparada de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio (11:89, 50 mg) en agua. El benzoato de sodio (10 mg), el saborizante, y el colorante se pueden diluir con agua y añadirse con agitación. Luego se puede añadir suficiente agua con agitación. Finalmente se puede añadir además agua suficiente para producir un volumen total de 5 ml.

Formulación 4 – Comprimidos

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seca en una proporción en peso aproximada de 1:2. Una cantidad menor de estearato de magnesio se puede añadir como un lubricante. La mezcla se puede conformar en comprimidos de 450 a 900 mg (150 a 300 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I) en una prensa de comprimidos.

Formulación 5 – Inyección

El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede disolver o suspender en un medio de solución salina estéril tamponada inyectable acuosa a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml.

Formulación 6 – Tópica

Se pueden fundir alcohol estearílico (250 g) y un petrolato blanco (250 g) a aproximadamente 75 °C y luego se pueden añadir una mezcla del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I (50 g), metilparabeno (0,25 g), propilparabeno (0,15 g), lauril sulfato de sodio (10 g), y propilenglicol (120 g) disuelto en agua (aproximadamente 370 g) y la mezcla resultante se puede agitar hasta que se congela.

Métodos de tratamiento

- 5 En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en medicina. En una forma de realización particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide.
- 10 En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide.
- 15 En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, y otro agente terapéutico. En una forma de realización particular, el otro agente terapéutico es un agente de tratamiento de la artritis. En una forma de realización más particular, el otro agente terapéutico es un agente de tratamiento de la artritis reumatoide. En una forma de realización más particular, el otro agente terapéutico es el compuesto de acuerdo con la Fórmula II.
- 20 Esta invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero susceptible a, o aquejado de una afección inflamatoria, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una o más de las composiciones farmacéuticas en la presente memoria descritas para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y las enfermedades inflamatorias intestinales (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).
- 25 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección inflamatoria. En una forma de realización específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y las enfermedades inflamatorias intestinales.
- 30 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una afección inflamatoria. En una forma de realización específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y las enfermedades inflamatorias intestinales (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).
- 35 Esta invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible a, o aquejado de una reacción alérgica, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, sinusitis, eczema y/o urticaria, alergias a los alimentos o alergias al veneno de los insectos.
- 40 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una reacción alérgica. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, sinusitis, eczema y/o urticaria, alergias a los alimentos o alergias al veneno de los insectos.
- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una reacción alérgica. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, sinusitis, eczema y/o urticaria, alergias a los alimentos o alergias al veneno de los insectos.
- 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una reacción alérgica. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, sinusitis, eczema y/o urticaria, alergias a los alimentos o alergias al veneno de los insectos.
- 55 La invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible de padecer o que padece una enfermedad autoinmune, dichos métodos comprenden la

- 5 administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona de artritis reumatoide, COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, y la enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa). En una forma de realización más específica, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico. En aún otra forma de realización más específica, la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide o artritis psoriásica. En aún una forma de realización específica adicional, la enfermedad autoinmune es la enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).
- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad autoinmune. En una forma de realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona de artritis reumatoide, COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, y la enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).
- 15 En una forma de realización más específica, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico. En aún otra forma de realización más específica, la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide o artritis psoriásica. En aún una forma de realización específica adicional, la enfermedad autoinmune es la enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa)
- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad autoinmune. En una forma de realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona de artritis reumatoide, COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, y la enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).
- 25 En una forma de realización más específica, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico. En aún otra forma de realización más específica, la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide o artritis psoriásica. En aún una forma de realización específica adicional, la enfermedad autoinmune es la enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa)
- 30 La invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible a, o aquejado de una enfermedad proliferativa, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la enfermedad proliferativa es cáncer (por ej., tumores sólidos tales como leiomiomasarcoma uterino o cáncer de próstata), linfoma cutáneo de células T, cáncer de mama, leucemia (por ej., AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y/o psoriasis.
- 35 En una forma de realización más específica, la enfermedad proliferativa es psoriasis.
- 40 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad proliferativa. En una forma de realización específica, la enfermedad proliferativa es cáncer (por ej., tumores sólidos tales como leiomiomasarcoma uterino o cáncer de próstata), linfoma cutáneo de células T, cáncer de mama, leucemia (por ej., AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y/o psoriasis. En una forma de realización más específica, la enfermedad proliferativa es psoriasis.
- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad proliferativa. En una forma de realización específica, la enfermedad proliferativa es cáncer (por ej., tumores sólidos tales como leiomiomasarcoma uterino o cáncer de próstata), linfoma cutáneo de células T, cáncer de mama, leucemia (por ej., AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y/o psoriasis. En una forma de realización más específica, la enfermedad proliferativa es psoriasis.
- 50 La invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible a, o aquejado de rechazo de trasplantes, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis del rechazo de trasplantes de órganos.
- 55 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento o la profilaxis del rechazo de trasplantes. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis del rechazo de trasplantes de órganos.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del rechazo de trasplantes. En una forma de realización específica, la invención proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis del rechazo de trasplantes de órganos.
- 10 La invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible a, o aquejado de enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dichas afecciones.
- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que implican deterioro del recambio de cartílagos.
- 20 La presente invención también proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de malformaciones congénitas del cartilago, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección.
- 25 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento o la profilaxis de las malformaciones congénitas del cartilago.
- 30 La invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible a, o aquejado de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6, se selecciona de la enfermedad de Castleman y la glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- 35 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En una forma de realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6, se selecciona de la enfermedad de Castleman y la glomerulonefritis proliferativa mesangial.
- 40 La invención además proporciona el compuesto de la Fórmula (I) para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de un mamífero susceptible a, o aquejado de enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones, dichos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico de una o más de las composiciones farmacéuticas o el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I descritos en la presente memoria para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una forma de realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones, se selecciona de entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, lupus nefritis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, psoriasis, y artritis reumatoide.
- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones. En una forma de realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones, se selecciona de entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, lupus nefritis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, psoriasis, y artritis reumatoide.
- 50 Un régimen particular comprende la administración a un sujeto que sufre de una enfermedad que implica una inflamación, en particular la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y/o enfermedades inflamatorias intestinales, de una cantidad efectiva para uso terapéutico del compuesto de la invención de acuerdo con Fórmula I por un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación en el sujeto, y preferiblemente terminar los procesos responsables de dicha inflamación. Una forma de realización especial comprende la administración de una cantidad efectiva para uso terapéutico del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I a un paciente sujeto que sufre de o es susceptible al desarrollo de artritis reumatoide, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la inflamación en las articulaciones de dicho paciente, y preferiblemente terminar los procesos responsables de dicha inflamación.
- 55 Un régimen particular adicional comprende la administración a un sujeto que sufre de una enfermedad o afección caracterizada por la degradación de los cartílagos o las articulaciones (por ej., la artritis reumatoide y/o la osteoartritis) de una cantidad efectiva para uso terapéutico del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I por un período de tiempo suficiente para reducir y preferiblemente terminar los procesos que se autoperpetúan responsables de dicha degradación. Una forma de realización particular comprende la administración de una

cantidad efectiva para uso terapéutico del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I a un paciente sujeto que sufre de o es susceptible al desarrollo de la osteoartritis, por un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación del cartílago en las articulaciones de dicho paciente, y preferiblemente terminar los procesos de auto-perpetuación responsables de la degradación. En una forma de realización particular, dicho compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I puede exhibir propiedades anabólicas y/o anticatabólicas del cartílago.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide, en el que el compuesto se administra de una a cuatro (1 a 4) dosis regulares diarias y en especial de una a tres (1 a 3) dosis regulares diarias, de manera típica de una a dos (1 a 2) dosis regulares diarias, y de manera más típica una (1) dosis regular diaria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide, en el que el compuesto se administra de una a trece (1 a 13) dosis regulares en un período de dos semanas. En una forma de realización específica, el compuesto de acuerdo con la Fórmula I se administra de una a doce (1 a 12), de una a diez (1 a 10) o de dos a siete (2 a 7) dosis regulares en un período de dos semanas. En una forma de realización específica, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se administra en una base de una vez por semana.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide, en el que el compuesto se administra de una a trece (1 a 13) dosis regulares en un período de dos semanas. En una forma de realización específica, el compuesto de acuerdo con la Fórmula II se administra de una a doce (1 a 12), de una a diez (1 a 10) o de dos a siete (2 a 7) dosis regulares en un período de dos semanas. En una forma de realización específica, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II se administra en una base de una vez por semana.

En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona una combinación de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I y un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide, en el que el compuesto se administra de una a cuatro (1 a 4) dosis regulares diarias y en especial de una a tres (1 a 3) dosis regulares diarias, de manera típica de una a dos (1 a 2) dosis regulares diarias, y de manera más típica una (1) dosis regular diaria.

En aún un otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una combinación de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I y un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones, en particular la artritis reumatoide, en el que el compuesto se administra de una a trece (1 a 13) dosis regulares en un período de dos semanas. En una forma de realización específica, una combinación de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I y un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II se administra de una a doce (1 a 12), de una a diez (1 a 10) o de dos a siete (2 a 7) dosis regulares en un período de dos semanas. En una forma de realización específica, una combinación de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I y un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II se administra en una base de una vez por semana.

Los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 0,1 mg/kg/h a por lo menos 10 mg/kg/h, todo de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 h y, en especial, de 24 a 96 h. Un bolo de precarga de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más también se puede administrar para lograr niveles adecuados de estado estacionario. No se espera que la dosis total máxima exceda de aproximadamente 1 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

Para la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones a largo plazo, tales como las afecciones degenerativas, el régimen de tratamiento por lo general se extiende a lo largo de muchos meses o años, por lo que se prefiere la dosificación oral para la conveniencia y la tolerancia del paciente. Con la dosificación oral, de una a cuatro (1 a 4) dosis regulares diarias, en especial de una a tres (1 a 3) dosis regular diarias, de manera típica de una a dos (1 a 2) dosis regulares diarias, y de manera más típica una (1) dosis regular diaria son regímenes representativos. De manera alternativa,

para fármacos de efecto duradero, con una dosificación oral, una vez cada dos semanas, una vez por semana, y una vez al día son regímenes representativos. En particular, el régimen de dosificación puede ser cada 1 a 14 días, más en particular 1 a 10 días, incluso más en particular 1 a 7 días, y lo más en particular 1 a 3 días.

5 Por el uso de estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, cada una de las dosis particulares proporciona de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg y en especial de aproximadamente 30 a aproximadamente 250 mg.

10 Por el uso de estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula II, cada una de las dosis particulares proporciona de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg y en especial de aproximadamente 30 a aproximadamente 250 mg.

Las dosis transdérmicas por lo general se seleccionan para proporcionar niveles en sangre similares o menores que se consiguen por el uso de dosis de inyección.

15 Cuando se utiliza para prevenir la aparición de una afección, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede administrar a un paciente en riesgo de desarrollar la afección, de manera típica ante el consejo y bajo la supervisión de un médico, en los niveles de dosificación descritos con anterioridad. Los pacientes con riesgo de desarrollar una afección particular incluyen por lo general aquellas que tienen antecedentes familiares de la enfermedad, o aquellos que han sido identificados por análisis o barrido genético que son en particular susceptibles a desarrollar la afección.

20 El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede administrar como el único agente activo o se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, que incluyen otro compuesto de los inventos que demuestran la misma o una actividad terapéutica similar y que están determinados como seguros y eficaces para tal administración combinada. En una forma de realización específica, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite que se utilice una dosis significativamente más baja de cada uno, lo cual de este modo reduce los efectos secundarios observados.

25 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se administra como un medicamento. En una forma de realización específica, dicha composición farmacéutica además comprende un componente activo adicional.

30 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad que implica la inflamación, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunorreguladores, por ej., azatioprina, corticosteroides (por ej., prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato de mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3, por ej., Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.

35 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de la artritis (por ej., artritis reumatoide), los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS, por su sigla en inglés), esteroides, DMARDS sintéticos (por ejemplo, pero sin limitación, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofina, aurotiomalato de sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina, tofacitinib, baricitinib, fostamatinib, y ciclosporina), y DMARDS biológicos (por ejemplo, pero sin limitación, Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab, y Abatacept).

45 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos proliferativos, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: metotrexato, leucovorina, adriamicina, prednisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ej., Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ej., Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (por ej., Avastin™) inhibidores de proteasoma (por ej., Velcade™) Glivec® y los inhibidores de hsp90 (por ej., 17-AAG). De manera adicional, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede administrar en combinación con otras terapias, que incluyen, pero no se limitan a, la radioterapia o cirugía. En una forma de realización específica, el trastorno proliferativo se selecciona de cáncer, enfermedad mieloproliferativa o leucemia.

55 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunes, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: glucocorticoides, agentes citostáticos (por ej., análogos de purina), agentes alquilantes (por ej., mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuesto de platino de las invenciones, y otros), antimetabolitos (por ej., metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ej., dactinomicina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ej., anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OKT3) anticuerpos monoclonales, Atgam® y Timoglobulina®), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones

(por ej., IFN- β), proteínas de unión TNF (por ej., infliximab, etanercept, o adalimumab), micofenolato, Fingolimod y Miriocina.

5 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis del rechazo de trasplantes, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de la calcineurina (por ej., ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (por ej., sirolimus, everolimus), antiproliferativos (por ej., azatioprina, ácido micofenólico), corticosteroides (por ej., prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ej., anticuerpos monoclonales receptores de anti-IL-2R α , basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-células-T (por ej., globulina anti-timocitos (ATG, por su sigla en inglés), globulina anti-linfocitos (ALG, por su sigla en inglés)).

10 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de asma y/o rinitis y/o COPD, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: agonistas de los receptores beta2-adrenérgicos (por ej., salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhalaado o en comprimidos), anticolinérgicos (por ej., bromuro de ipratropio), glucocorticoides (orales o inhalados), β 2-agonistas de acción prolongada (por ej., salmeterol, formoterol, bambuterol, y albuterol oral de liberación sostenida), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ej., fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrieno e inhibidores de la síntesis (por ej., montelukast, zafirlukast y zileuton), inhibidores de la liberación de mediadores (por ej., cromoglicato y ketotifeno), reguladores biológicos de la respuesta de IgE (por ej., omalizumab), antihistamínicos (por ej., ceterizina, cinarizina, fexofenadina) y vasoconstrictores (por ej., oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

20 De manera adicional, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede administrar en combinación con terapias de emergencia para el asma y/o COPD, tales terapias incluyen la administración de oxígeno o heliox, salbutamol o terbutalina nebulizados (de manera opcional combinados con un anticolinérgico (por ej., ipratropio), esteroides sistémicos (orales o intravenosos, por ej., prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona o hidrocortisona), salbutamol intravenoso, beta-agonistas no específicos, inyectados o inhalados (por ej., epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol), anticolinérgicos (IV o nebulizado, por ej., glicopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina, bamifilina), anestésicos de inhalación que tienen un efecto broncodilatador (por ej., isoflurano, halotano, enflurano), ketamina y sulfato de magnesio intravenoso.

25 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: glucocorticoides (por ej., prednisona, budesonida), agentes inmunomoduladores modificadores sintéticos de la enfermedad, (por ej., metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores modificadores biológicos de la enfermedad (infliximab, adalimumab, rituximab, y abatacept).

30 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de SLE, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por su sigla en inglés), tales como antipalúdicos (por ej., plaquenil, hidroxiclороquina), inmunosupresores (por ej., metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico; medicamentos y analgésicos inmunosupresores, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroides, opiáceos (por ej., dextropropoxifeno y co-codamol), opioides (por ej., hidrocodona, oxicodona, MS Contin, o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo Duragesic®.

35 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de la psoriasis, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: tratamientos tópicos, tales como soluciones de baño, cremas hidratantes, cremas medicadas y ungüentos que contienen alquitrán de hulla, ditranol (antralina), corticosteroides como desoximetasona (Topicort™) fluocinonida, análogos de la vitamina D3 (por ej., calcipotriol), aceite de argán y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxurea, sulfasalazina, micofenolato de mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o biológicos tales como Amevive™ Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ y ustekinumab (un bloqueador de IL-12 y IL-23). De manera adicional, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede administrar en combinación con otras terapias que incluyen, pero sin limitación, fototerapia o fotoquimioterapia (por ej., fototerapia con psoraleno y ultravioleta A (PUVA)).

40 En una forma de realización, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de una reacción alérgica, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: antihistamínicos (por ej., cetirizina, difenhidramina, fexofenadina, levocetirizina), glucocorticoides (por ej., prednisona, betametasona, beclometasona, dexametasona), epinefrina, teofilina o anti-leucotrienos (por ej., montelukast o zafirlukast), anticolinérgicos y descongestionantes.

45 Por medio del término “coadministración” se incluye cualquier medio de administración de dos o más agentes terapéuticos para el paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para aquéllos con

experiencia. Si bien los dos o más agentes se pueden administrar de manera simultánea en una única formulación, es decir, como una sola composición farmacéutica, esto no es esencial. Los agentes se pueden administrar en diferentes formulaciones y en diferentes momentos.

- 5 En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, y el compuesto de acuerdo con la Fórmula II, en la que la proporción del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I/Fórmula II es de 1/5 a 1/20. En una forma de realización particular, la proporción es de 1/5 a 1/10.

Procedimientos sintéticos generales

General

- 10 El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede preparar a partir de materiales de partida disponibles con facilidad por el uso de los siguientes métodos y procedimientos generales. Se apreciará que donde se presentan condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), otras condiciones del proceso también se pueden utilizar a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o
15 disolventes particulares utilizados, pero tales condiciones pueden ser determinadas por aquéllos con experiencia en la técnica por medio de procedimientos de optimización de rutina.

- De manera adicional, como será evidente para aquéllos con experiencia en la técnica, algunos grupos protectores convencionales pueden ser necesarios para evitar que ciertos grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, así como también las
20 condiciones adecuadas para la protección y la desprotección son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, numerosos grupos protectores, y su introducción y eliminación, se describen en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Segunda Edición, Wiley, Nueva York, 1991, y las referencias citadas en el mismo.

- Los siguientes métodos son presentados con detalles en cuanto a la preparación del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I como se define en la presente memoria con anterioridad, y los ejemplos comparativos. El compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede preparar a partir de materiales y reactivos de
25 partida conocidos o disponibles en el comercio por aquéllos con experiencia en la técnica de la síntesis orgánica.

- Todos los reactivos fueron de calidad comercial y se utilizaron como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron disolventes anhidros disponibles comercialmente para las reacciones
30 llevadas a cabo bajo atmósfera inerte. Se utilizaron disolventes de grado reactivo en todos los demás casos, a menos que se especifique lo contrario. La cromatografía en columna se llevó a cabo sobre gel de sílice 60 (de 35 a 70 μM). La cromatografía en capa fina se llevó a cabo por el uso de placas de gel de sílice F-254 pre-recubiertas (espesor 0,25 mm). Los espectros de RMN de ^1H se registraron en un espectrómetro de 400 RMN Bruker DPX (400 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) para los espectros de RMN de ^1H se informan en partes por millón (ppm) a tetrametilsilano (δ 0,00) o el pico apropiado residual de disolvente, es decir, CHCl_3 (δ 7,27), como referencia interna. Las multiplicidades se dan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), multiplete (m) y ancho (br). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Los espectros de electropulverización MS se obtuvieron en un
35 espectrómetro LC/MS Micromass Platform. Columnas utilizadas para el análisis de LSMS: Hichrom, Kromasil Eternity, 2,5 μm C_{18} , 150 x 4,6 mm, Waters Xbridge 5 μm C_{18} (2), 250 x 4,6 mm (ref. 86003117), Waters Xterra MS 5 μm C_{18} , 100 x 4,6 mm (Plus cartucho de guardia) (ref. 186000486), Gemini-NX 3 μm C_{18} 100 x 3,0 mm (ref. 00D-4453-Y0), Phenomenex Luna 5 μm C_{18} (2), 100 x 4,6 mm. (Plus cartucho de guardia) (ref. 00D-4252-E0), núcleo fusionado de Kinetix 2,7 μm C_{18} 100 x 4,6 mm (ref. 00D-4462-E0), Supelco, Ascentis® Express C_{18} (ref. 53829-U), o Hichrom Halo C_{18} , 2,7 μm C_{18} , 150 x 4,6 mm (ref. 92814-702). LC-MS se registraron en un Waters Micromass ZQ acoplado a un HPLC Waters 2795 equipado con un detector de UV Waters 2996. LC también se ejecutaron en un
40 HPLC Agilent 1100 acoplado a un detector UV Agilent G1315A. HPLC preparativa: Waters XBridge Prep. C_{18} 5 μm ODB ID 19 mm x 100 mm L (Parte Núm. 186002978). Todos los métodos utilizan gradientes de MeCN/ H_2O . El H_2O contiene ya sea 0,1% de TFA o 0,1% de NH_3 .

Lista de abreviaturas utilizadas en la sección experimental:

AUC	Área Bajo la Curva	ppm	Partes por millón
APC	Poliposis Adenomatosa Coli	EtOAc	acetato de etilo
DCM	Diclorometano	Rt	Tiempo de retención
DiPEA	N,N-diisopropiletilamina	S	Singlete

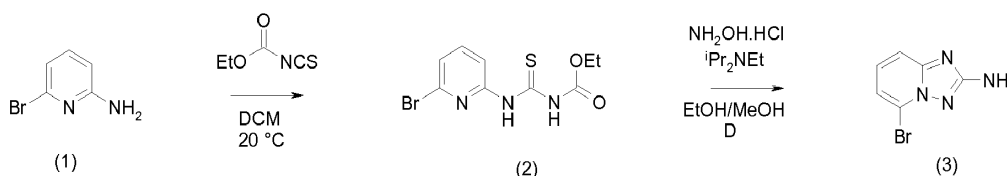
MeCN	Acetonitrilo	br s	Singlete ancho
DMF	N,N-dimetilformamida	M	multiplete
Cat.	Cantidad Catalítica	min	minuto
TFA	Ácido trifluoroacético	ml	Mililitro
THF	Tetrahidrofurano	µL	Microlitro
NMR	Resonancia Magnética Nuclear	g	Gramo
DMSO	Dimetilsulfóxido	mg	miligramo
LC-MS	Cromatografía Líquida- Espectrometría de Masa	PdCl ₂ dppf	[1,1'-Bis(difenilfosfina)ferroceno] dicloropaladio (II)
MMP	Metaloproteinasa de Matriz	QD	<i>Quaque Die</i> (dosificación una vez al día)
RNA	Ácido ribonucleico	BID	<i>Bis en Die</i> (dos veces al día)
APMA	4-aminofenilmercúrico de etilo	Rel.	Relativo
FBS	Suero bovino fetal	HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
cDNA	ácido desoxirribonucleico copiado	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Hora	mmol	milimoles

Preparación sintética del compuesto de la invención

Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos

1. 1. Ruta 1

5 1.1.1. Síntesis de 5-bromo-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-ilamina (Intermedio 3)



1.1.1.1. 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (2)

Se añadió isotiocianato de etoxicarbonilo (173,0 ml, 1,467 mol) a una solución de 2-amino-6-bromopiridina (**1**) (253,8 g, 1,467 mol) en DCM (2,5 L) enfriada a 5 °C gota a gota durante 15 min. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente (20 °C) y se agitó durante 16 h. La evaporación *in vacuo* dio un sólido que se recogió por medio de filtración, se lavó a fondo con gasolina (3x600 ml) y se secó al aire para dar (**2**). La tiourea se utilizó como tal en el siguiente paso sin purificación alguna.

¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12,03 (1H, br s, NH), 8,81 (1H, d, *J* 7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, t, *J* 8,0 Hz, H-4), 7,32 (1H, dd, *J* 7,7 y 0,6 Hz, H-5), 4,31 (2H, q, *J* 7,1 Hz, CH₂), 1,35 (3H, t, *J* 7,1 Hz, CH₃).

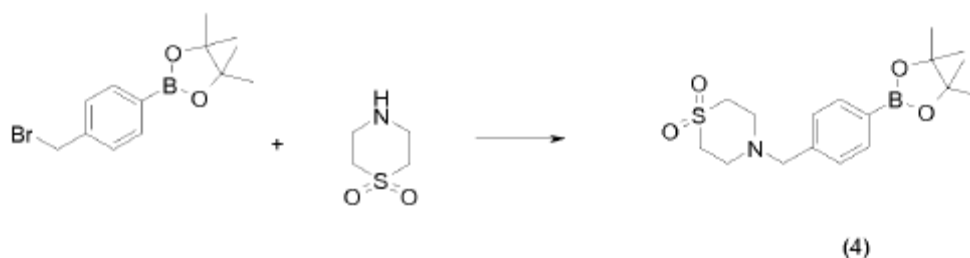
15 1.1.1.2. 5-bromo-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-ilamina (3)

Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (145,3 ml, 0,879 mol) a una suspensión de clorhidrato de hidroxilamina (101,8 g, 1,465 mol) en EtOH/MeOH (1:1, 900 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (20 °C) durante 1 hora. Después, se añadió 1-(6-bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (**2**) (89,0 g, 0,293 mol) y la mezcla se calentó lentamente a reflujo (Nota: se requirió un depurador blanqueador para templar el H₂S evolucionado). Después de 3 h a reflujo, la mezcla se dejó enfriar y se filtró para recoger el sólido precipitado. Se recogió producto adicional por

medio de la evaporación *in vacuo* del filtrado, la adición de H₂O (250 ml) y la filtración. Los sólidos combinados se lavaron sucesivamente con H₂O (250 ml), EtOH/MeOH (1:1, 250 ml) y Et₂O (250 ml), después se secó *in vacuo* para dar el derivado triazolopiridina (**3**) como un sólido. El compuesto se utilizó como tal en el siguiente paso sin purificación alguna.

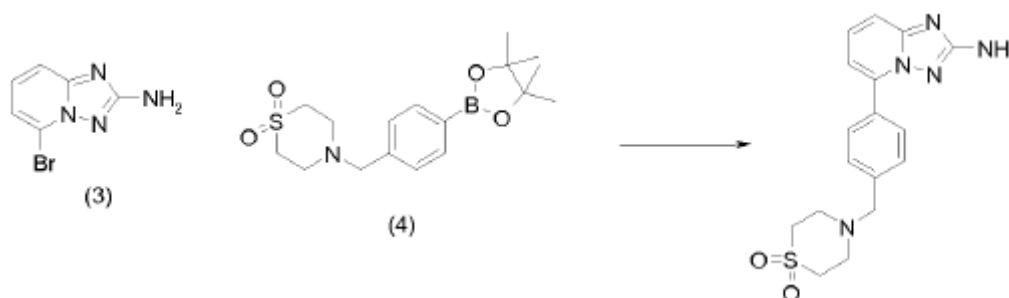
- 5 ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,43 a 7,34 (2H, m, 2 x aromático-H), 7,24 (1H, dd, *J* 6,8 y 1,8 Hz, aromático-H), 6,30 (2H, br, NH₂); *m/z* 213/215 (1:1, M+H⁺, 100%).

1.1.2. Síntesis de 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-bencil]-tiomorfolina-1,1-dióxido (Intermedio 4)



- 10 Se disolvieron 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (1 eq.) y DIPEA (2 eq.) en DCM/MeOH (5:1 v:v) bajo N₂ y se añadió 1,1-dióxido de tiomorfolina (2 eq.) en porciones. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este tiempo, la reacción se había completado. El disolvente se evaporó. El compuesto se extrajo con EtOAc y agua, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Las capas orgánicas se filtraron y se evaporaron. El compuesto final se aisló sin purificación adicional.

1.1.3. Síntesis de 5-[4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-ilamina (Fórmula I)



- 15 Se añadió 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-bencil]-tiomorfolina-1,1-dióxido (1,1 eq.) a una solución de de 5-bromo-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-ilamina (4:1). Se añadieron K₂CO₃ (2 eq.) y PdCl₂dppf (0,03 eq.) a la solución. Se calentó entonces la mezcla resultante en un baño de aceite a 90 °C durante 16 h en N₂. Se añadió agua y la solución se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se evaporaron *in vacuo*. Se obtuvo el compuesto final después de la purificación por medio de cromatografía flash.
- 20

¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,94 a 7,92 (d, 2H), 7,52 a 7,48 (m, 3H), 7,37 a 7,34 (m, 1H), 7,02 a 7,00 (m, 1H), 6,00 (d, 2H), 3,76 (d, 2H), 3,15 a 3,13 (m, 4H), 2,93 a 2,91 (m, 4H).

m/z 358,2 (M+H⁺, 100%).

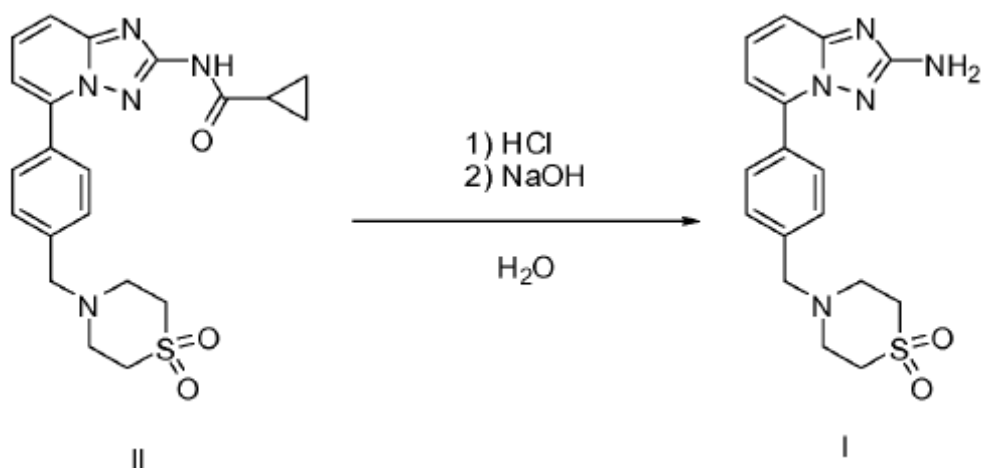
1.2. Ruta 2

- 25 1.2.1. Ácido ciclopropanocarboxílico [5-[4-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-il]-amida (Fórmula II)

El compuesto de acuerdo con la Fórmula II se puede sintetizar de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2010/149769.

1.2.2. Síntesis de 5-[4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridin-2-ilamina (Fórmula I)

- 30 El compuesto de acuerdo con la Fórmula I también se puede producir por medio de la hidrólisis del compuesto de acuerdo con la Fórmula II:



Se añadió ácido clorhídrico acuoso al 30% (12,06 kg; 3,9 volúmenes rel.) a una suspensión del compuesto de acuerdo con la Fórmula II (3,45 kg; 1,0 equiv.), en agua desmineralizada (10,0 kg; 3,0 volúmenes rel.). Posteriormente, un enjuague en línea se llevó a cabo con agua desmineralizada (3,4 kg; 1,0 volúmenes rel.). La mezcla de reacción se calentó a 80±5 °C durante 14,5 h. Después de la terminación de la reacción (conversión ≥ 99%), la mezcla de reacción se enfrió a 20±5 °C. La mezcla de reacción se diluyó con agua desmineralizada (6,8 kg; 2,0 volúmenes rel.) e hidróxido de sodio 33% acuoso (9,52 kg; 3,7 volúmenes rel.) se dosificó a una velocidad tal que la temperatura del contenido del reactor se mantuvo por debajo de 35 °C. Se necesitó una cantidad adicional de hidróxido de sodio 33% acuoso (2,55 kg.; 1,0 volúmenes rel.) para obtener el pH ≥ 10. El producto se separó por medio de filtración, se lavó dos veces con agua desmineralizada (1,5 volúmenes rel.) y se secó al vacío durante 1 hora, para de ese modo dar el compuesto bruto de acuerdo con la Fórmula I.

El compuesto en bruto de acuerdo con la Fórmula I (5,70 kg) se suspendió nuevamente en agua desmineralizada (23,0 kg; 8,5 volúmenes rel.). Se añadieron ácido clorhídrico acuoso al 30% (1,65 kg; 0,7 volúmenes rel.) y agua desmineralizada (4,3 kg; 1,6 volúmenes rel.) y la mezcla de reacción se agitó a 20±5 °C durante 45 min. Como el compuesto de acuerdo con la Fórmula I no se disolvió completamente, la mezcla de reacción se agitó a 45±5 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se filtró y el residuo se lavó con agua desmineralizada (2,0 kg; 0,75 volúmenes rel.). Se añadió hidróxido de sodio al 33% acuoso (1,12 kg; 0,6 volúmenes rel.) al filtrado. Se necesitaba una cantidad adicional de hidróxido de sodio 33% acuoso (1,01 kg) para obtener el pH ≥ 10. La mezcla de reacción resultante se agitó a 20±5 °C durante aproximadamente 3 h. El producto se separó por medio de filtración, se lavó dos veces con agua desmineralizada (4,1 kg; 1,5 volúmenes rel.), y dos veces con metil *tert*-butil éter (MTBE; 3,0 kg; 1,5 volúmenes rel.) y se secó bajo vacío durante 15,5 h en el filtro. El producto se secó de manera adicional en un horno de vacío a 40±5 °C durante 202 h, para de ese modo dar el compuesto deseado de acuerdo con la Fórmula I.

Ejemplos biológicos

25 **Ejemplo 2. Ensayos *in vitro***

2.1. *Ensayo de inhibición de JAK1*

2.1.1. *Ensayo de JAK1 sustrato polyGT*

Se adquirió un dominio catalítico de JAK1 humano recombinante (aminoácidos 866 a 1154; número de catálogo PV4774) de Invitrogen. Se incubaron 25 ng de JAK1 con 6,25 µg de sustrato polyGT (Sigma, número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (15 mM de Hepes, pH 7,5, 0,01% de Tween20, 10 mM de MgCl₂, 2 µM de ATP no radiactivo, 0,25 µCi de ³³P-gamma-ATP (Perkin Elmer, número de catálogo NEG602K001MC) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contiene el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, fondo en V). Después de 75 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 µl/pocillo de 150 mM de ácido fosfórico. Toda la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos lavadas previamente (ácido fosfórico 75 mM) (Perkin Elmer, número de catálogo 6.005.177) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución de ácido fosfórico 75 mM y el fondo de las placas se selló. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y la lectura se llevó a cabo por el uso del Topcount (Perkin Elmer). La actividad de quinasa se calculó por medio de la sustracción de recuentos por min (cpm) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µl de estaurosporina) a partir de cpm obtenido en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = ((cpm determinado para la muestra con el compuesto de ensayo presente – cpm

determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinado en la presencia del vehículo – cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

5 Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos que permiten la comprobación de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK1 y el cálculo de la IC₅₀ para el compuesto. El compuesto se ensayó a una concentración de 20 µM, seguido por una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82nM – 27nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO de 1%. Cuando se incrementaba la potencia del compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la concentración de la parte superior (por ej., 5 µM, 1 µM).

10 La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra JAK1 se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió valores de IC₅₀ de 460,1, 586, 494,3, 758,2, y 432,7 nM (promedio 546,26 nM).

2.1.2. Ensayo de péptido JAK1 Ulight-JAK1

15 Se adquirió un dominio catalítico de JAK1 humana recombinante (aminoácidos 866 a 1154; número de catálogo PV4774) de Invitrogen. Se incubó 1 ng de JAK1 con 20 nM de péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) (número de catálogo Perkin Elmer TRF0121) en tampón de reacción de quinasa (15 mM de MOPS, pH 6,8, 0,01% de Brij-35, 5 mM de MgCl₂, 2 mM de DTT, 7 µM de ATP) con o sin 4 µl que contiene el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 20 µl, en una placa 384 Opti blanca (Perkin Elmer, número de catálogo 6007290). Después de 60 min a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 20 µl/pocillo de mezcla de detección (tampón de detección 1 x (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), 0,5 nM de Europio-anti-fosfotirosina (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), 10 mM de EDTA). La lectura se llevó a cabo por el uso del Envision con excitación a 320 nm y medición de la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). La actividad de quinasa se calculó por medio de la sustracción de unidades de fluorescencia relativa (RFU, por su sigla en inglés) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µM de estaurosporina) de RFU obtenidas en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

25 Porcentaje de inhibición = ((RFU determinadas para la muestra con el compuesto de ensayo presente – RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido por (RFU determinadas en presencia del vehículo – RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

30 Una serie de dilución de dosis se preparó para el compuesto que permite la comprobación de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK1 y el cálculo de la IC₅₀ para el compuesto. El compuesto se ensayó de manera rutinaria a una concentración de 20 µM, seguido por una dilución en serie 1/5, 10 puntos en una concentración final de DMSO de 1%. Cuando se incrementaba la potencia del compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la concentración de la parte superior (por ej., 5 µM, 1 µM). Los datos se expresaron como la IC₅₀ promedio de los ensayos ± error estándar de la media.

35 La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra JAK1 se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió valores de IC₅₀ de 346,8, 714,3, 166,6, 103,3, 187,2, 582,3, 295,3, 241,7, 159,2, 355,3, y 221,6 nM (promedio = 307 nM).

2.1.3. Ensayo de determinación de JAK1 Ki

40 Para la determinación de Ki, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima y la reacción enzimática es seguida como una función de la concentración de ATP. La Ki se determinó por medio de trazado recíproco doble de Km vs la concentración de compuesto (gráfico de Lineweaver-Burk). Se utilizó 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774) en el ensayo. El sustrato es 20 nM de péptido Ulight-JAK-1 (Tyr 1023) (Perkin Elmer, TRF0121). La reacción se llevó a cabo en 15 mM de MOPS, pH 6,8, 0,01% de Brij-35, 2 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂ con diferentes concentraciones de ATP y el compuesto. El sustrato fosforilado se midió por el uso de un anticuerpo anti-fosfotirosina etiquetado con europio PT66 (Perkin Elmer, AD0068) como se describe en el punto 1.1.2. La lectura se llevó a cabo en el Envision (Perkin Elmer) con excitación a 320 nm y emisión seguida a 615 nm y 665 nm.

2.2. Ensayo de inhibición de JAK2

2.2.1. Ensayo de JAK2 sustrato polyGT

50 Se adquirió un dominio catalítico de JAK2 humano recombinante (aminoácidos 808 a 1132; número de catálogo PV4210) de Invitrogen. Se incubaron 0,05 mU de JAK2 con 2,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma P0275) en tampón de reacción de quinasa (10 mM de MOPS, pH 7,5, 0,5 mM de EDTA, 0,01% de Brij-35, 1 mM de DTT, 15 mM de MgAc, 1 µM de ATP no radiactivo, 0,25 µCi de ³³P-gamma ATP (Perkin Elmer, número de catálogo NEG602K001MC) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contiene el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, fondo en V). Después de 90 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 µl/pocillo de 150 mM de ácido fosfórico. Toda la reacción de quinasa terminada se transfirió a (ácido fosfórico 75 mM) placas de filtro de 96 pocillos lavadas previamente (Perkin Elmer, número de catálogo 6.005.177) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución de 75 mM de ácido fosfórico y

se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y la lectura se llevó a cabo por el uso del Topcount (Perkin Elmer). La actividad de quinasa se calculó por medio de la sustracción de recuentos por min (cpm) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µM de estaurosporina) a partir de cpm obtenido en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

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

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

La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra JAK1 se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió valores de IC₅₀ de 566,9, 365,5, 256,4, 915,1, y 1017 nM (promedio = 624 nM).

2.2.2. Ensayo de péptido JAK2 Ulight-JAK1

Se adquirió un dominio catalítico de JAK2 humano recombinante (aminoácidos 866 a 1154; número de catálogo PV4210) de Invitrogen. Se incubaron 0,0125 mU de JAK2 con 25 nM de péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) (número de catálogo Perkin Elmer TRF0121) en tampón de reacción de quinasa (25 mM de Hepes, pH 7,0, 0,01% de Triton X-100, 7,5 mM de MgCl₂, 2 mM de DTT, 7,5 µM de ATP) con o sin 4 µl que contiene el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 20 µl, en una placa 384 Opti blanca (Perkin Elmer, número de catálogo 6007290). Después de 60 min a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 20 µl/pocillo de mezcla de detección (tampón de detección 1x (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), 0,5 nM de europio-anti-fosfotirosina (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), 10 mM de EDTA). La lectura se llevó a cabo por el uso del Envision con excitación a 320 nm y se midió la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). La actividad de quinasa se calculó por medio de la sustracción de unidades de fluorescencia relativa (RFU) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µM de estaurosporina) de RFU obtenidas en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = ((RFU determinadas para la muestra con el compuesto de ensayo presente – RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido por (RFU determinadas en presencia del vehículo – RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

Se prepararon series de dilución de dosis para el compuesto que permite la comprobación de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK2 y el cálculo de la IC₅₀ para el compuesto. El compuesto se ensayó a una concentración de 20 µM, seguido por una dilución en serie 1/5, 10 puntos en una concentración final de DMSO de 1%. Cuando se incrementaba la potencia del compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la concentración de la parte superior (por ej., 5 µM, 1 µM). Los datos se expresaron como la IC₅₀ promedio de los ensayos ± error estándar de la media.

La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra JAK2 se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió valores de IC₅₀ de 1031, 351,2, 137,5, 367,2, 310,2, 729,2, 151,7, 203,0, 168,0, y 517,0 (promedio = 397 nM).

2.2.3. Ensayo de determinación de JAK2 Kd/Ki

2.2.3.1. Ensayo de determinación de JAK2 Ki

Para la determinación de Ki, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima y la reacción enzimática es seguida como una función de la concentración de ATP. La Ki se determinó por medio de trazado recíproco doble de Km vs la concentración de compuesto (gráfico de Lineweaver-Burk). Se utilizaron 0,0125 mU de JAK1 (Invitrogen, PV4210) en el ensayo. El sustrato fue 25 nM de péptido Ulight-JAK-1 (Tyr 1023) (Perkin Elmer, TRF0121). La reacción se llevó a cabo en 25 mM de Hepes, pH 7,0, 0,01% de Triton X-100, 7,5 mM de MgCl₂, 2 mM de DTT con diferentes concentraciones de ATP y el compuesto. El sustrato fosforilado se midió por el uso de un anticuerpo anti-fosfotirosina etiquetado con europio PT66 (Perkin Elmer, AD0068) como se describe en el punto 1.2.2. La lectura se llevó a cabo en el Envision (Perkin Elmer) con excitación a 320 nm y emisión seguida a 615 nm y 665 nm.

2.2.3.2. Ensayo de determinación de JAK2 Kd

Se utilizó JAK2 (Invitrogen, PV4210) a una concentración final de 2,5 nM. El experimento de unión se llevó a cabo

en 50 mM de HEPES, pH 7,5, 0,01% de Brij-35, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA por el uso de 25 nM de un trazador de quinasa 236 (Invitrogen, PV5592) y 2 nM de Europio-anti-GST (Invitrogen, PV5594) con diferentes concentraciones de compuesto. La detección del trazador se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

5 2.2.4. Ensayo de inhibición de JAK3

Se adquirió un dominio catalítico de JAK3 humano recombinante (aminoácidos 795 a 1124; número de catálogo 08-046) de Carna Biosciences. Se incubaron 0,5 ng de proteína JAK3 con 2,5 µg de sustrato polyGT (Sigma, número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (25 mM de Tris, pH 7,5, 0,5 mM de EGTA, 10 mM de MgCl₂, 2,5 mM de DTT, 0,5 mM de Na₃VO₄, 5 mM de b-fosfato de glicerol, 0,01% de Triton X-100, 1 µM de ATP no radiactivo, 0,25 µCi de ³³P-gamma-ATP (Perkin Elmer, número de catálogo NEG602K001MC) concentraciones finales) con o sin 5 µL que contiene el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, fondo en V). Después de 45 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 µl/pocillo de 150 mM de ácido fosfórico. Toda la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos lavadas previamente (75 mM de ácido fosfórico) (Perkin Elmer, número de catálogo 6005177) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución de 75 mM de ácido fosfórico y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y la lectura se llevó a cabo por el uso del Topcount (Perkin Elmer). La actividad de quinasa se calculó por medio de la sustracción de recuentos por min (cpm) obtenidos en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µM de estaurosporina) a partir de cpm obtenido en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

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

25 Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos que permiten la comprobación de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK3 y el cálculo de la IC₅₀ para el compuesto. El compuesto se ensayó a una concentración de 20 µM, seguido por una dilución en serie 1/5, 10 puntos en una concentración final de DMSO de 1%. Cuando se incrementaba la potencia del compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la concentración de la parte superior (por ej., 5 µM, 1 µM).

30 La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra JAK3 se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió valores de IC₅₀ de 2497, >4000, >4000, >3333, >3333, 3939, >4000, >4000, >4000, 3201, y 3368 (promedio >3606 nM).

2.2.5. Ensayo de determinación de JAK3 Ki

35 Para la determinación de Ki, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima y la reacción enzimática es seguida como una función de la concentración de ATP. La Ki se determinó por medio de trazado recíproco doble de Km vs la concentración de compuesto (gráfico de Lineweaver-Burk). Se utilizó JAK3 (Carna Biosciences, 08-046) a una concentración final de 20 ng/ml. El sustrato era una sal de poli(Glu,Tyr)sodio (4:1), MW de 20.000 a 50.000 (Sigma, P0275) La reacción se llevó a cabo en 25 mM de Tris, pH 7,5, 0,01% de Triton X-100, 0,5 mM de EGTA, 2,5 mM de DTT, 0,5 mM Na₃VO₄, 5 mM de b-fosfato de glicerol, 10 mM de MgCl₂ con concentraciones variables de ATP y el compuesto y se detuvo por medio de la adición de 150 mM de ácido fosfórico. La medición del fosfato incorporado en el sustrato polyGT se llevó a cabo por medio de la carga de las muestras en una placa de filtro (por el uso de un recolector de células, Perkin Elmer) y el posterior lavado. El ³³P incorporado en polyGT se midió en un contador de centelleo Topcount después de la adición de líquido de centelleo a las placas de filtro (Perkin Elmer).

45 2.3. Ensayo de inhibición de TYK2

Se adquirió un dominio catalítico de TYK2 humano recombinante (aminoácidos 871 a 1187; número de catálogo 08-147) de Carna Biosciences. Se incubaron 4 ng de TYK2 con 12,5 µg de sustrato polyGT (Sigma, número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (25 mM de HEPES, pH 7,2, 50 mM de NaCl, 0,5 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 5 mM de MnCl₂, 10 mM de MgCl₂, 0,1% de Brij-35, 0,1 de ATP no radiactivo, 0,125 µCi de ³³P-gamma-ATP (Perkin Elmer, número de catálogo NEG602K001MC) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contiene el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 1% de concentración final), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, fondo en V). Después de 90 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 µl/pocillo de 150 mM de ácido fosfórico. Toda la reacción de quinasa terminada se transfirió a (75 mM de ácido fosfórico) 96 placas de filtro pocillos lavadas previamente (Perkin Elmer, número de catálogo 6005177) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una solución de 75 mM de ácido fosfórico y se selló la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas y la lectura se llevó a cabo por el uso del Topcount (Perkin Elmer). La actividad de quinasa se calculó por medio de la sustracción de recuentos por min (cpm) obtenidos

en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μM de estaurosporina) a partir de cpm obtenido en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

5 Porcentaje de inhibición = ((cpm determinado para la muestra con el compuesto de ensayo presente – cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinado en la presencia del vehículo – cpm determinado para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

10 Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos que permiten la comprobación de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de TYK2 y el cálculo de la IC_{50} para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó de manera rutinaria a una concentración de 20 μM , seguido por una dilución en serie 1/3, 8 puntos (20 μM – 6,67 μM – 2,22 μM – 740 nM – 247nM – 82 nM – 27nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO de 1%. Cuando se incrementaba la potencia del compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la concentración de la parte superior (por ej., 5 μM , 1 μM).

La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra TYK2 se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió valores de IC_{50} de >3333,> 3333,> 3333, 1973, 2121, 3852, 3819, y 2207 (promedio >2996 nM).

15 2.3.1. Ensayo de determinación de TYK2 Kd/Ki

2.3.1.1. Ensayo de determinación de TYK2 Ki

20 Para la determinación de Ki, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima y la reacción enzimática es seguida como una función de la concentración de ATP. La Ki se determinó por medio de trazado recíproco doble de Km vs la concentración de compuesto (gráfico de Lineweaver-Burk). Se utilizó TYK2 (Carna Biosciences, 08-147) a una concentración final de 160 ng/ml. El sustrato era una sal de poli(Glu,Tyr)sodio (4:1), MW de 20.000 a 50.000 (Sigma, P0275) La reacción se llevó a cabo en 25 mM de Hepes, pH 7,2, 50 mM de NaCl, 0,5 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 5 mM de MnCl_2 , 10 mM de MgCl_2 , 0,1% de Brij-35 con diferentes concentraciones de ATP y el compuesto y se detuvo por medio de la adición de 150 mM de ácido fosfórico. La medición del fosfato incorporado en el sustrato polyGT se llevó a cabo por medio de la carga de las muestras en una placa de filtro (por el uso de un recolector de células, Perkin Elmer) y posterior lavado. El ^{33}P incorporado en polyGT se midió en un contador de centelleo Topcount después de la adición de líquido de centelleo a las placas de filtro (Perkin Elmer).

2.3.1.2. Ensayo de determinación de TYK2 Kd

30 Se utilizó TYK2 (Carna Biosciences, 08-147) a una concentración final de 50 nM. El experimento de unión se llevó a cabo en 50 mM de Hepes, pH 7,5, 0,01% de Brij-35, 10 mM de MgCl_2 , 1 mM de EGTA por el uso de 15 nM de un trazador de quinasa 236 (Invitrogen, PV5592) y 10 nM de europio-anti-GST (Invitrogen, PV5594) con concentraciones variables de compuesto. La detección del trazador se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de los fabricantes.

Ejemplo 3. Ensayos celulares:

3.1. Ensayo de señalización de JAK-STAT:

35 Las células de HeLa se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por su sigla en inglés) que contiene suero inactivado por calor al 10% de ternera fetal, penicilina 100 U/ml y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin. Se utilizaron células de HeLa a 70% de confluencia para la transfección. 20.000 células en 87 μL de medio de cultivo celular fueron transfectadas de manera transitoria con 40 ng de informante pSTAT1 (2)-luciferasa (Panomics), 8 ng del reportero LacZ como reportero de control interno y 52 ng de pBSK por el uso de 0,32 μL de Jet-PEI (Polyplus) como reactivo de transfección por pocillo en formato de placa de 96 pocillos. Después de la incubación hasta el día siguiente a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 , se eliminó el medio de transfección. Se añadió 81 μL de DMEM + 1,5% de suero de ternera fetal inactivado por calor. Se añadió 9 μL de compuesto en una concentración de 10 veces durante 60 minutos y luego 10 μL de OSM humana (Peprotech) a 33 ng/ml de concentración final.

45 El compuesto se ensayó por duplicado a partir de 20 μM , seguido por una dilución en serie 1/3, 8 dosis en total (20 μM – 6,6 μM – 2,2 μM – 740 nM – 250 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO de 0,2%.

Después de la incubación hasta el día siguiente a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% de células de CO_2 se lisaron por medio de la adición de tampón de lisis 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ (PBS, 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 10% de trehalosa, 0,05% de Tergitol NP9, 0,3% de BSA).

50 40 μL de lisado celular se utiliza para leer la actividad de β -galactosidasa por medio de la adición de 180 μL de solución de β -Gal (30 μL de ONPG 4 mg/ml + 150 μL de tampón de β -galactosidasa (0,06 M de Na_2HPO_4 , 0,04 M de NaH_2PO_4 , 1 mM de MgCl_2)) durante 20 min. La reacción se detuvo por medio de la adición de 50 μL de Na_2CO_3 1 M. La absorbancia se leyó a 405 nm.

La actividad de luciferasa se midió por el uso de 40 μL de lisado celular más 40 μL de Steadylite® como se describe por el fabricante (Perkin Elmer), en el Envision (Perkin Elmer).

Se utilizó OSM de omisión como control positivo (100% de inhibición). Se utilizó DMSO al 0,5% como control negativo (0% de inhibición). Los controles positivos y negativos se utilizaron para calcular los valores de z' e 'inhibición porcentual' (PIN, por su sigla en inglés).

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

Los valores de PIN se representaron para los compuestos ensayados en valores EC_{50} dosis-respuesta y se derivaron.

10 La actividad del compuesto de acuerdo con la Fórmula I contra JAK-STAT se determinó de acuerdo con el ensayo descrito con anterioridad, de este modo devolvió un valor de IC_{50} de No activo, >6670, >6670, 8943 (promedio > 7427 nM).

3.2. *Ensayo de señalización de OSM/IL-1 β*

15 Se demuestra que OSM e IL-1 β regulan por aumento de forma sinérgica los niveles de MMP13 en la línea celular SW1353 del condrosarcoma humano. Las células se siembran en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo en un volumen de 120 μ L DMEM (Invitrogen) que contiene 10% (v/v) de FBS y se incubaron 1% de penicilina/estreptomina (Invitrogen) a 37 °C, 5% de CO₂. Las células se incubaron previamente con 15 μ L de compuesto en medio M199 con 2% de DMSO 1 hora antes de activar con 15 μ L de OSM e IL-1 β para llegar a 25 ng/ml de OSM y 1 ng/ml IL-1 β , y los niveles de MMP13 se miden en medio condicionado 48 h después de la activación. La actividad de MMP13 se midió por el uso de un ensayo de actividad de captura de anticuerpo. Para este propósito, placas de 384 pocillos (NUNC, 460518, MaxiSorb negro) se recubren con 35 μ L de una solución de anticuerpo de 1,5 μ g/ml anti-humano MMP13 (R&D Systems, MAB511) durante 24 horas a 4 °C. Después de lavar los pocillos 2 veces con PBS + 0,05% de Tween, los sitios de unión restantes se bloquean con 100 μ L de 5% de leche en polvo sin grasa (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) en PBS durante 24 h a 4 °C. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con PBS + 0,05% de Tween y 35 μ L de dilución 1/10 de sobrenadante de cultivo que contiene MMP13 en tampón de bloqueo diluido 100 veces y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavan dos veces con PBS + 0,05% de Tween, seguido por la activación de MMP13 por medio de la adición de 35 μ L de una solución de acetato 4-aminofenilmercúrico (APMA, por su sigla en inglés) 1,5 mM (Sigma, A9563) y la incubación a 37 °C durante 1 hora. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS + 0,05% de Tween y se añaden 35 μ L de sustrato MMP13 (Biomol, P-126, sustrato fluorogénico OmniMMP). Después de la incubación durante 24 h a 37 °C de fluorescencia del sustrato convertido se mide en un Lector Múltiple de Etiquetas Perkin Elmer Wallac EnVision 2102 (excitación de longitud de onda: 320 nm, emisión de longitud de onda: 405 nm).

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

35 3.3. *Ensayo de proliferación PBL*

Se estimularon linfocitos de sangre periférica humana (PBL, por su sigla en inglés) con IL-2 y la proliferación se midió por el uso de un ensayo de incorporación de BrdU. Los PBL se estimularon primero durante 72 h con PHA para inducir el receptor de IL-2, a continuación, se mantuvieron en ayunas durante 24 h para detener la proliferación de células seguido por una estimulación de IL-2 durante otras 72 h (que incluyen el etiquetado de BrdU de 24 horas). 40 Las células se preincubaron con compuestos de ensayo 1 hora antes de la adición de IL-2. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contiene 10% (v/v) de FBS.

3.4. *Ensayo de sangre humana entera (h WBA)*

3.4.1. *Protocolo 1*

3.4.1.1. *Protocolo de estimulación de IL-6*

45 Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo para establecer la selectividad del compuesto JAK1 sobre JAK2 *ex vivo* por el uso de sangre humana entera. Por lo tanto, se extrajo sangre de voluntarios humanos que dieron su consentimiento informado. La sangre se equilibró entonces durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave, a continuación se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf. Se añadió el compuesto a diferentes concentraciones y se incubó a 37 °C durante 30 minutos bajo agitación suave y, posteriormente, se estimuló durante 20 min a 37 °C bajo agitación suave con interleucina 6 (IL-6) para la estimulación de la vía dependiente de JAK1 o GM-CSF para la estimulación de la vía dependiente de JAK2. Después se evaluaron Fosfo-STAT1 y Fosfo-STAT5 por el uso de análisis de FACS.

3.4.1.1.1. *Ensayos de Fosfo-STAT1*

3.4.1.1.1.1. *Preparación de reactivos*

El tampón de 5X de Lyse/Fix (BD PhosFlow, Núm. de Cat. 558049) se diluyó 5 veces con agua destilada y se calentó previamente a 37 °C. El tampón diluido de Lyse/Fix restante se desechó.

Se disolvió 10 µg de rhIL-6 (R&D Systems, Núm. de Cat. 206-IL) en 1 ml de PBS, 0,1% de BSA para obtener una solución madre de 10 µg/ml. La solución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

- 5 Se preparó una serie de dilución de 3 veces del compuesto en DMSO (10 mM de solución madre). Las muestras tratadas con control recibieron DMSO en lugar del compuesto. Todas las muestras se incubaron con una concentración final de DMSO de 1%.

3.4.1.1.2. Incubación de la sangre con el compuesto y la estimulación con IL-6

- 10 La sangre humana se recogió en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 148,5 µL. A continuación, 1,5 µL de la dilución del compuesto de ensayo se añadió a cada alícuota de la sangre y las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave. Un microlitro y medio de solución madre de IL-6 diluida 10 veces se añadió a las muestras de sangre (concentración final 10 ng/ml) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min bajo agitación suave.

3.4.1.1.3. Preparación de glóbulos blancos

- 15 Al final del período de estimulación, 3 ml de 1X tampón de Lyse/Fix calentado previamente se añadieron inmediatamente a las muestras de sangre, se sometieron a vórtice brevemente y se incubaron durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

- 20 Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 400 xg a 4 °C. El pélet de células se lavó con 3 ml de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el pélet de células se suspendió nuevamente en 100 µL de 1X PBS congelado y se añadieron 900 µL de metanol al 100% congelado. A continuación, las células se incubaron a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

A continuación, las células permeabilizadas se lavaron con 1X PBS que contenía 3% de BSA y finalmente se suspendieron nuevamente en 80 µL de 1X PBS que contenía 3% de BSA.

3.4.1.1.4. Etiquetado de células con anti Fosfo-STAT1 y anticuerpos anti-CD4

- 25 Se añadieron 20 µL de anti-STAT1 (pY701) o anticuerpo de control de isotipo IgG2ax de ratón PE (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612564 y 559319, respectivamente) y el anticuerpo anti-CD4 conjugado con FITC o anticuerpo de control de isotipo conjugado con FITC de ratón PE y se mezclaron, después, se incubaron durante 30 min a 4 °C, en la oscuridad.

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

3.4.1.1.5. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

- 35 Se contaron 50.000 eventos totales y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT1 después de la apertura en células CD4⁺, en la puerta de linfocitos. Los datos se analizaron por el uso del software FACSDiva y se calculó el porcentaje de inhibición de la estimulación de IL-6 a partir del porcentaje de células positivas para Fosfo-STAT1 sobre las células CD4⁺.

3.4.1.1.2. Ensayo de Fosfo-STAT5

3.4.1.1.2.1. Preparación de los reactivos

El tampón de 5X de Lyse/Fix (BD PhosFlow, Núm. de Cat. 558049) se diluyó 5 veces con agua destilada y se calentó previamente a 37 °C. El tampón de Lyse/Fix diluido restante se descartó.

- 40 10 µg de rhGM-CSF (Abcys S.A., Núm. de Cat. P300-03) se disolvió en 100 µL de PBS, 0,1% de BSA para obtener una solución madre de 100 µg/ml. La solución madre se almacenó en alícuotas a -80 °C.

Una serie de dilución de 3 veces del compuesto se preparó en DMSO (solución madre de 10 mM). Las muestras tratadas con control recibieron DMSO sin el compuesto de ensayo. Todas las muestras se incubaron con una concentración de DMSO final de 1%.

- 45 *3.4.1.1.2.2. Incubación de la sangre con el compuesto y estimulación con GM-CSF*

- 50 La sangre humana se recogió en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 148,5 µL. Después, se añadieron 1,5 µL de dilución de compuesto a cada alícuota y las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave. Se añadió una dilución de 5000 veces de la solución madre de GM-CSF (1,5 µL) a las muestras de sangre (concentración final de 20 pg/ml) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min bajo agitación suave.

3.4.1.1.2.3. Preparación de glóbulos blancos

Al final del período de estimulación, 3 ml de 1X tampón de Lyse/Fix calentado previamente se añadieron inmediatamente a las muestras de sangre, se sometieron a vórtice brevemente y se incubaron durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

- 5 Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 400 xg a 4 °C. El pélet de células se lavó con 3 ml de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el pélet de células se suspendió nuevamente en 100 µL de 1X PBS congelado y se añadieron 900 µL de metanol al 100% congelado. A continuación, las células se incubaron a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

3.4.1.1.2.4. Etiquetado de células con anticuerpos anti Fosfo-STAT5 y anti-CD33

- 10 Se añadieron 20 µL de PE de anticuerpo de control anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o isotipo IgG1κ de ratón PE (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612567 y 554680, respectivamente) y el anticuerpo anti CD33 de ratón APC (BD Biosciences, Núm. 345800) o el anticuerpo de isotipo IgG1 de ratón APC de control (BD Biosciences, Núm. 345818), se mezclaron y después se incubaron durante 30 min a 4 °C, en la oscuridad.

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

3.4.1.1.2.5. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

- 20 Se contaron 50.000 eventos totales y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT5 después de la apertura en las células CD33⁺. Los datos se analizaron por el uso del software FACSDiva y corresponden al porcentaje de inhibición de la estimulación de GM-CSF calculada a partir del porcentaje de células positivas para fósfo-STAT5 sobre las células CD33⁺.

3.4.2. Protocolo 2

3.4.2.1. Protocolo de estimulación

- 25 Se llevó a cabo una análisis de citometría de flujo para establecer la selectividad del compuesto JAK1 sobre JAK2 *ex vivo* a partir de sangre humana entera. Por lo tanto, se extrajo sangre de voluntarios humanos que dieron su consentimiento informado. La sangre se equilibró entonces durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave, a continuación se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf. El compuesto se añadió a diferentes concentraciones y se incubó a 37 °C durante 30 minutos bajo agitación suave y, posteriormente, se estimuló durante 20 min a 37 °C bajo agitación suave con interleucina 6 (IL-6) para la estimulación de la vía dependiente de JAK1, Interferón alfa (IFN α) para la estimulación de la vía dependiente de JAK1/TYK2, la interleucina 2 (IL-2) para la estimulación de la vía dependiente de JAK1/JAK3 o CSF GM para la estimulación de la vía dependiente de JAK2. Los niveles de Fosfo-STAT1 (para las células estimuladas con IL-6 e IFN α) y Fosfo-STAT5 (para las células estimuladas por IL-2 y GM-CSF) se evaluaron luego por el uso del análisis de FACS.
- 30

3.4.2.2. Ensayos de Fosfo-STAT

3.4.2.2.1. Preparación de los reactivos

- 35 El tampón de 5X de Lyse/Fix (BD PhosFlow, Núm. de Cat. 558049) se diluyó 5 veces con agua destilada y se calentó previamente a 37 °C. El tampón diluido de Lyse/Fix restante se desechó.

Se disolvieron 10 µg de rhIL-6 (R&D Systems, Núm. de Cat. 206-IL) en 1 ml de PBS + BSA al 0,1% para obtener una solución madre de 10 µg/ml. La solución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

- 40 Se disolvieron 10 µg de rhIL-2 (R&D Systems, Núm. de Cat. 202-IL) en 1 ml de PBS + BSA al 0,1% para obtener una solución madre de 10 µg/ml. La solución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

Se disolvieron 5 µg de rhGM-CSF (Abcys S.A., Núm. de Cat. P300-03) en 12,5 ml de PBS + 0,1% de BSA para obtener una solución madre de 400 ng/ml. La solución madre se almacenó en alícuotas a -80 °C.

- 45 Una serie de dilución de 3 veces del compuesto se preparó en DMSO (solución madre de 10 mM). Las muestras tratadas con control recibieron DMSO en lugar del compuesto. Todas las muestras se incubaron con una concentración final de DMSO de 1%.

3.4.2.2.2. Incubación de la sangre con el compuesto y la estimulación con activadores

- 50 La sangre humana se recogió en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 148,5 µL. Después, se añadieron 1,5 µL de la dilución de compuesto de ensayo a cada alícuota de la sangre y las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave. Un microlitro y medio de solución madre de IL-6 diluida 10 veces, 1,5 µL de solución madre de uIFN α (PBL Biomedical, Núm. de Cat. 11200-1), 1,5 µL de solución madre de IL-

2 diluida 25 veces o 1,5 μL de la dilución de 200 veces de la solución madre de GM-CSF se añadieron a las muestras de sangre y las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min bajo agitación suave.

3.4.2.2.3. Preparación de glóbulos blancos

5 Al final del período de estimulación, 3 ml de 1X tampón de Lyse/Fix calentado previamente se añadieron inmediatamente a las muestras de sangre, se sometieron a vórtice brevemente y se incubaron durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

10 Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 400 xg a 4 °C. El pélet de células se lavó con 3 ml de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el pélet de células se suspendió nuevamente en 100 μL de 1X PBS congelado y se añadieron 900 μL de metanol al 100% congelado. A continuación, las células se incubaron a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

A continuación, las células permeabilizadas se lavaron con 1X PBS que contenía 3% de BSA y finalmente se suspendieron nuevamente en 80 μL de 1X PBS que contenía 3% de BSA.

3.4.2.2.4. Etiquetado de células

15 20 μL de anticuerpo de control de isotipo anti-STAT1 de ratón PE (pY701) o IgG2ak de ratón PE (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612564 y 559319, respectivamente) y el anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC o anticuerpo de isotipo conjugado con APC de control (BD Biosciences, Núm. de Cat. 555349 y 555751, respectivamente) se añadieron a tubos estimulados con IL-6 y IFN α y se mezclaron, después se incubaron durante 20 min a 4 °C, en la oscuridad.

20 20 μL de anticuerpo de control anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o isotipo IgG1k de ratón PE (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612567 y 554680, respectivamente) y el anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC o anticuerpo de control de isotipo conjugado con APC (BD Biosciences, Núm. de Cat. 555349 y 555751, respectivamente) se añadieron a tubos estimulados con IL-2, se mezclaron y después se incubaron durante 20 min a 4 °C, en la oscuridad.

25 20 μL de anticuerpo de control anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o isotipo IgG1k de ratón PE (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612567 y 554680, respectivamente) y el anticuerpo anti-CD33 conjugado con APC de ratón PE (BD Biosciences, Núm. 345800) o anticuerpo de control de isotipo IgG1 conjugado con APC de ratón PE (BD Biosciences, Núm. de Cat. 345818) se añadieron a tubos estimulados con GM-CSF, se mezclaron y después se incubaron durante 20 min a 4 °C, en la oscuridad.

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

30 3.4.2.2.5. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

35 Se contaron 50.000 eventos totales y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT1 después de la apertura en las células CD4+, en la puerta de linfocitos para células estimuladas con IL-6 e IFN α . Las células positivas para Fosfo-STAT5 se midieron después de la apertura en las células CD4+, en la puerta de linfocitos para las células estimuladas con IL-2. Las células positivas para Fosfo-STAT5 se midieron después de la apertura en las células CD33+. Los datos se analizaron por el uso del software FACSDiva y el porcentaje de inhibición de la estimulación de IL-6 o IFN α calculado es a partir del porcentaje de células positivas para Fosfo-STAT1 sobre las células CD4+. Para las células estimuladas con IL-2, los datos se analizaron por el uso del software FACSDiva y el porcentaje de inhibición de la estimulación de IL-2 se calculó a partir del porcentaje de células positivas para Fosfo-STAT1 sobre las células CD4+. Para las células estimuladas con GM-CSF, el porcentaje de inhibición de la estimulación con GM-CSF se calculó a partir del porcentaje de células positivas para Fosfo-STAT5 en células CD33+.

3.4.3. Resultados

45 Cuando se sometió a estos protocolos, el compuesto de acuerdo con la Fórmula I devolvió una IC₅₀ media de 11,9 μM sobre la fosforilación de STAT1 inducida por IL-6, en 6 donantes diferentes. En la fosforilación de STAT1 inducida por IFN α , la IC₅₀ media se evaluó para ser 15,4 μM en 6 donantes diferentes. En la fosforilación de STAT5 inducida por IL-2, la IC₅₀ media se evaluó para ser 19,6 μM en 5 donantes diferentes. En la fosforilación de STAT5 inducida por GM-CSF, la media IC₅₀ se evaluó para ser mayor de 100 μM en 7 donantes diferentes.

Ejemplo 4. Modelos in vivo

4.1. Modelo 1 de CIA

4.1.1. Materiales

50 Se adquirieron adyuvante completo de Freund (CFA, por su sigla en inglés) y adyuvante incompleto de Freund (IFA, por su sigla en inglés) de Difco. Se obtuvieron colágeno bovino de tipo II (CII), lipopolisacárido (LPS), y Enbrel® de Chondrex (Isle d'Abeau, Francia); Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, Francia), Whyett (jeringa inyectable de 25 mg,

Francia), Whyett (jeringa inyectable de 25 mg, Francia), Acros Organics (Palo Alto, CA), respectivamente. Todos los demás reactivos utilizados eran de grado reactivo y todos los disolventes eran de calidad analítica.

4.1.2. Animales

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

4.1.3. Artritis inducida por colágeno (CIA)

10 Un día antes del experimento, se preparó una solución de CII (2 mg/ml) con 0,05 M de ácido acético y se almacenó a 4 °C. Justo antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes iguales de adyuvante (IFA) y CII por medio de un homogeneizador en una botella de vidrio enfriada previamente en un baño de agua helada. Pueden ser necesarios adyuvante adicional y una homogeneización prolongada si no se formó una emulsión. 0,2 ml de la emulsión se inyectaron por vía intradérmica en la base de la cola de cada rata en el día 1, una inyección intradérmica como segundo refuerzo (solución de CII a 2 mg/ml en 0,1 ml de solución salina CFA) se llevó a cabo en el día 9. Este método de inmunización se modificó a partir de los métodos publicados (Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005).

15 4.1.4. Diseño del estudio

Los efectos terapéuticos de los compuestos se ensayaron en el modelo de CIA de rata. Las ratas se dividieron de manera aleatoria en grupos iguales y cada grupo contenía 10 ratas. Todas las ratas se inmunizaron en el día 1 y se reforzaron en el día 9. La dosificación terapéutica duró desde el día 16 al día 30. El grupo de control negativo se trató con vehículo (MC 0,5%) y el grupo de control positivo con Enbrel® (10 mg/kg, 3 veces por semana., s.c.). Un compuesto de interés se ensayó de manera típica a 3 dosis, por ej., 6, 10, 60 mg/kg, q.d., p.o.

20 4.1.5. Evaluación clínica de la artritis

25 La artritis se puntuó de acuerdo con el método de Khachigian 2006, Lin *et al.* 2007 y Nishida *et al.* 2004). La hinchazón de cada una de las cuatro patas se clasificó con la puntuación artrítica de la siguiente manera: 0 – sin síntomas; 1 – enrojecimiento e hinchazón leve, pero definido de un tipo de articulación tales como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparente limitado a los dígitos individuales, de manera independiente del número de dígitos afectados; 2 – enrojecimiento e hinchazón moderado de dos o más tipos de articulaciones; 3 – enrojecimiento e hinchazón severo de toda la pata que incluyen dígitos; 4 – extremidad máximamente inflamada con afectación de múltiples articulaciones (máxima puntuación de artritis clínica acumulada de 16 por animal) (Nishida *et al.*, 2004).

30 Para permitir el meta-análisis de múltiples estudios, los valores de puntuación clínica se normalizaron de acuerdo con lo presentado a continuación:

35 AUC de la puntuación clínica (puntuación AUC): El área bajo la curva (AUC) del día 1 al día 14 se calculó para cada rata individual. El AUC de cada animal se dividió por el AUC medio obtenido para el vehículo en el estudio de la que se obtuvieron y se multiplicaron por 100 los datos de ese animal (es decir, el AUC se expresó como un porcentaje del AUC media de los vehículos por estudio).

El incremento de puntuación clínica del día 1 al día 14 (puntuación del punto final): La diferencia de la puntuación clínica para cada animal se dividió por la diferencia promedio de la puntuación clínica obtenida para el vehículo en el estudio del que se obtuvieron los datos de ese animal y se multiplicó por 100 (es decir, la diferencia se expresó como porcentaje de la diferencia promedio de la puntuación clínica para el vehículo por estudio).

40 4.1.6. Cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis

45 Clínicamente, la pérdida de peso corporal se asoció con la artritis (Shelton *et al.*, 2005; Argiles *et al.*, 1998; Rall, 2004; Walsmith *et al.*, 2004). Por lo tanto, los cambios en el peso corporal después de la aparición de la artritis se pueden utilizar como un punto final no específica para evaluar el efecto de la terapéutica en el modelo de rata. El cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis se calculó de acuerdo con lo presentado a continuación:

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

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

50 4.1.7. Radiología

Se tomaron fotos de rayos X de las patas traseras de cada animal individual. Un número de identificación ciego aleatorio se asignó a cada una de las fotos, y la gravedad de la erosión ósea se clasificó por dos puntuadores independientes con sistema de puntuación del Larsen radiológico de acuerdo con lo presentado a continuación: 0 – normal con contornos óseos intactos y espacio normal de las articulaciones; 1 – ligera anomalía con uno cualquiera o dos de los huesos metatarsianos exteriores que muestra ligera erosión ósea; 2 – anomalía temprana definida con cualquiera de tres a cinco de los huesos metatarsianos exteriores que muestra una erosión ósea; 3 – anomalía destructiva media con todos los huesos metatarsianos exteriores, así como también uno o dos cualesquiera de los huesos metatarsianos interiores que muestra erosiones óseas definidas; 4 – anomalía destructiva severa con todos los huesos metatarsianos que muestran una erosión ósea definida y por lo menos una de las articulaciones de los metatarsianos interiores completamente erosionada que deja parte de contornos de articulación ósea parcialmente conservada; 5 – anomalía de mutilación sin contornos óseos. Este sistema de puntuación fue una modificación de Salvemini *et al.*, 2001; Bush *et al.*, 2002; Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005.

4.1.8. Histología

Después del análisis radiológico, las patas traseras de los ratones se fijaron en formalina al 10% tamponada con fosfato (pH 7,4), se descalcificaron con descalcificante óseo rápido para una buena histología (Laboratorios Eurobio) y se sumergió en parafina. Para garantizar una amplia evaluación de las articulaciones artríticas, por lo menos se cortaron cuatro secciones en serie (5 µm de espesor) y cada serie de secciones fue de 100 µm en el medio. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los exámenes histológicos para la inflamación sinovial y daño en los huesos y el cartílago se llevaron a cabo por el uso de un protocolo doble ciego. En cada pata, se evaluaron cuatro parámetros por el uso de una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron la infiltración celular, la gravedad del pannus, la erosión del cartílago y la erosión ósea. La puntuación se llevó a cabo en consecuencia, de acuerdo con lo presentado a continuación: 1 – normal, 2 – leve, 3 – moderada, 4 – marcada. Las cuatro puntuaciones se sumaron y se representaron como una puntuación adicional, a saber, la “puntuación total de RA”.

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

La degradación ósea observada en RA se produce en especial en el hueso cortical y puede ser revelada por el análisis de µCT (Sims NA *et al.*, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 2338 a 2346: *Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis*; Oste L *et al.*, ECTC Montreal 2007: *A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry*). Después de la exploración y la reconstrucción de volumen 3D del hueso calcáneo, la degradación ósea se midió como el número de objetos discretos presentes por diapositiva, se aisló en sílice perpendicular al eje longitudinal del hueso. Cuanto más se degradó el hueso, se midieron los objetos más discretos. 1000 cortes, se analizaron distribuidos de manera uniforme a lo largo del calcáneo (espaciados por aproximadamente 10,8 µm).

4.1.10. PK de Estado Constante

En el día 7 u 11, se recogieron muestras de sangre en el seno retro-orbital con heparina de litio como anticoagulante en los siguientes puntos de tiempo: antes de la dosis, 1, 3 y 6 h. Las muestras de sangre entera se centrifugaron y las muestras de plasma resultantes se almacenaron a -20 °C a la espera del análisis. Las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de ensayo se determinaron por un método LC-MS/MS en el que el espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de electronebulización positiva. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon por el uso de Winnonlin® (Pharsight®, Estados Unidos) y se supuso que los niveles plasmáticos de predosis eran iguales a los niveles de plasma de 24 h.

4.1.11. Resultados

El compuesto de acuerdo con la Fórmula I mostró mejoras estadísticamente significativas en los valores de puntuación clínicos normalizados (calculado como AUC o como la diferencia del día 1 al día 14) a una dosis de 60 mg/kg como se muestra en la Figura 1 y la Tabla I.

Tabla I: Puntuación Clínica CIA de Rata después del tratamiento con los compuestos descritos en la presente memoria.

Día	18	19	20	21	24	25	26	27	28
Vehículo	2,9	3,8	6,0	6,0	6,4	6,3	6,3	6,3	6,4
Fórmula II (6 mg/kg)	3,0	3,6	4,2	5,1	5,2	5,1	4,9	5,2	5,4
Fórmula I (60 mg/kg)	2,9	4,4	5,0	3,9	4,5	4,3	3,8	3,7	3,3
Fórmula II (6 mg/kg) + Fórmula I (60 mg/kg)	3,0	3,6	4,4	4,5	4,5	4,1	3,9	4,3	3,6

4.2. *Modelo 2 de CIA*

4.2.1. *Animales*

Se obtuvieron ratas Lewis hembra (n = 76) que pesaban de 165 a 194 gramos (media aprox. 178 g) sobre la artritis día 0 de Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, (Núm. de ref. 393739). Los animales se identificaron con un número distinto en la base de la cola para delinear el grupo y el número de animal.

A su llegada, los animales fueron alojados 4/jaula en caja de zapatos jaulas de policarbonato y se aclimataron durante 8 días antes de ser inmunizados con colágeno de tipo II. No se dieron medicamentos concurrentes.

Durante los periodos de aclimatación y de estudio, los animales fueron alojados en un entorno de laboratorio con temperaturas que oscilan de 19 a 25 °F (-7,2 a -3,9 °C) y una humedad relativa de 30% a 70%. Los temporizadores automáticos proporcionaron 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento y agua.

4.2.2. *Artritis inducida por colágeno (CIA)*

4.2.2.1. *Preparación*

Se anestesiaron ratas Lewis hembra aclimatadas con Isoflurano y recibieron inyecciones subcutáneas/intradérmicas (SC/ID) con 300 µL de adyuvante incompleto de Freund (Difco, Detroit, MI) que contiene 2 mg ml de colágeno/bovino de tipo II (Elastin Products, Owensville, Missouri) en la base de la cola y 2 sitios en la parte posterior en el día -9 y en el día -3.

El colágeno se preparó al hacer una solución de 4 mg/ml en 0,01 N de ácido acético. Los volúmenes iguales de colágeno y adyuvante incompleto de Freund, se emulsionaron por medio de la mezcla a mano hasta que una gota de este material mantenía su forma cuando estaba posicionado en agua. Cada animal recibió 300 µL de la mezcla en cada ocasión dividido en 3 sitios subcutáneos en la parte posterior.

4.2.2.2. *Estudio*

En el día de estudio 1, se produjo el inicio de la artritis y los animales se aleatorizaron en grupos de tratamiento. Después de la aleatorización, todas las jaulas se marcaron con número de protocolo, número de grupo, y número de animal. La aleatorización en cada grupo se hizo después de que la hinchazón del tobillo de las articulaciones, estaba evidentemente establecida y había buena evidencia de enfermedad bilateral.

Los animales con artritis por colágeno de tipo II establecida se trataron diariamente (QD) por la vía oral (PO) durante 13 días con vehículo (metilcelulosa al 0,5% (p/v)), o con los productos activos preparados en metilcelulosa, 0,5% (p/v). La dosificación oral se inició en el día de artritis 1 y continuó cada día (QD a intervalos de 24 h) hasta el día 13. Los animales se sacrificaron en el día de la artritis 14.

4.2.2.3. *Evaluación clínica de la artritis*

La gravedad de la artritis se evaluó por medio de la medición del diámetro de ambos tobillos en los animales. Las mediciones de calibre de los tobillos se tomaron cada día comenzando en el día 0, con un micrómetro Digitrix II (Fowler y NSK). Las mediciones al principio del estudio fueron tomadas por el uso de un tobillo con los valores redondeados a una milésima de pulgada. Las mediciones se confirmaron como clínicamente normales (0,260 a 0,264 in (0,660 a 0,670 cm)) por medio de la comparación con los valores históricos para ratas en base a un intervalo de pesos corporales. Las mediciones al principio del estudio se aplicaron a ambos tobillos, y estos valores se mantuvieron con el animal tanto tiempo como el tobillo fuera clínicamente normal con buena definición de todos los huesos del tobillo y sin evidencia de inflamación. Los animales se sacrificaron en el día 14.

4.2.2.4. *Compuestos, dosis y resultados*

Los compuestos se ensayaron de manera individual y en combinación a diferentes dosis, que se enumeran en la Tabla II a continuación.

Tabla II: Compuestos y dosis ensayadas en el segundo modelo de CIA

Compuestos	Dosis	Grupo
PO de control, QD	-	A
Vehículo (MC, 0,5%, p/v)	5 ml/kg	B

Compuestos	Dosis	Grupo
Fórmula II	1 mg/kg	C
	3 mg/kg	D
	10 mg/kg (*)	E
	30 mg/kg (*)	F
Fórmula I	25 mg/kg (*)	G
	50 mg/kg (*)	H
Fórmula II + Fórmula I	3 mg/kg (Fórmula II) +25 mg/kg (Fórmula I), (*)	I

(* = $P \leq 0,05$ de ANOVA con el control de vehículo)

4.2.2.5. Conclusión

- 5 Las mediciones del diámetro del tobillo indican que la administración de la combinación del compuesto de acuerdo con la Fórmula I (25 mg/kg) y la Fórmula II (3 mg/kg) proporciona un efecto más fuerte que el efecto obtenido con el compuesto de acuerdo con la Fórmula I (25 mg/kg) solo o el compuesto de acuerdo con la Fórmula II (3 mg/kg) solo, como se muestra en la Figura 2 y en la Tabla III a continuación.

Tabla III: Evolución del diámetro del tobillo (pulgadas (cm)) en el modelo de CIA de rata después del tratamiento con los compuestos descritos en la presente memoria.

Días	Grupos							
	A	B	C	D	E	F	G	H
0	0,2635 (0,6693)	0,2628 (0,6675)	0,2625 (0,6668)	0,2623 (0,6662)	0,2626 (0,6670)	0,2620 (0,6655)	0,2629 (0,6678)	0,2624 (0,6665)
1	0,2635 (0,6693)	0,2717 (0,6901)	0,2716 (0,6899)	0,2718 (0,6904)	0,2718 (0,6904)	0,2718 (0,6904)	0,2717 (0,6901)	0,2718 (0,6904)
2	0,2635 (0,6693)	0,2780 (0,7061)	0,2755 (0,6998)	0,2755 (0,6998)	0,2744 (0,6970)	0,2679 (0,6805)	0,2747 (0,6977)	0,2705 (0,6871)
3	0,2635 (0,6693)	0,2865 (0,7277)	0,2869 (0,7287)	0,2869 (0,7287)	0,2808 (0,7132)	0,2683 (0,6815)	0,2826 (0,7178)	0,2814 (0,7148)
4	0,2635 (0,6693)	0,2980 (0,7569)	0,2990 (0,7595)	0,2957 (0,7511)	0,2850 (0,7239)	0,2708 (0,6878)	0,2892 (0,7346)	0,2886 (0,7330)
5	0,2635 (0,6693)	0,3109 (0,7897)	0,3106 (0,7889)	0,3058 (0,7767)	0,2921 (0,7419)	0,2698 (0,6853)	0,2973 (0,7551)	0,2970 (0,7544)
6	0,2635 (0,6693)	0,3246 (0,8245)	0,3231 (0,8207)	0,3168 (0,8047)	0,3000 (0,7620)	0,2696 (0,6848)	0,3064 (0,7782)	0,3061 (0,7775)
7	0,2635 (0,6693)	0,3290 (0,8357)	0,3296 (0,8372)	0,3205 (0,8141)	0,3031 (0,7699)	0,2706 (0,6873)	0,3108 (0,7894)	0,3110 (0,7899)

Días	Grupos							
	A	B	C	D	E	F	G	H
8	0,2635 (0,6693)	0,3301 (0,8384)	0,3291 (0,8359)	0,3259 (0,8278)	0,3108 (0,7894)	0,2741 (0,6962)	0,3150 (0,8001)	0,3160 (0,8026)
9	0,2635 (0,6693)	0,3260 (0,8280)	0,3268 (0,8301)	0,3216 (0,8169)	0,3119 (0,7922)	0,2721 (0,6911)	0,3089 (0,7846)	0,3085 (0,7836)
10	0,2635 (0,6693)	0,3227 (0,8196)	0,3270 (0,8306)	0,3197 (0,8120)	0,3122 (0,7930)	0,2706 (0,6873)	0,3046 (0,7737)	0,3032 (0,7701)
11	0,2635 (0,6693)	0,3187 (0,8095)	0,3185 (0,8090)	0,3156 (0,8016)	0,3090 (0,7849)	0,2711 (0,6886)	0,3025 (0,7684)	0,3041 (0,7724)
12	0,2635 (0,6693)	0,3186 (0,8092)	0,3178 (0,8072)	0,3165 (0,8039)	0,3070 (0,7798)	0,2685 (0,6820)	0,3006 (0,7635)	0,3039 (0,7719)
13	0,2635 (0,6693)	0,3186 (0,8092)	0,3185 (0,8090)	0,3175 (0,8064)	0,3069 (0,7795)	0,2684 (0,6817)	0,2996 (0,7610)	0,3014 (0,7656)
14	0,2635 (0,6693)	0,3216 (0,8169)	0,3226 (0,8194)	0,3174 (0,8062)	0,3066 (0,7788)	0,2679 (0,6805)	0,3016 (0,7661)	0,2999 (0,7617)

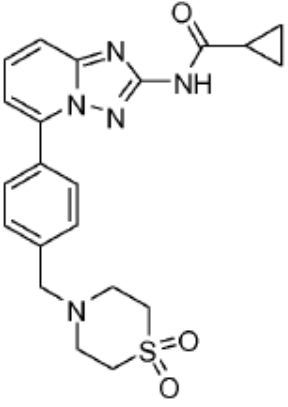
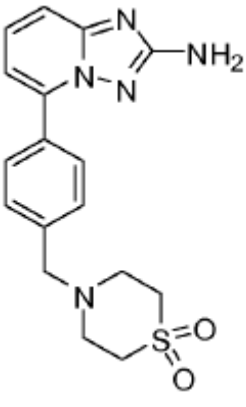
Ejemplo 5. Estudios Farmacocinéticos

5.1. Estudio de metabolismo *in vitro*

5 Un estudio que compara el metabolismo de [¹⁴C]-compuesto de acuerdo con la Fórmula II en los hepatocitos de ratón, rata, perro y humano, demuestra claramente que el compuesto de acuerdo con la Fórmula II era estable en todas las especies, y confirma que el grado de metabolismo fue bajo en todas las especies, con por lo menos 80% del compuesto de acuerdo con la Fórmula II después de 24 horas, como se muestra en la Figura 3.

10 La Tabla IV muestra el perfil metabólico radiométrico del compuesto de acuerdo con la Fórmula II, en los hepatocitos de especies humanas y animales, que muestran un metabolito principal (el compuesto de acuerdo con la Fórmula I, 11%) y dos menores (no caracterizados, < 1,0%, visible en cromatogramas).

Tabla IV: Perfil metabólico *in vitro* del compuesto de acuerdo con la Fórmula II

Estructura			Metabolito 2	Metabolito 3
Ratón	85%	14%	< 1,0%	< 1,0%
Rata	86%	12%	< 1,0%	< 1,0%
Perro	93%	5,7%	< 1,0%	1,0%
Humano	88%	11,2%	< 1,0%	< 1,0%

5.2. Estudios *in vivo*

5.2.1. Farmacocinética de dosis única en animales

- 5 Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos en diversas especies animales dosificados con el compuesto de acuerdo con la Fórmula II para determinar la exposición al compuesto de acuerdo con la Fórmula I, así como también su vida media terminal aparente ($T_{1/2}$), cuando sea posible.

5.2.1.1. Protocolo

5.2.1.1.1 Animales

- 10 Se aclimataron ratas Sprague-Dawley (machos, de 200 a 250 g), ratones CD1 (machos, de 25 a 30 g), perros Beagle (machos, de 9 a 10 kg), minicerdos Göttingen (machos, 10 a 15 kg) y conejos blancos de Nueva Zelanda (machos, de 3 a 5 kg) durante por lo menos 7 días antes del tratamiento y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (07:00 a 19:00).

La temperatura se mantuvo a aproximadamente 22 °C, y el alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

15 5.2.1.1.2. Estudio farmacocinético

El compuesto de acuerdo con la Fórmula I se formuló en 0,5% de metilcelulosa y se dosificó por vía oral a 3 o 6 animales como una sola alimentación forzada de esófago en dosis que variaba de 15 a 180 mg/kg bajo un volumen de dosificación de 5 o 10 ml/kg.

- 20 El compuesto de acuerdo con la Fórmula II se formuló en 0,5% de metilcelulosa y se dosificó por vía oral a 3 animales (o 3 ratón/puntos de tiempo) como una sola alimentación forzada de esófago en dosis que variaba de 15 a 45 mg/kg bajo un volumen de dosificación de 5 o 10 ml /kg.

- 25 Las muestras de sangre se recogieron durante un período de 24 h a través de la vena yugular (perro, minicerdo), vaso sanguíneo oreja (conejo), punción cardiaca (ratón) o el seno retro-orbital (rata) con heparina de litio como anticoagulante. Las muestras de sangre entera se centrifugaron y las muestras de plasma resultantes se almacenaron a – 20 °C a la espera del análisis.

5.2.1.1.3. Cuantificación de los niveles de compuesto en el plasma

Las concentraciones plasmáticas del compuesto de acuerdo con la Fórmula I y del compuesto de acuerdo con la Fórmula II se determinaron por un método LC-MS/MS con un límite de cuantificación $\leq 10,0$ ng/ml tanto para la Fórmula I como para la Fórmula II para todas las especies.

5.2.1.1.4. *Determinación de los parámetros farmacocinéticos*

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon por el uso de un paquete de análisis estadístico (WinNonLin (Pharsight, Sunnyvale, California: CA 94086, EE.UU.).

5.2.1.2. *Resultados*

5 5.2.1.2.1. *Resultados tras la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula I solo*

Por el uso del protocolo descrito con anterioridad, el AUC y la vida media terminal aparente se determinaron como se muestra a continuación en la Tabla V.

Tabla V: Exposición y vida media terminal aparente en diversas especies después de la administración del compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I.

Especies	Dosis (mg/kg)	AUC (µg.h/ml)	Vida media terminal aparente (hs)
Rata	20	19,7 (Machos)	7
		25,2 (Hembras)	
	60	102 (Machos)	
		123 (Hembras)	
180	376 (Machos)		
	541 (Hembras)		
Perro (Machos)	10	49,4	9
	25	114	
	50	290	
Conejo (Hembras)	125	777	No determinado
	250	1029	

10

Los resultados presentados en la Tabla V muestran que el compuesto de acuerdo con la Fórmula I cuando se dosifica en su propio se absorbe con facilidad, y por lo tanto está expuesto *in vivo*.

5.2.1.2.2. *Resultados tras la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula II solo*

15 Tras la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula II, la vida media de eliminación terminal aparente del compuesto de acuerdo con la Fórmula I se determinó en los ratones (2,1 h) y los conejos (4,6 h).

5.2.2. *Farmacocinética de dosis única en humanos*

5.2.2.1. *Protocolo*

20 Los sujetos recibieron la dosis única (10, 25, 50, 100, o 200 mg) del compuesto de acuerdo con la Fórmula II como cápsulas después de un desayuno alto en calorías y rico en grasas (recomendación de la FDA: un alto contenido de grasa (aproximadamente 50 por ciento del contenido calórico total del alimento), y alto en calorías (aproximadamente de 800 a 1000 calorías). Una alimento de ensayo de ejemplo sería de dos huevos fritos en mantequilla, dos tiras de tocino, dos cortes de pan tostado con mantequilla, cuatro onzas de croquetas de patatas y ocho onzas de leche entera. Las sustituciones en este alimento de ensayo se pueden llevar a cabo con la condición de que el alimento proporcione una cantidad similar de calorías procedentes de proteínas, hidratos de carbono y
25 grasa y tenga un volumen de alimento y viscosidad comparables.

30 Se recogieron muestras de sangre en serie durante 72 h para determinar las concentraciones plasmáticas de los compuestos de acuerdo con la Fórmula II y la Fórmula I por el uso de un método validado de cromatografía líquida – espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS/MS) con un límite de cuantificación de 1,00 ng/ml. Los parámetros PK se evaluaron por el uso de un paquete de análisis estadístico (WinNonLin (Pharsight, Sunnyvale, California: CA 94086, EE.UU.).

5.2.2.2. Resultados de eliminación plasmática

Se midieron los perfiles de concentración-tiempo en plasma medio del compuesto de acuerdo con la Fórmula II y el compuesto de acuerdo con la Fórmula I.

5 La eliminación del compuesto de acuerdo con la Fórmula II a lo largo del tiempo exhibió un perfil bifásico con una vida media de eliminación terminal aparente media de aproximadamente 5 a 8 h.

En contraste, la eliminación plasmática del compuesto de acuerdo con la Fórmula I exhibió un perfil monofásico con una vida media de eliminación terminal aparente que variaba de 21 a 27 h.

5.2.2.3. Exposición al compuesto de acuerdo con la Fórmula II y la Fórmula I.

10 Con el fin de mostrar las exposiciones comparativas de los dos compuestos, se calculó el AUC de los compuestos de acuerdo con la Fórmula I y el compuesto de acuerdo con la Fórmula II. El valor del AUC representa la exposición total del compuesto en las especies después de la dosificación. Estos valores se expresaron entonces como una relación de AUC del compuesto de acuerdo con la Fórmula I: el AUC del compuesto de acuerdo con la Fórmula II en la Figura 4. A partir de esta relación se puede observar con claridad que no había una diferencia significativa en la exposición a un compuesto de acuerdo con la Fórmula I después de la administración de un compuesto de acuerdo con la Fórmula II en humanos en comparación con la exposición observada en animales de dosis terapéuticamente equivalentes. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que esta diferencia se relaciona con la diferencia en la vida media terminal aparente en las diferentes especies.

Tabla VI: Proporción entre la exposición (expresada como AUC) para [Fórmula I]:[Fórmula II] medida en la administración del compuesto de acuerdo con la Fórmula II.

Especies	Fórmula I	Fórmula II	Proporción I/II
Ratón (30 mg/kg)	11,4	7,3	1,56
Rata (45 mg/kg)	13,3	33,3	0,40
Perro (15 mg/kg)	10,6	44,9	0,24
Minicerdo (30 mg/kg)	16,7	19,1	0,88
Conejo (20 mg/kg)	10	26	0,38
Humano (10 mg)	2,89	0,128	22,58
Humano (25 mg)	7,22	0,331	21,81
Humano (50 mg)	14,6	0,735	19,86
Humano (100 mg)	26,9	1,69	15,92
Humano (200 mg)	57,6	4,5	12,8

20

5.2.3. Farmacocinética de dosis repetidas en humanos

5.2.3.1. Protocolo

Los sujetos recibieron dosis repetidas (25, 50 y 100 mg BID o 200, 300 y 450 mg QD) del compuesto de acuerdo con la Fórmula II como cápsulas después de un desayuno estándar durante 10 días.

25 Se recogieron muestras de sangre en serie a las 12 h (régimen BID) o 24 h (régimen QD) en el día 1 y 10 para determinar las concentraciones plasmáticas de los compuestos de acuerdo con la Fórmula II y la Fórmula I por el uso de un método validado de cromatografía líquida - espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS/MS) con un límite de cuantificación de 1,00 ng/ml para ambas Fórmulas. Los parámetros PK se evaluaron por el uso de un paquete de análisis estadístico (WinNonLin (Pharsight, Sunnyvale, California: CA 94086, EE.UU.).

30 5.2.3.2. Resultados de eliminación plasmática

Se midieron los perfiles de concentración-tiempo en plasma medio del compuesto de acuerdo con la Fórmula II y el compuesto de acuerdo con la Fórmula I.

La eliminación del compuesto de acuerdo con la Fórmula II a lo largo del tiempo exhibió un perfil bifásico con una vida media de eliminación terminal aparente media de aproximadamente 4 a 11 h.

En contraste, la eliminación plasmática del compuesto de acuerdo con la Fórmula I muestra un perfil monofásico con una vida media de eliminación terminal aparente media que variaba de 22 a 27 h.

5 5.2.3.3. *Exposición al compuesto de acuerdo con la Fórmula II y la Fórmula I.*

Con el fin de mostrar las exposiciones comparativas de los dos compuestos, se calculó el AUC de los compuestos de acuerdo con la Fórmula I y el compuesto de acuerdo con la Fórmula II. El valor del AUC representa la exposición en estado estacionario de los compuestos después de la dosificación repetida. La proporción de AUC del compuesto de acuerdo con la Fórmula I: AUC del compuesto de acuerdo con la Fórmula II se exhibe en la Tabla VII.

10 **Tabla VII:** Exposición (expresada como AUC en kg.h/ml) para la Fórmula II y Fórmula I medida tras la administración repetida del compuesto de acuerdo con la Fórmula II.

Régimen	BID			QD		
	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	300 mg	450 mg
Fórmula II	0,346	0,758	2,38	4,45	4,40	10,2
Fórmula I	8,66	15,2	41,1	70,0	66,1	102
Proporción I/II	24,4	20,5	18,3	16,1	15,0	10,1

5.2.4. *Conclusión*

15 El compuesto de acuerdo con la Fórmula I muestra un perfil muy similar en todas las especies *in vitro*. Sin embargo, inesperadamente, *in vivo*, este perfil fue muy diferente entre los humanos y otras especies animales, cuando la vida media terminal aparente era por lo menos 3 veces mayor en los humanos. Esta vida media terminal aparente da como resultado la acumulación del compuesto de acuerdo con la Fórmula I en humanos que ofrece la posibilidad de una amplia gama de frecuencia de régimen de dosificación, en particular, el régimen de dosificación de baja frecuencia, y más en particular de una vez al día a una vez cada dos semanas, más en particular de una vez al día a una vez por semana.

5.3. *Inhibición del objetivo*

El compuesto de acuerdo con la Fórmula II se dosificó diariamente en voluntarios sanos en 200 QD mg y 100 mg BID.

25 Los niveles resultantes de Fórmula II y Fórmula I se midieron entonces y se representaron gráficamente (Figura 5) como múltiplos de sus respectivos IC₅₀ como se determina por el ensayo de sangre completa que se describió con anterioridad en el Ejemplo 3.4.

30 Tanto la Fórmula II y la Fórmula I fueron activos solos en el modelo de CIA de rata. De manera sorprendente, como se muestra en la Figura 4, la administración del compuesto de la Fórmula II se asocia con 2 especies activas, la Fórmula I y Fórmula II. Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que la Fórmula II proporciona una rápida inhibición del objetivo, y el compuesto de acuerdo con la Fórmula I a continuación, se forma y se acumula de manera constante, por lo tanto da como resultado un nivel de fármaco por encima del nivel de la IC₅₀ a lo largo de casi 24 horas como se muestra en el pliegue acumulado de IC₅₀ en la Figura 6. Esto fue en particular inesperado, dado que se podría haber predicho tal perfil a partir del modelo en rata, ratón y conejo, donde no se produce tal acumulación.

35 **Tabla VIII:** Proporción calculada como [dosis circulante en sangre de los compuestos expresada como ng/ml] / [dosis circulante de los mismos compuestos en cantidad de IC₅₀].

Punto de tiempo (hs)	Fórmula II en 100 mg de BID			Fórmula II en 200 mg de QD		
	Fórmula II	Fórmula I	Fórmula I + Fórmula II	Fórmula II	Fórmula I	Fórmula I + Fórmula II
0	0,09	0,97	1,06	0,02	0,69	0,71
0,5	0,12	0,93	1,04	0,46	0,65	1,11
1	0,48	0,88	1,36	3,14	0,69	3,83

Punto de tiempo (hs)	Fórmula II en 100 mg de BID			Fórmula II en 200 mg de QD		
	Fórmula II	Fórmula I	Fórmula I + Fórmula II	Fórmula II	Fórmula I	Fórmula I + Fórmula II
2	1,28	0,97	2,25	3,88	0,84	4,72
3	1,71	1,00	2,71	3,16	0,96	4,12
5	0,88	1,13	2,01	1,31	1,00	2,31
8	0,26	0,96	1,22	0,36	0,93	1,29
12	0,09	0,86	0,94	–	–	–
12,5	0,12	0,93	1,04	–	–	–
13	0,48	0,88	1,36	–	–	–
14	1,28	0,97	2,25	–	–	–
15	1,71	1,00	2,71	–	–	–
17	0,88	1,13	2,01	–	–	–
20	0,26	0,96	1,22	–	–	–
24	0,09	0,86	0,94	0,11	0,84	0,95

Conclusiones generales

Los datos proporcionados en la presente solicitud demuestran que si bien el compuesto de acuerdo con la Fórmula I exhibe una potencia similar *in vitro* contra JAK1 y JAK2 en un ensayo bioquímico, el ensayo de selectividad de sangre entera *in vitro*, más cerca de las condiciones fisiológicas (Saharinen *et al.* 2000 *Mol. Cell. Biol.*, 20 (10), 3387), muestra que el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I exhibe una selectividad de más de 10 veces más para JAK1 sobre JAK2. De manera adicional, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I muestra un perfil inesperado *in vivo* en los humanos en comparación con lo que podría haber sido anticipado partir de los datos *in vitro* o a partir de datos *in vivo* en otras especies. En particular, el compuesto de acuerdo con la Fórmula I muestra una vida media terminal aparente significativamente más larga en los humanos que va de 21 a 27 h que no podría haber sido predicha por aquéllos con experiencia en la técnica, que puede dar como resultado ventajas que van desde régimen de dosificación de baja frecuencia y el incremento del cumplimiento del paciente. En particular, se podría reducir el impacto de la no adherencia, si el paciente olvida tomar una dosis.

Ejemplo 6. Protocolos adicionales

6.1. Solubilidad termodinámica

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

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

Después de 24 h, 800 µL de la muestra se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó 5 min a 14.000 rpm. 200 µL del sobrenadante de la muestra se transfirió luego a una Placa de Solubilidad MultiscreenR (Millipore, MSSLBPC50) y el sobrenadante se filtró (de 10 a 12" Hg (34-41 kPa)) con la ayuda de un colector de vacío en una placa de 96 pocillos polipropileno Greiner limpia de fondo en V (Núm. de Cat. 651201). 5 µL del filtrado se diluyeron en 95 µL (F20) del mismo tampón utilizado para incubar en la placa que contiene la curva estándar (Greiner, Núm. de Cat. 651201).

La curva estándar para el compuesto se preparó en DMSO recién a partir de una solución madre 10 mM de DMSO factor 2 diluido en DMSO (5000 µM) y después se diluyó de manera adicional en DMSO hasta 19,5 µM. 3 µL de la serie de dilución a partir de 5000 µM se transfirió a continuación a una mezcla de acetonitrilo-tampón 97 µL (50/50). El intervalo de concentración final es de 2,5 a 150 µM.

La placa se selló con esteras de estanqueidad (MA96RD-04S, Kinesis, Cambs, PE19 8YX, Reino Unido) y las muestras se midieron a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) bajo condiciones optimizadas por el uso de Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

Las muestras se analizan en LCMS con un caudal de 1 ml/min. Un disolvente es 15 mM de amoníaco y el disolvente B es acetonitrilo. La muestra se ejecutó bajo pulverización de iones positivos en una columna XBridge C₁₈ 3,5 µM

(2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 min y varía de 5% de B a 95% de B.

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

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

6.2. Solubilidad Acuosa

6.2.1. Solubilidad Acuosa, procedimiento de DMSO al 2%

10 Partiendo de una solución madre de 10 mM en DMSO, se preparó una dilución en serie del compuesto en DMSO. La serie de diluciones se transfirió a una placa 96 NUNC Maxisorb de fondo en F (Núm. de Cat. 442404) y se añadió 0,2 M de tampón de fosfato, pH 7,4 o 0,1 M de tampón de citrato, pH 3,0 a temperatura ambiente.

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

15 Las placas de ensayo se sellaron y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación a 230 rpm. Las placas luego se exploraron bajo un microscopio de luz blanca, para producir imágenes individuales del precipitado por concentración. El precipitado se analizó y se convirtió en un número que se representó en un gráfico. La primera concentración a la que el compuesto parece completamente disuelto es la concentración que se informa a continuación, sin embargo, la concentración real se encontrará en algún punto entre esta concentración y un paso de dilución más alto.

20 Los valores de solubilidad medidos de acuerdo con este protocolo se presentan en $\mu\text{g/ml}$.

6.2.2. Solubilidad Acuosa, procedimiento de DMSO al 3%

Partiendo de una solución madre 10 mM en DMSO, se preparó una dilución en serie del compuesto en DMSO. La serie de diluciones se transfirió a una placa 96 NUNC Maxisorb de fondo en F (Núm. de Cat. 442404) y se añadió 0,1 M de tampón de fosfato, pH 7,4 o 0,1 M de tampón de citrato, pH 3,0 a temperatura ambiente.

25 La concentración final estuvo en el intervalo de 300 μM a 18,75 μM en 5 pasos iguales de dilución. La concentración final de DMSO no superó el 3%. Se añadieron 200 μM de pireno a los puntos de esquina de cada placa de 96 pocillos y sirvió como punto de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

30 Las placas de ensayo se sellaron y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación a 230 rpm. Las placas luego se exploraron bajo un microscopio de luz blanca, para producir imágenes individuales del precipitado por concentración. El precipitado se analizó y se convirtió en un número con una herramienta de software que puede ser trazada en un gráfico. La primera concentración a la que el compuesto parece completamente disuelto es la concentración informada; sin embargo, la concentración real se encuentra en algún punto entre esta concentración y un paso de dilución más alto.

Los valores de solubilidad medidos de acuerdo con este protocolo se presentan en $\mu\text{g/ml}$.

35 6.3. Unión a Proteínas Plasmáticas (Diálisis de Equilibrio)

Una solución madre de 10 mM del compuesto en DMSO se diluyó con un factor de 5 en DMSO. Esta solución se diluyó de manera adicional en plasma de humanos, ratas, ratones o perros recién descongelado (BioReclamation INC) con una concentración final de 10 μM y la concentración final de DMSO de 0,5% (5,5 μL en 1094,5 μL de plasma en un PP-Masterblock de 96 pocillos (Greiner, Núm. de Cat. 780285))

40 Se preparó una placa de Dispositivo Pierce Rojo con insertos (ThermoScientific, Núm. de Cat. 89809) y se llenó con 750 μL de PBS en la cámara del tampón y 500 μL del plasma enriquecido en la cámara del plasma. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C con agitación a 230 rpm. Después de la incubación, 120 μL de ambas cámaras se transfirieron a 360 μL de acetonitrilo en una placa de pocillos profundos de PP de fondo redondo de 96 pocillos, (Nunc, Núm. de Cat. 278743) y se selló con una tapa de papel de aluminio. Las muestras se mezclaron y se
45 colocaron en hielo durante 30 min. Esta placa luego se centrifugó 30 min a 1200rcf a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a una placa PP 96 de fondo en V (Greiner, 651201) para el análisis de LCMS.

La placa se selló con esteras de sellado (MA96RD-04S) de Kinesis, Cambs, PE19 8YX, Reino Unido y las muestras se midieron a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) en condiciones optimizadas por el uso de Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

50 Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 ml/min. Un disolvente es 15 mM de amoníaco y el disolvente B es acetonitrilo. La muestra se ejecutó bajo pulverización de iones positivos en una columna XBridge C₁₈

de 3,5 μM (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 min y variaba de 5% de B a 95% de B.

5 El área pico del compuesto en la cámara del tampón y la cámara del plasma se consideró como 100% de compuesto. El porcentaje unido al plasma se derivó de estos resultados y se informó como porcentaje unido a plasma.

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

6.4. *Estabilidad microsomal*

6.4.1. *Procedimiento de incubación de 1 hora de estabilidad microsomal*

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

Se añadieron 40 μL de agua desionizada a un pocillo de un tubo de almacenamiento etiquetado con un código de barras 2D de Matriz de polipropileno (Thermo Scientific) y se incubaron previamente a 37 °C.

15 Se preparó una solución madre de trabajo de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) en 182 mM, pH 7,4 tampón de fosfato y se colocó sobre hielo antes de su uso. Un cofactor que contenía MgCl_2 , glucosa-6-fosfato y NADP^+ se preparó en agua desionizada y se colocó en hielo antes de su uso.

Una solución de trabajo final que contiene microsomas de hígado (Xenotech) de una especie de interés (humano, ratón, rata, perro), el G6PDH descrito con anterioridad y los cofactores se prepararon y esta mezcla se incubó durante no más de 20 min a temperatura ambiente.

20 30 μL de la dilución del compuesto calentado previamente se añadió a 40 μL de agua calentada previamente en los tubos de la matriz y se añadió a 30 μL de la mezcla microsomal. Las concentraciones de reacción finales son 3 μM de compuesto, 1mg de microsomas, 0,4 U/ml de GDPDH, 3,3 mM de MgCl_2 , 3,3 mM de glucosa-6-fosfato y 1,3 mM de NADP^+ .

25 Para medir el porcentaje restante de compuesto en el tiempo cero, se añadió MeOH o MeCN (1:1) al pocillo antes de añadir la mezcla microsomal. Las placas se sellaron con sellos de Matrix Septra (matriz, Núm. de Cat. 4464) y se agitó durante unos pocos segundos para asegurar la mezcla completa de todos los componentes.

Las muestras que no se detienen se incuban a 37 °C, 300 rpm y después de 1 hora de incubación la reacción se detiene con MeOH o MeCN (1:1).

30 Después de detener la reacción, las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 min para precipitar las proteínas. Las placas se centrifugaron a continuación 30 min a 1200 rcf a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a una placa PP 96 de fondo en V (Greiner, 651,201) para el análisis de LCMS.

Estas placas se sellaron con esteras de sellado (MA96RD-04S) de Kinesis, Cambs, PE19 8YX, Reino Unido y las muestras se midieron a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525 de Waters) en condiciones optimizadas por el uso de Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula parental.

35 Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A es 15 mM de amoníaco y el disolvente B es metanol o acetonitrilo, en función de la solución de parada utilizada. Las muestras se ejecutan bajo pulverización de iones positivos en una columna XBridge de C_{18} 3,5 μM (30 mm 2,1 x), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 min y varía desde 5% de B a 95% de B.

40 El área del pico del compuesto original en el tiempo 0 se considera que es 100% restante. El porcentaje restante después de la incubación de 1 hora se calcula desde el tiempo 0 y se calcula como el porcentaje restante. La solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en tampón se inspeccionó por medio de un microscopio y los resultados se informaron.

Los datos sobre la estabilidad microsomal se expresan como un porcentaje de la cantidad total de compuesto que queda después de 60 min.

45 6.4.2. *Procedimiento de incubación de 30 min para estabilidad microsomal*

Una solución madre de 10 mM de compuesto en DMSO se diluyó a 6 μM en un tampón de fosfato 105 mM, pH 7,4 en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, Núm. de Cat. 780285) y se calentó previamente a 37 °C.

50 Una solución madre de trabajo de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH, Roche, 10127671001) de 700U/ml se diluyó con un factor de 1:700 en un tampón de fosfato de 105 mM, pH 7,4. Una mezcla cofactor que contenía 0,528M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, M2670), 0,528M de glucosa-6-fosfato (Sigma, G-7879) y 0,208M NADP^+ (Sigma, N-

0505) se diluyó con un factor de 1:8 en un tampón de fosfato 105 mM, pH 7,4.

Se hizo una solución de trabajo que contiene microsomas de hígado de 1 mg/ml (Proveedor: Xenotech) de las especies de interés (humano, ratón, rata, perro, ...), 0,8U/ml de G6PDH y la mezcla de cofactor (6,6 mM de MgCl₂, 6,6 mM de glucosa-6-fosfato, 2,6 mM de NADP+). Esta mezcla se incubó previamente durante 15 min, pero nunca más de 20 min, a temperatura ambiente.

Después de la incubación previa, la dilución del compuesto y la mezcla que contiene los microsomas se añadieron juntas en la misma cantidad y se incubaron durante 30 min a 300 rpm. Para el punto de tiempo de 0 min, se añadieron dos volúmenes de metanol a la dilución del compuesto antes de añadir la mezcla de microsomas. La concentración final durante la incubación son: 3 µM de compuesto de ensayo o compuesto de control, 0,5 mg de microsomas/ml, 0,4 U/ml de G6PDH, 3,3 mM de MgCl₂, 3,3 mM de glucosa-6-fosfato y 1,3 mM de NADP+.

Después de 30 min de incubación, la reacción se detuvo con 2 volúmenes de metanol.

A partir de ambos puntos de tiempo, las muestras se mezclaron, se centrifugaron y el sobrenadante se recogió para el análisis de LC-MS/MS. Las respuestas del instrumento (es decir, la altura de los picos) hacen referencia a las muestras de punto de tiempo-cero (como 100%) con el fin de determinar el porcentaje de compuesto restante. Los compuestos estándar Propanolol y Verapamilo están incluidos en el diseño de ensayo.

Los datos sobre la estabilidad microsomal se expresan como un porcentaje de la cantidad total de compuesto que queda después de 30 min.

La estabilidad de los hepatocitos (concentraciones del compuesto de acuerdo con la Fórmula II y sus principales metabolitos (como % de la radiactividad total) después de la incubación de 24 h de 100 µM [¹⁴C]-compuesto de acuerdo con la Fórmula II en la suspensión de hepatocitos de diferentes especies).

6.5. Permeabilidad de Caco2

Se llevaron a cabo ensayos de Caco-2 bidireccionales como se describe a continuación. Las células de Caco-2 se obtienen a partir de una Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, cat. 86010202) y se utilizaron después de un cultivo de células de 21 días en placas Transwell® de 24 pocillos (Fisher TKT-545-020B).

2x10⁵ células/pocillo se sembraron en un medio de siembra que consiste en DMEM + GlutaMAXI + 1% NEAA + 10% de FBS (FetalClone II) + 1% Pen/Strep. El medio se cambia cada 2 a 3 días.

Los compuestos de ensayo y de referencia (propranolol y rodamina 123 o vinblastina, todos adquiridos de Sigma) se prepararon en solución salina equilibrada de Hanks que contenía 25 mM de HEPES (pH 7,4) y se añadieron a las cámaras ya sea apicales (125 µL) o basolaterales (600 µL) del montaje de placas Transwell a una concentración de 10 µM con una concentración final de DMSO de 0,25%.

50 µM de Amarillo Lucifer (Sigma) se añadió al tampón de donantes en todos los pocillos para evaluar la integridad de las capas de células por medio del monitoreo de la permeación de Amarillo Lucifer. Dado que el Amarillo Lucifer (LY, por su sigla en inglés) no puede penetrar libremente las barreras lipofílicas, un alto grado de transporte LY indica una pobre integridad de la capa de células.

Después de una incubación de 1 hora a 37 °C con agitación a un agitador orbital a 150 rpm, alícuotas de 70 µL se toman tanto de cámaras apicales (A) como basales (B) y se añaden a una solución de 100 µL de 50:50 de acetonitrilo:agua que contiene un patrón analítico interno (0,5 µM de carbamazepina) en una placa de 96 pocillos.

El Amarillo Lucifer se mide con un Spectramax Gemini XS (Ex 426nm y Em 538nm) en una placa limpia de 96 pocillos que contiene 150 µL de líquido desde el lado basolateral y apical.

Las concentraciones de compuesto en las muestras se miden por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento/espectroscopia de masas (LC-MS/MS).

Los valores de permeabilidad aparente (Papp) se calculan a partir de la relación:

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

V = volumen de la cámara

Tinc = tiempo de incubación.

Superficie = 0,33 cm²

Las relaciones de flujo, como una indicación del flujo activo de la superficie celular apical, se calculan por el uso de la relación de Papp B>A / Papp A>B.

Se utilizan los siguientes criterios de aceptación del ensayo:

Propranolol: valor de Papp (A>B) ≥ 20 ($\times 10^{-6}$ cm/s)

Rodamina 123 o Vinblastina: valor de Papp (A>B) < 5 ($\times 10^{-6}$ cm/s) con una proporción de eflujo ≥ 5

Permeabilidad del amarillo Lucifer: ≤ 100 de nm/s

5 6.6. *Modelo de shock séptico*

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

10 Seis ratones hembra BALB/cJ (20 g) por grupo se trataron en la dosificación destinada una vez, po. Treinta minutos más tarde, LPS (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$; serotipo E. Coli 0111:B4) se inyectó i. p. Noventa minutos más tarde, los ratones se sacrificaron y se recolectó la sangre. Los niveles circulantes de TNF alfa se determinaron por el uso de kits de ELISA disponibles en el mercado. Se utilizó dexametasona (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) como un compuesto antiinflamatorio de referencia.

6.7. *Modelo MAB*

15 El modelo MAB permite una evaluación rápida de la modulación de una respuesta inflamatoria similar a RA por la terapéutica (Khachigian L. M., *Nature Protocols* (2006) 2512 a 2516: *Collagen antibody-induced arthritis*). Se inyectaron ratones DBA/J i.v. con un cóctel de mAbs dirigido contra el colágeno II. Un día después, se inició el tratamiento el compuesto (vehículo: 10% (v/v) HP β CD). Tres días después, los ratones recibieron una inyección i.p. de LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), lo que resulta en un rápido inicio de la inflamación. El tratamiento con el compuesto se continúa hasta 10 días después de la inyección de mAb. La inflamación se lee por medio de la medición de la hinchazón de la pata y el registro de la puntuación clínica de cada pata. La puntuación de la artritis clínica acumulada de cuatro extremidades se presenta para mostrar la gravedad de la inflamación. Un sistema de puntuación se aplica a cada extremidad por el uso de una escala de 0 a 4, donde 4 es la inflamación más severa.

0 Libre de síntomas

25 1 Enrojecimiento e hinchazón leve, pero definitiva de un tipo de articulación tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento aparente y una hinchazón limitada a los dígitos individuales, de manera independiente del número de dígitos afectados

2 Enrojecimiento e hinchazón moderada de dos o más tipos de articulaciones

3 Enrojecimiento e inflamación severos de la totalidad de los dígitos de la pata que incluyen

4 Extremidad máximamente inflamada con afectación de múltiples articulaciones

6.8. *Modelos de oncología*

30 Los modelos *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas hacia las enfermedades mieloproliferativas impulsadas por JAK2 se describen en Wernig *et al. Cancer Cell* 13, 311, 2008 y Geron *et al. Cancer Cell* 13, 321, 2008.

6.9. *Modelo de IBD de ratón*

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

6.10. *Modelo de Asma de ratón*

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

Observaciones finales

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

45 Por lo menos algunos de los nombres químicos de los compuestos de la invención como se presentan y se exponen en esta solicitud, se pueden haber generado de manera automatizada por el uso de un programa de software de nomenclatura química disponible comercialmente, y no se han verificado de manera independiente. Los programas representativos que llevan a cabo esta función incluyen la herramienta de nomenclatura Lexichem comercializada por Open Eye Software, Inc. y la herramienta Autonom Software comercializada por MDL, Inc. En el caso en el que el nombre químico indicado y la estructura representada difieren, registrará la estructura representada.

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

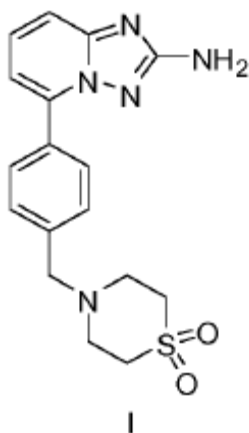
Referencias

- 5 a) Vainchenker W. *et al.* **2008** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19, 385 a 393
- b) Verstovsek *et al.* **2009** *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 636 a 642
- c) Elie Dolgin *et al.* **2011** *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 717 a 718
- 10 d) Smolen *et al.* **2003** *Nat Rev Drug Discov.*, 2, 473 a 488
- e) Lee DM *et al.* **2001** *Lancet*, 358, 903 a 911
- f) Choy EH *et al.* **2001** *N. Engl. J. Med.*, 344, 907 a 916
- g) O'Dell JR. **2004** *N. Engl. J. Med.*, 350 (25), 2591 a 2602
- h) Firestein GS. **2003** *Nature*, 423, 356 a 361
- 15 i) Kopf *et al.* **2010** *Nat. Rev. Drug Disc.*, 703 a 718
- j) Zenz R *et al.* **2005** *Nature*, 437 (7057), 369 a 375
- k) *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)* (18 de Noviembre de **2004**). "Guideline on Clinical Investigation of Medicinal Products indicated for the treatment of Psoriasis"
- 20 l) Punwani *et al.*, **2012** "Preliminary clinical activity of a topical JAK1/2 inhibitor in the treatment of psoriasis" *J. Am. Acad. Dermatol.*, 67, 4, 658 a 664
- m) Zikherman *et al.* **2011** *J. Clin. Invest.*, 1 (12), 4618 a 4621
- n) O'Sullivan *et al.* **2007** *Mol Immunol.* 44 (10), 2497 a 2506
- o) Xiang *et al.* **2008** *Blood* 111-9, 4809 a 4812
- p) Mullighan CG *et al.* **2009** *PNAS* 106 (23), 9414 a 9418
- 25 q) Zhang *et al.* **1996** *PNAS* 93, 9148 a 9153
- r) Constantinescu *et al.* **2007** *Trends in Biochemical Sciences* 33 (3), 122 a 131
- s) Tam *et al.* **2007** *British Journal of Cancer* 97, 378 a 383
- t) Berishaj *et al.* **2007**, *Breast Cancer Research* 9: R32
- u) Naka *et al.* **2002** *Arthritis Res.* 4 (Supl. 3): S233 a S242
- 30 v) Ingersoll *et al.* **2008** *J. Med. Behav.* 31 (3), 213 a 224
- w) Bundgard, H., *Design of Prodrugs*, págs. 7 a 9, 21 a 24, Elsevier, Amsterdam **1985**
- x) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª edición, **1985**, Parte 8, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania
- y) T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Segunda Edición, Wiley, Nueva York, **1991**
- 35 z) WO 2010/149769
- aa) Sims NA *et al.* **2004** *Arthritis Rheum.* 50, 2338 a 2346
- bb) Jou *et al.* **2005** *Arthritis Rheum.* 52, 339 a 344
- cc) Khachigian, L. M. *et al.* **2006** *Nature Protocols* 1, 2512 a 2516
- 40 dd) Lin SA *et al.* **2007** *Br. J. Pharmacol.* 150 (7), 862 a 872

- ee) Nishida K *et al.* **2004** *Arthritis Rheum.* 10, 3365 a 3376
- ff) Shelton DL *et al.* **2005** *Pain* 116, 8 a 16
- gg) Argiles JM *et al.* **1998** *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab. Care* 1, 245 a 251
- hh) Rall *et al.* **2004** *Rheumatology* 43, 1219 a 1223
- 5 ii) Walsmith J *et al.* **2004** *J Rheumatol.* 31,23 a 29
- jj) Salvemini D *et al.* **2001** *Arthritis Rheum.* 44, 2909 a 2921
- kk) Bush KA *et al.* **2002** *Arthritis Rheum.* 46, 802 a 805
- ll) Oste L *et al.*, *ECTC Montreal* **2007**
- mm) Saharinen *et al.* **2000** *Mol. Cel. Biol.* 20 (10), 3387
- 10 nn) Wernig *et al.* **2008** *Cancer Cell* 13 (4), 311 a 320
- oo) Geron *et al.* **2008** *Cancer Cell* 13 (4), 321 a 330
- pp) Wirtz *et al.* **2007** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073 a 1083
- qq) Nials *et al.* **2008** *Disease Models & Mechanisms*, 213 a 220
- rr) Ip *et al.* **2006** *Clin. Exp. Immun.*, 162 a 172
- 15 ss) Pernis *et al.* **2002** *J. Clin. Invest.* 1279
- tt) Kudlacz *et al.* **2008** *Eur. J. Pharmacol.* 154 a 161
- uu) McGinnity *et al.* *Drug Metabolism and Disposition* **2004**, 32, 11, 1247.

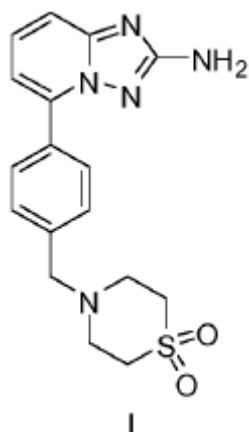
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:



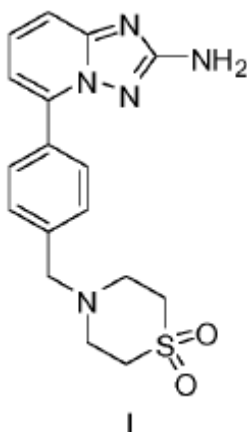
- 5 o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, o un solvato o una sal aceptable para uso farmacéutico de un solvato, para su uso en medicina.

2. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:



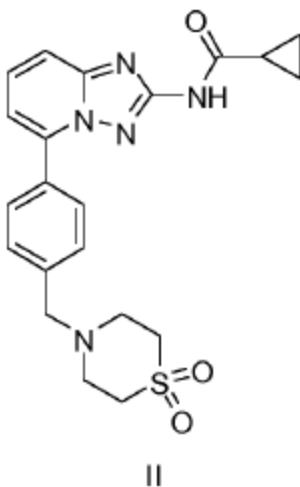
- 10 o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, o un solvato o una sal aceptable para uso farmacéutico de un solvato, para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la psoriasis y/o artritis psoriásica.
6. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con otro agente terapéutico.
7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente terapéutico adicional es un agente de tratamiento de la artritis reumatoide.
8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:



y un portador, excipiente o diluyente aceptable para uso farmacéutico, para su uso en medicina.

9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que de manera adicional comprende un agente terapéutico adicional.
- 5 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho agente terapéutico adicional es un agente de tratamiento de la artritis reumatoide.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el agente terapéutico adicional está de acuerdo con la Fórmula II:



- 10 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la proporción de la Fórmula I/Fórmula II es de 1/5 a 1/20.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la proporción de la Fórmula I/Fórmula II es de 1/5 a 1/10.
- 15 14. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, alergias, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílagos, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o interferones.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide.
- 20 16. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.
17. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para su uso en el tratamiento de la psoriasis y/o artritis psoriásica.

Figura 1

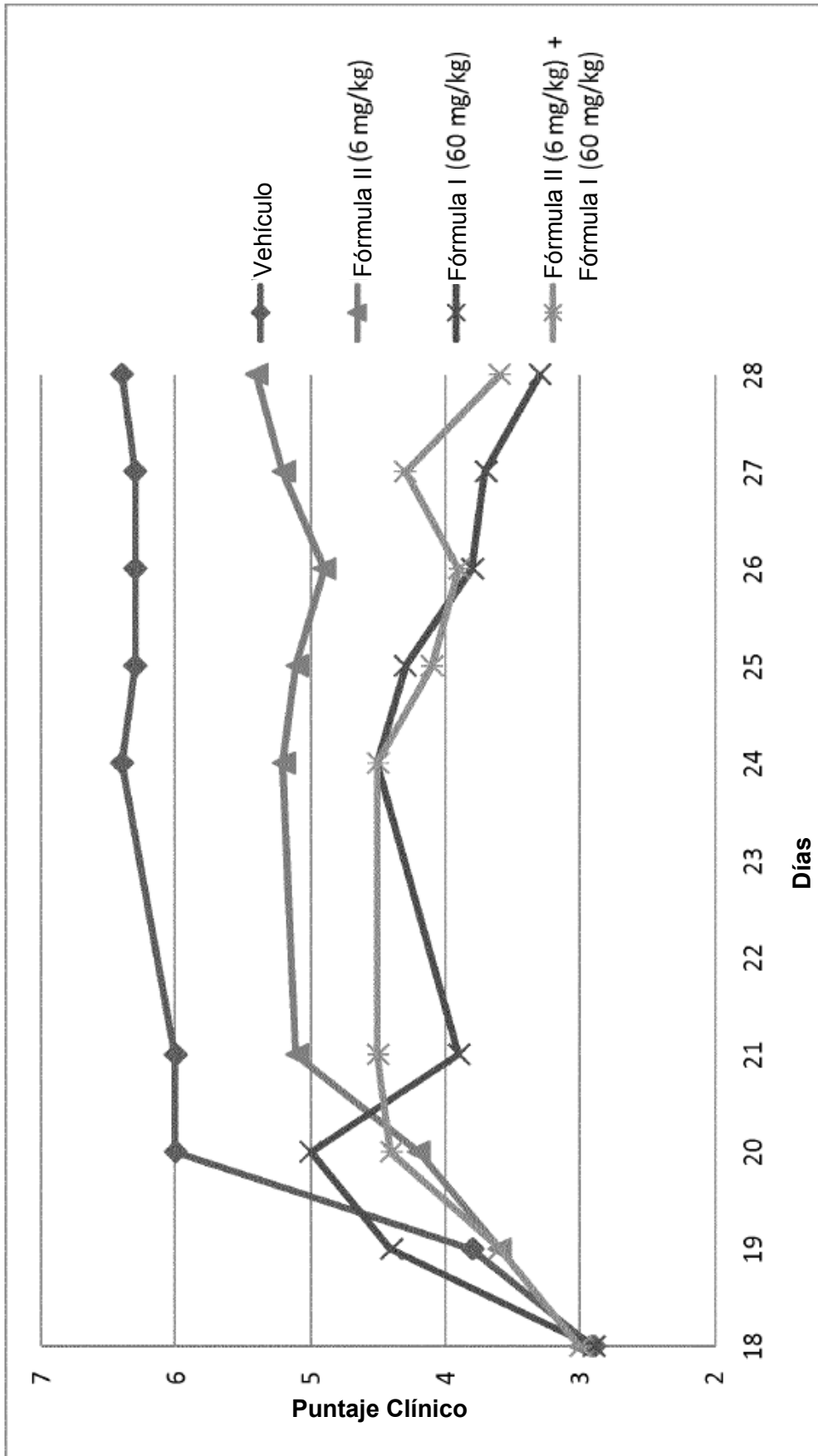


Figura 2

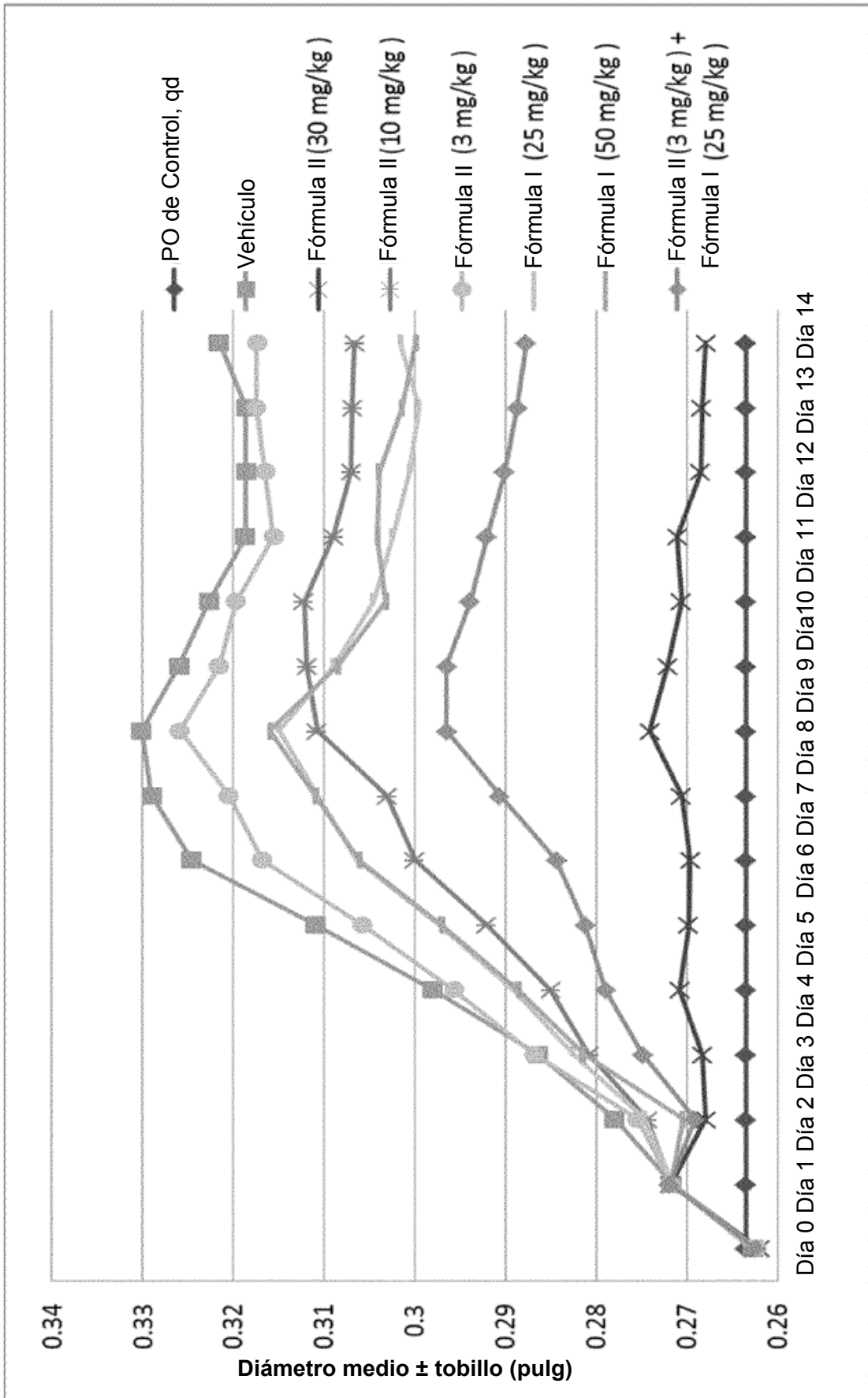


Figura 3

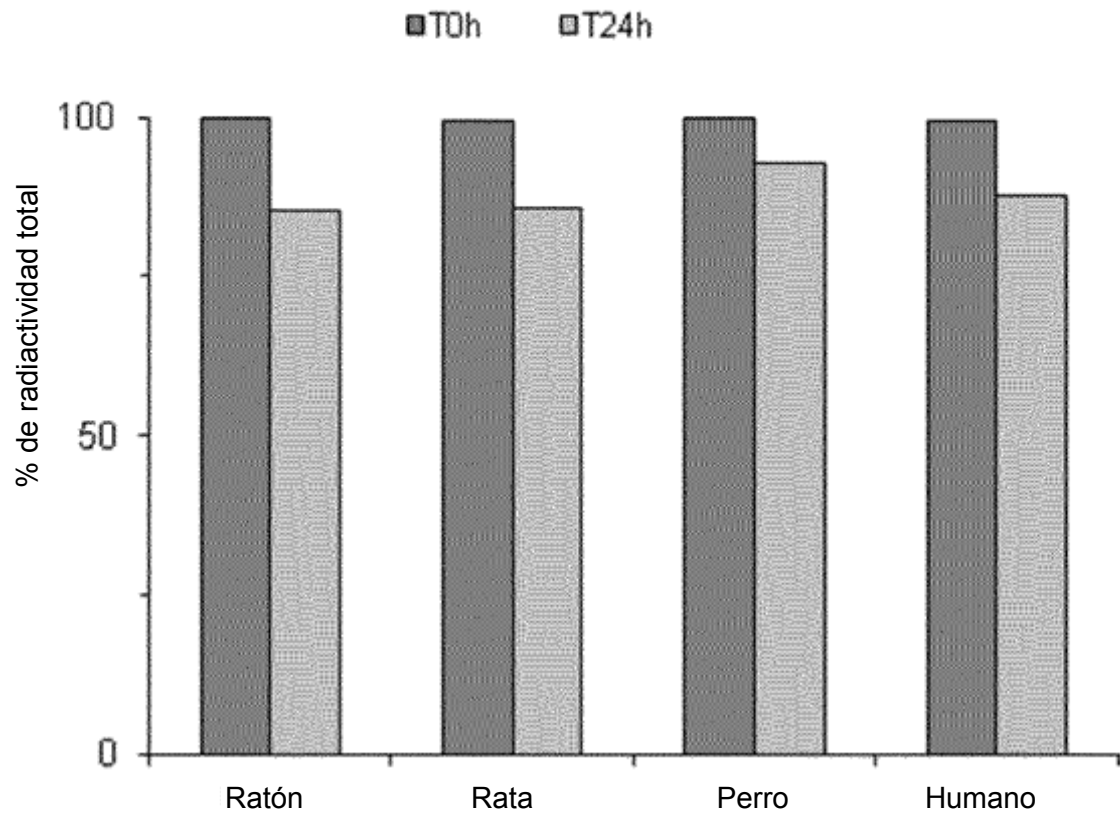


Figura 4

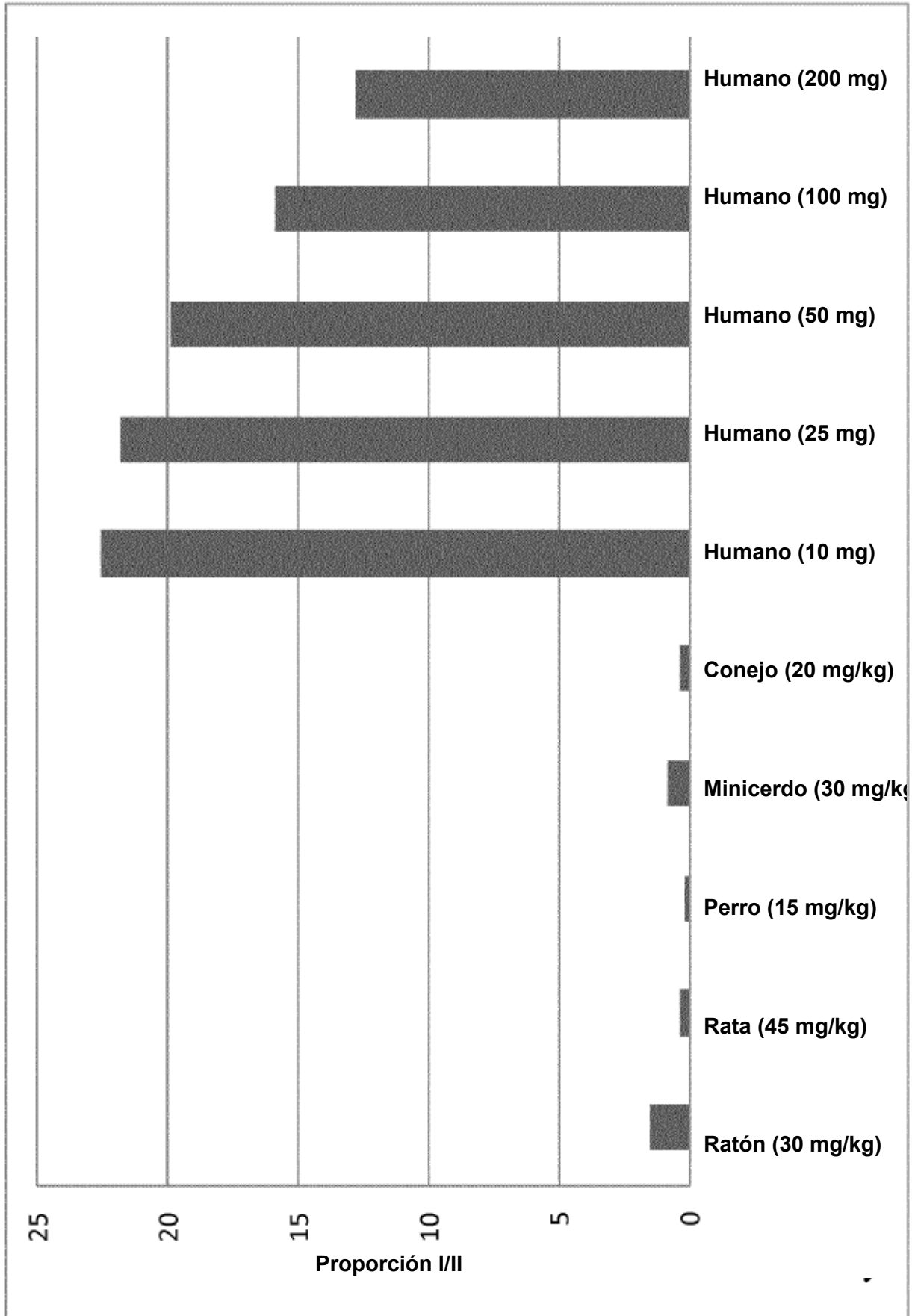


Figura 5

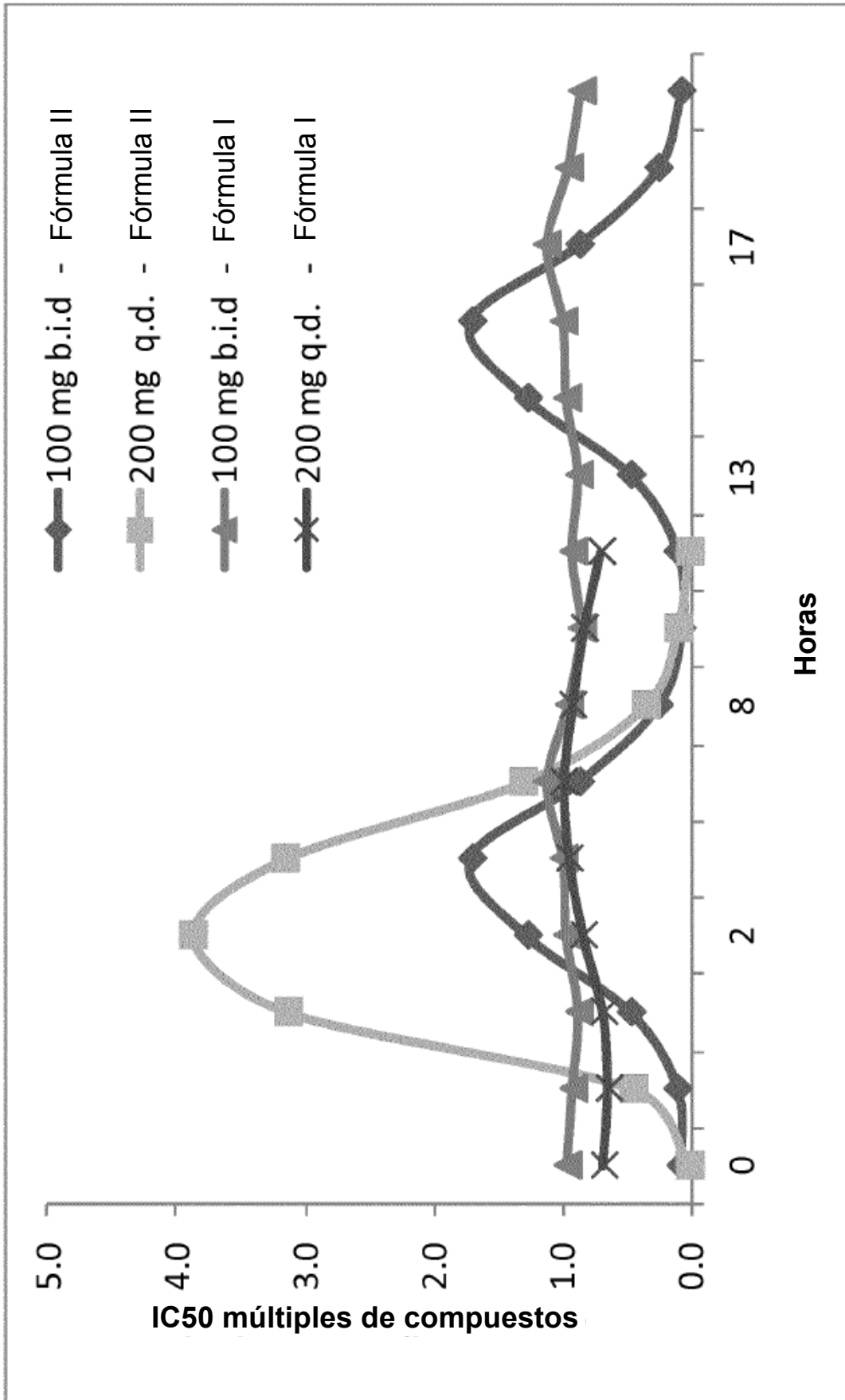


Figura 6

