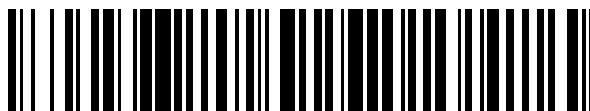


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 019**

51 Int. Cl.:

**C07D 235/08** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 405/12** (2006.01)  
**A61K 31/4184** (2006.01)  
**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2015 PCT/EP2015/050850**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15110378**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2015 E 15701945 (6)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3097083**

54 Título: **Derivados de bencimidazol y composiciones farmacéuticas de los mismos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

**23.01.2014 GB 201401086**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MENET, CHRISTEL, JEANNE, MARIE;  
 MAMMOLITI, OSCAR;  
 BLANC, JAVIER;  
 ORSULIC, MISLAV y  
 ROSCIC, MAJA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 693 019 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

Derivados de bencimidazol y composiciones farmacéuticas de los mismos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a compuestos que son inhibidores de JAK, una familia de tirosina quinasas que están implicadas en enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones. En particular, los compuestos de la invención inhiben JAK1 y/o TYK2, La presente invención también proporciona  
10 métodos para la producción de los compuestos de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, y describe métodos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades que implican enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones al administrar  
15 un compuesto de la invención.

**Antecedentes de la invención**

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

La combinación de modelos genéticos y la investigación de inhibidores de JAK de molécula pequeña revelaron el potencial terapéutico de varias JAK. La JAK3 es validada por la genética del ratón y del ser humano como un objetivo de inmunosupresión. (O'Shea et al., 2004). Los inhibidores de JAK3 se incorporaron con éxito en el desarrollo clínico, inicialmente para el rechazo de trasplante de órganos, pero también en otras enfermedades inmunoinflamatorias, tales como la artritis reumatoide (RA), la psoriasis y la enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).  
25

La TYK2 es un objetivo potencial para las enfermedades inmunoinflamatorias, siendo validado por la genética humana y los estudios de inactivación en ratones (Levy y Loomis, 2007).  
30

La JAK1 es un objetivo en el área de las enfermedades inmunoinflamatorias. La JAK1 se heterodimeriza con las otras JAK para transducir la señalización proinflamatoria impulsada por citoquinas. Por lo tanto, la inhibición de JAK1 es de interés para las enfermedades inmunoinflamatorias con citoquinas asociadas a la patología, que usan la señalización de JAK1, tal como IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, o IFN $\gamma$ , así como para otras enfermedades impulsadas por la transducción de señales mediadas por JAK.  
35

La degeneración del cartílago es la marca distintiva de diversas enfermedades, entre las que destacan la artritis reumatoide y la osteoartritis. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad degenerativa crónica de las articulaciones, que se caracteriza por inflamación y destrucción de las estructuras articulares. Cuando la enfermedad no se controla, produce una discapacidad y dolor sustanciales debido a la pérdida de funcionalidad de las articulaciones e incluso a la muerte prematura. El objeto de una terapia de AR, por lo tanto, no es sólo retrasar la enfermedad, sino lograr la remisión con el fin de detener la destrucción de las articulaciones. Además de la gravedad del desenlace de la enfermedad, la alta prevalencia de la AR (~ 0,8% de los adultos se ven afectados en todo el mundo) significa un alto impacto socioeconómico (Choy y Panayi, 2001; Firestein, 2003; Lee y Weinblatt, 2001; O'Dell, 2004; Smolen y Steiner, 2003).  
40

JAK1 y JAK2 están implicadas en la transducción de señal intracelular para muchas citoquinas y hormonas. Las patologías asociadas con cualquiera de estas citoquinas y hormonas se pueden mejorar con los inhibidores de JAK1 y JAK2, Por lo tanto, varias afecciones alérgicas o inflamatorias y enfermedades autoinmunes se podrían beneficiar del tratamiento con los compuestos descritos en esta invención que incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis tisular, inflamación eosinofílica, esofagitis, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, psoriasis, miositis, esclerosis múltiple. (Kopf et al., 2010).  
45  
50

La osteoartritis (también conocida como OA o artritis por desgaste) es la forma más común de artritis y se caracteriza por la pérdida de cartílago articular, a menudo asociada con la hipertrofia del hueso y el dolor (Wieland et al., 2005).

55 La osteoartritis es difícil de tratar. Actualmente, no hay cura disponible y el tratamiento se enfoca en aliviar el dolor y evitar que la articulación afectada se deforme. Los tratamientos comunes incluyen el uso de medicamentos

antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Aunque se han recomendado suplementos dietéticos tales como la condroitina y el sulfato de glucosamina como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la osteoartritis, un ensayo clínico reciente reveló que ninguno de los dos tratamientos redujo el dolor asociado con la osteoartritis (Clegg et al., 2006).

5 La estimulación de los procesos anabólicos, el bloqueo de los procesos catabólicos, o una combinación de estos dos, puede dar como resultado la estabilización del cartílago, y quizás incluso la reversión del daño y, por lo tanto, prevenir una mayor progresión de la enfermedad. Se han desarrollado métodos terapéuticos para la corrección de las lesiones del cartílago articular que aparecen durante la enfermedad osteoartítica, pero hasta ahora ninguno de ellos ha sido capaz de mediar en la regeneración del cartílago articular *in situ* e *in vivo*. Tomados en conjunto, no hay medicamentos osteoartíticos modificadores de la enfermedad disponibles.

10 Vandeghinste et al. (Vandeghinste et al., 2005) descubrieron la JAK1 como un objetivo cuya inhibición podría tener relevancia terapéutica para varias enfermedades, incluida la AO. La inactivación del gen JAK1 en ratones demostró que la JAK1 desempeña papeles esenciales y no redundantes durante el desarrollo: los ratones JAK1<sup>-/-</sup> murieron dentro de las 24 horas después del nacimiento y el desarrollo de linfocitos se vio gravemente afectado. Además, las células JAK1<sup>-/-</sup> no fueron reactivas, o menos reactivas, a las citoquinas que usan receptores de citoquinas de clase II, receptores de citoquinas que usan la subunidad gamma-c para la señalización y la familia de receptores de citoquinas que usan la subunidad gp130 para la señalización (Rodig et al., 1998).

Varios grupos han relacionado la señalización de JAK-STAT con la biología de los condrocitos. Li et al. (Li et al., 2001) demostraron que la oncostatina M induce la expresión de los genes MMP y TIMP3 en condrocitos primarios mediante la activación de las vías de señalización JAK/STAT y MAPK. Osaki et al., (Osaki et al., 2003) mostraron que la inhibición del colágeno II mediada por interferón-gamma en los condrocitos implica la señalización de JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo del cartílago al reducir la expresión de los componentes de la matriz, y al inducir la expresión de las colagenasas y óxido nítrico sintasa inducible (NOS2), que interviene en la producción de óxido nítrico (NO). Otero et al., (Otero et al., 2005) mostraron que la leptina y la IL1-beta indujeron sinérgicamente la producción de NO o la expresión del ARNm de NOS2 en condrocitos, y que las mismas fueron bloqueadas por un inhibidor de JAK. Legendre et al., (Legendre et al., 2003) mostraron que IL6/receptor IL6 indujo la regulación a la baja del colágeno II en genes específicos de la matriz de cartílago, núcleo de agregano y proteína de enlace en condrocitos articulares bovinos, y que esto estaba mediado por la señalización JAK/STAT. Por lo tanto, estas observaciones sugieren un papel para la actividad de la quinasa JAK en la homeostasis del cartílago y las oportunidades terapéuticas para los inhibidores de la quinasa JAK.

30 Los miembros de la familia JAK se han relacionado con afecciones adicionales, que incluyen trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan et al., 2007), en donde se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular JAK2, también pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Además, la familia JAK, en particular JAK1, JAK2 y JAK3, se ha relacionado con cánceres, en particular, leucemias, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (O'Sullivan et al., 2007; Xiang et al., 2008) y leucemia linfoblástica aguda (Mullighan et al., 2009) o tumores sólidos, por ejemplo, leiomiomas uterino (Constantinescu et al., 2008), cáncer de próstata (Tam et al., 2007). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1 y/o JAK2, también pueden tener utilidad en el tratamiento de cánceres (leucemias y tumores sólidos, por ejemplo, leiomiomas uterino, cáncer de próstata).

40 Además, la enfermedad de Castleman, el mieloma múltiple, la glomerulonefritis mesangial proliferativa, la psoriasis y el sarcoma de Kaposi probablemente se deben a la hipersecreción de la citoquina IL-6, cuyos efectos biológicos están mediados por la señalización JAK-STAT intracelular (Naka et al., 2002). Este resultado muestra que los inhibidores de JAK también pueden encontrar utilidad en el tratamiento de dichas enfermedades.

Los documentos de patente WO 2012/044090 y EP 2226315 describen compuestos de quinazolina como inhibidores de proteína quinasa.

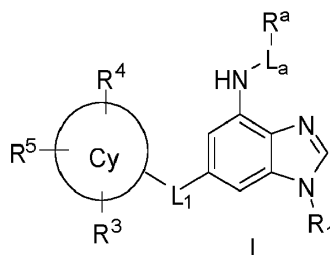
45 Las terapias actuales no son satisfactorias y, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar otros compuestos que puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones. Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos, métodos para su producción y composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención junto con un vehículo farmacéutico adecuado. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones.

### Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los compuestos de la invención pueden actuar como inhibidores de JAK y que son útiles para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias,

enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones. En un aspecto específico, los compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2, La presente invención también proporciona métodos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y describe métodos para tratar enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones al administrar un compuesto de la invención.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, los compuestos de la invención se proporcionan de acuerdo con la Fórmula (I):



en la que,

R<sup>1</sup> es H, o Me;

L<sub>1</sub> es -NR<sup>2</sup>-, -O-, o -CH<sub>2</sub>-;

Cy es fenilo, o heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O, y S;

R<sup>2</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;

R<sup>3</sup> es H, halo, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más halo;

R<sup>4</sup> es H o halo;

R<sup>5</sup> es -CN, halo o es -L<sub>2</sub>-R<sup>6</sup>

-L<sub>2</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)NR<sup>7</sup>, -NR<sup>7</sup>C(=O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR<sup>7</sup>, o -NR<sup>7</sup>SO<sub>2</sub>-;

R<sup>6</sup> es H, o alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más grupos R<sup>8</sup> independientemente seleccionados;

R<sup>7</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;

R<sup>8</sup> es OH, CN, halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub>,

L<sub>a</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)O- o -C(=O)NH-;

R<sub>a</sub> es:

- H,

- alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>b</sup> independientemente seleccionados,

- cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>c</sup> independientemente seleccionados, o

- heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, N, y S, o

- heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S;

R<sup>b</sup> es

- halo,

- CN,

- OH,

- alcoxi C<sub>1-4</sub>,

- cicloalquilo C<sub>3-7</sub>,

- heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S (heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados entre halo, u oxo),

- -SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, o

- -C(=O)NR<sup>b1</sup>R<sup>b2</sup>

R<sup>c</sup> es

- halo,

- CN,

- OH,

- alquilo C<sub>1-4</sub>,

- -C(=O)OH, o

- -C(=O)NR<sup>c1</sup>R<sup>c2</sup>; y

cada R<sup>b1</sup>, R<sup>b2</sup>, R<sup>c1</sup> y R<sup>c2</sup> se selecciona independientemente entre H, y alquilo C<sub>1-4</sub>,

En una realización particular, los compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2,

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que los compuestos de la invención pueden mostrar una actividad *in vitro* mejorada cuando se comparan con análogos estrechamente relacionados.

Además, en un aspecto particular, los compuestos de la invención pueden mostrar una estabilidad *in vitro* mejorada, cuando se comparan con análogos estrechamente relacionados. Esta mejora puede dar como resultado *in vivo* en una dosificación más baja del fármaco que se requiere, y por lo tanto puede dar como resultado una menor toxicidad y/o interacción fármaco-fármaco.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico. Además, los compuestos de la invención, útiles en las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria, son farmacéuticamente aceptables como se preparan y se usan. En este aspecto de la invención, la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente ingredientes activos adicionales adecuados para uso en combinación con los compuestos de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de la invención o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para uso como un medicamento. En una realización específica, dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente un ingrediente activo adicional.

En un aspecto adicional, se describe un método para tratar a un mamífero susceptible a, o afectado por, una afección de entre las enumeradas en la presente memoria, y particularmente, una afección que puede estar asociada con una actividad aberrante de JAK, por ejemplo, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican alteraciones en el recambio cartilaginoso, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o hipersecreción de interferones, cuyo método comprende administrar una cantidad eficaz de la composición o compuesto farmacéutico de la invención como se describe en la presente memoria. En un aspecto específico, la afección se asocia con una actividad aberrante de JAK1 y/o TYK2,

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento o la profilaxis de una afección seleccionada de entre las enumeradas en la presente memoria, particularmente las afecciones que se pueden asociar con la actividad aberrante de JAK, por ejemplo, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.

En otro método más del aspecto de tratamiento, se describe un método para tratar un mamífero susceptible a, o afectado por, una afección que está causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK como se describe en la presente memoria, y comprende administrar una cantidad eficaz de tratamiento del estado o composición farmacéutica o un compuesto de la invención descrito en la presente memoria. En un aspecto específico, la afección está causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK1 y/o TYK2,

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, para uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección que está causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK.

En aspectos adicionales, esta invención proporciona métodos para sintetizar los compuestos de la invención, con protocolos sintéticos representativos y rutas descritas más adelante en la presente memoria.

Por consiguiente, es un objeto principal de esta invención proporcionar nuevos compuestos, que pueden modificar la actividad de JAK y así prevenir o tratar cualquier afección que pueda estar causalmente relacionada con la misma. En un aspecto específico, los compuestos de la invención modulan la actividad de JAK1 y/o TYK2,

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar compuestos que pueden tratar o aliviar afecciones o síntomas de la misma, tales como enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones, que pueden estar causalmente relacionadas con la actividad de JAK, en particular JAK1 y/o TYK2,

Otro objeto más de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica que se puede usar en el tratamiento o profilaxis de una variedad de afecciones, que incluyen las enfermedades asociadas con la actividad de JAK tales como enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones. En una realización específica, la enfermedad está asociada con la actividad de JAK1 y/o TYK2,

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una consideración de la siguiente descripción detallada.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

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

10 Cuando se describe la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y métodos para usar dichos compuestos y composiciones, los siguientes términos, si están presentes, tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. También debe entenderse que cuando se describe en la presente memoria cualquiera de los restos definidos más adelante puede estar sustituido por una variedad de sustituyentes, y que las definiciones respectivas pretenden incluir dichos restos sustituidos dentro de su alcance como se establece a continuación. A menos que se indique lo contrario, el término "sustituido" se debe definir como se establece a continuación. Debe entenderse además que los términos "grupos" y "radicales" se pueden considerar intercambiables cuando se usan en la presente memoria.

15 El término "alquilo" significa hidrocarburo alifático lineal o ramificado con la cantidad de átomos de carbono especificada. Particularmente, los grupos alquilo tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Más particularmente, es alquilo inferior el que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Un grupo particular adicional tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos de cadena lineal incluyen metilo, etilo n-propilo, y n-butilo. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo, propilo o butilo están unidos a una cadena de alquilo lineal, los ejemplos de los grupos de cadena ramificada incluyen isopropilo, isobutilo, t-butilo e isoamilo.

20 El término "alcoxi" se refiere al grupo  $-OR^{26}$ , en donde  $R^{26}$  es alquilo con el número de átomos de carbono especificado. Particularmente, los grupos alcoxi son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, terc-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi, n-hexoxi y 1,2-dimetilbutoxi. Particularmente, los grupos alcoxi son alcoxi inferior, es decir, con entre 1 y 6 átomos de carbono. Otros grupos alcoxi en particular, tienen entre 1 y 4 átomos de carbono.

25 El término "alqueno" se refiere a grupos de hidrocarburos monovalentes olefínicamente (insaturados) con el número de átomos de carbono especificado. Particularmente, el alqueno tiene de 2 a 8 átomos de carbono, y más particularmente, de 2 a 6 átomos de carbono, que puede ser de cadena lineal o ramificada y que tiene al menos 1 y particularmente de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. Los grupos alqueno, en particular, incluyen etenilo ( $-CH=CH_2$ ), n-propenilo ( $-CH_2CH=CH_2$ ), isopropenilo ( $-C(CH_3)=CH_2$ ) y similares.

30 El término "amino" se refiere al radical  $-NH_2$ .

35 El término "arilo" se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monovalente derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. En particular, arilo se refiere a una estructura de anillo aromático, monocíclica o policíclica fusionada, con el número de átomos del anillo especificado. Específicamente, el término comprende grupos que incluyen de 6 a 10 miembros del anillo. Cuando el grupo arilo es un sistema de anillo monocíclico, contiene preferiblemente 6 átomos de carbono. Particularmente, los grupos arilo incluyen fenilo y naftilo.

40 El término "cicloalquilo" se refiere a una estructura de anillo hidrocarbólico no aromático, monocíclica, policíclica fusionada, policíclica puenteada o espirocíclica, con el número de átomos en el anillo especificado. Un cicloalquilo puede tener de 3 a 12 átomos de carbono, en particular de 3 a 10, y más particularmente de 3 a 7 átomos de carbono. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo único tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

El término "ciano" se refiere al radical  $-CN$ .

El término "halo" o "halógeno" se refiere a fluoro (F), cloro (Cl), bromo (Br) y yodo (I). Los grupos halo particulares son flúor o cloro.

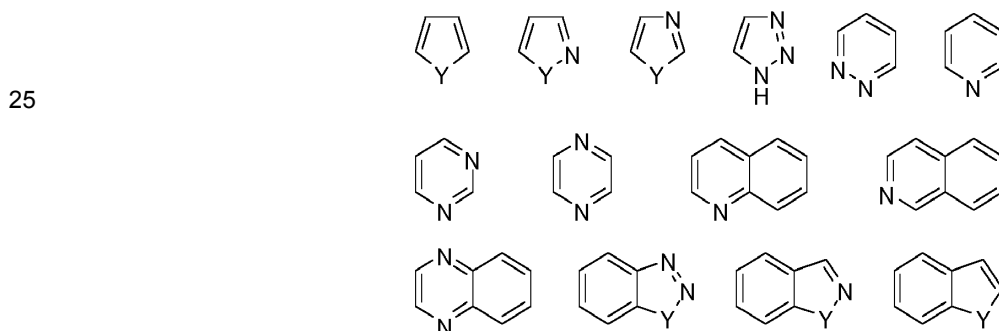
45 El término "hetero" cuando se usa para describir un compuesto o grupo presente en un compuesto significa que uno o más átomos de carbono en el compuesto o grupo han sido reemplazados por un heteroátomo de nitrógeno, oxígeno o azufre. El término hetero se puede aplicar a cualquiera de los grupos hidrocarbólico descritos anteriormente, tal como alquilo, por ejemplo, heteroalquilo, cicloalquilo, por ejemplo, heterocicloalquilo, arilo, por ejemplo, heteroarilo, y similares que tienen de 1 a 4, y particularmente de 1 a 3 heteroátomos, más típicamente 1 o 2 heteroátomos, por ejemplo, un solo heteroátomo.

50 El término "heteroarilo" significa una estructura de anillo aromático, monocíclica o policíclica fusionada, que incluye uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N y S y el número de átomos del anillo especificado. En particular, la estructura de anillo aromático puede tener de 5 a 9 miembros de anillo. El grupo heteroarilo puede ser, por ejemplo, un anillo monocíclico de cinco miembros o seis miembros o una estructura bicíclica

5 fusionada formada por anillos de cinco y seis miembros fusionados o dos anillos de seis miembros fusionados o, a modo de ejemplo adicional, dos anillos de cinco miembros fusionados. Cada anillo puede contener hasta cuatro heteroátomos típicamente seleccionados entre nitrógeno, azufre y oxígeno. Típicamente, el anillo de heteroarilo contendrá hasta 4 heteroátomos, más típicamente hasta 3 heteroátomos, más habitualmente hasta 2, por ejemplo, un solo heteroátomo. En una realización, el anillo de heteroarilo contiene al menos un átomo de nitrógeno en el anillo. Los átomos de nitrógeno en los anillos de heteroarilo pueden ser básicos, como en el caso de un imidazol o piridina, o esencialmente no básicos como en el caso de un indol o nitrógeno de pirrol. En general, el número de átomos de nitrógeno básicos presentes en el grupo heteroarilo, que incluye cualquier sustituyente del grupo amino del anillo, será menor que cinco.

10 Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de cinco miembros incluyen, pero sin limitación, grupos pirrolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, furazanilo, oxazolilo, oxadiazolilo, oxatriazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, triazolilo y tetrazolilo.

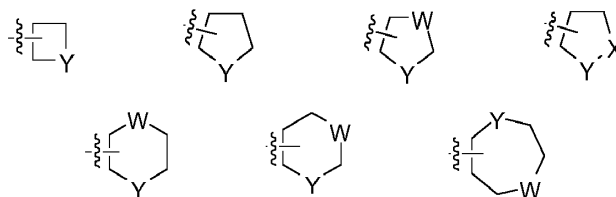
15 Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de seis miembros incluyen, pero sin limitación, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo y triazinilo. Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen un anillo de cinco miembros fusionado a otro anillo de cinco miembros incluyen, pero sin limitación, imidazotiazolilo e imidazoimidazolilo. Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen un anillo de seis miembros fusionado a un anillo de cinco miembros incluyen, pero sin limitación, grupos benzofuranilo, benzotiofenilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, isobenzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, isobenzofuranilo, indolilo, isoindolilo, indolizínilo, purínilo (por ejemplo, adenina, guanina), indazolilo, pirazolopirimidinilo, triazolopirimidinilo y pirazolopiridinilo. Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen dos anillos de seis miembros fusionados incluyen, pero sin limitación, grupos quinolinilo, isoquinolinilo, piridopiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, y pteridinilo. Los grupos heteroarilo particulares son los derivados de tiofenilo, pirrolilo, benzotiofenilo, benzofuranilo, indolilo, piridinilo, quinolinilo, imidazolilo, oxazolilo y pirazinilo. Entre los ejemplos de heteroarilos representativos se incluyen los siguientes:



en donde cada Y se selecciona de  $>C(=O)$ , NH, O y S.

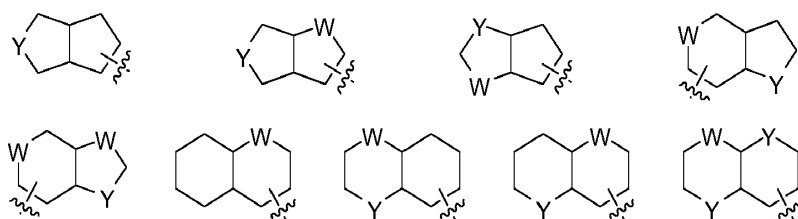
30 El término "heterocicloalquilo" significa una estructura de anillo no aromático totalmente saturada, monocíclica, policíclica fusionada, espirocíclica, o policíclica puenteada, que incluye uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N y S y el número de átomos en el anillo especificado. La estructura de anillo heterocicloalquilo puede tener de 4 a 12 miembros de anillo, en particular de 4 a 10 miembros de anillo y más particularmente de 4 a 7 miembros de anillo. Cada anillo puede contener hasta cuatro heteroátomos típicamente seleccionados entre nitrógeno, azufre y oxígeno. Típicamente, el anillo de heterocicloalquilo contendrá hasta 4 heteroátomos, más típicamente hasta 3 heteroátomos, más habitualmente hasta 2, por ejemplo, un solo heteroátomo. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, azetidínilo, oxetanilo, tietanilo, pirrolidinilo (por ejemplo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo y 3-pirrolidinilo), morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydrotiofenilo, imidazolinilo, oxazolinilo, tiazolinilo, piperidinilo (por ejemplo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo y 4-piperidinilo), piranilo, dioxanilo, tetrahydropiranilo (por ejemplo, 4-tetrahydro-piranilo), 2-pirazolinilo, pirazolidinilo o piperazinilo.

40 Ejemplos particulares de grupos heterocicloalquilo monocíclicos se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:



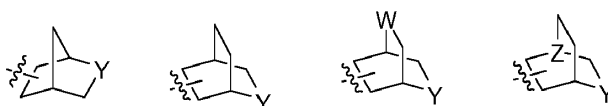
en donde cada W e Y se selecciona independientemente de  $CH_2$ , NH, O y S.

45 Ejemplos particulares de grupos heterocicloalquilo bicíclicos fusionados se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:



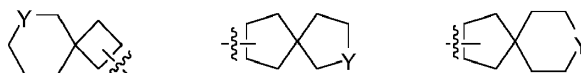
en donde cada W e Y se selecciona independientemente de CH<sub>2</sub>, NH, O y S.

- 5 Ejemplos particulares de grupos heterocicloalquilo bicíclicos puenteados se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:



en el que cada W e Y se selecciona independientemente de CH<sub>2</sub>, NH, O y S, y Z es N o CH.

Ejemplos particulares de grupos heterocicloalquilo espirocíclicos se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:



- 10 en donde cada Y se selecciona de NH, O y S.

El término "hidroxilo" se refiere al radical -OH.

El término "oxo" se refiere al radical =O.

El término "sustituido" se refiere a un grupo en el que uno o más átomos de hidrógeno son independientemente reemplazados por el mismo o diferente sustituyente(s).

- 15 El término "sulfo" o la expresión "ácido sulfónico" se refieren a un radical tal como -SO<sub>3</sub>H.

El término "tio" se refiere al grupo -SH.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "sustituido con uno o más" se refiere a un número de uno a cuatro sustituyentes. En una realización, se refiere a un número de uno a tres sustituyentes. En realizaciones adicionales, se refiere a un número de uno o dos sustituyentes. En una realización adicional, se refiere a un sustituyente.

- 20 El término "tioalcoxi" se refiere al grupo -SR<sup>26</sup>, en donde R<sup>26</sup> tiene el número de átomos de carbono especificado y particularmente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>. Los grupos tioalcoxi particulares son tiometoxi, tioetoxi, n-tiopropoxi, isotiopropoxi, n-tiobutoxi, terc-tiobutoxi, sec-tiobutoxi, n-tiopentoxi, n-tiohexoxi y 1,2-dimetiltiobutoxi. Los grupos tioalcoxi particulares son tioalcoxi inferior, es decir, con entre 1 y 6 átomos de carbono. Otros grupos alcoxi particulares tienen entre 1 y 4 átomos de carbono.

- 25 Un experto en la técnica de la síntesis orgánica reconocerá que el número máximo de heteroátomos en un anillo heterocíclico estable, químicamente factible, ya sea aromático o no aromático, viene determinado por el tamaño del anillo, el grado de insaturación y la valencia de los heteroátomos. En general, un anillo heterocíclico puede tener de uno a cuatro heteroátomos siempre que el anillo heteroaromático sea químicamente factible y estable.

- 30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o la agencia correspondiente en países que no sean los Estados Unidos, o que esté incluido en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos.

- 35 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. En particular, dichas sales no tóxicas pueden ser sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos y sales de adición de bases. Específicamente, dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido
- 40



canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo [2,2,2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original o bien se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion 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, además, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares; y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tales como hidrocloreuro, hidrobromuro, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. La expresión "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a un catión catiónico aceptable de un grupo funcional ácido. Dichos cationes se ejemplifican por cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares.

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

El término "profármacos" se refiere a compuestos, que incluyen derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos escindibles y se convierten mediante solvólisis o en condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*. Dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, derivados de éster de colina y similares, ésteres de N-alquilmorfolina y similares.

El término "solvato" se refiere a las formas del compuesto que están asociadas con un solvente, generalmente mediante una reacción de solvólisis. Esta asociación física incluye enlaces de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, EtOH, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, en forma cristalina y se pueden solvatar o hidratar. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tal como hidratos, e incluyen además solvatos estequiométricos y solvatos no estequiométricos. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo, cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan a la red cristalina del sólido cristalino. El término "solvato" abarca tanto los solvatos en fase de disolución como los aislables. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

El término "sujeto" incluye a los seres humanos. Los términos "humano", "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente memoria.

La expresión "cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto de la invención que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad eficaz" puede variar dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

Los términos "prevenir" o "prevención" se refieren a una reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, hacer posible que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un sujeto que pudiera estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes del inicio de la enfermedad).

El término "profilaxis" se refiere a la "prevención", y se refiere a una medida o un procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitativos de las medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalizados con riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a la inmovilización; y la administración de un agente antimalaria tal como la cloroquina, antes de una visita a una región geográfica donde la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a la mejora de la enfermedad o trastorno (es decir, detener la enfermedad o reducir la manifestación, extensión o gravedad de al menos uno de sus síntomas clínicos). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En una realización adicional, "tratar" o "tratamiento" se refiere a ralentizar la progresión de la enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades alérgicas" se refiere al grupo de afecciones caracterizadas por un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmunitario que incluye la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), sinusitis, eczema y urticaria, así como alergias alimentarias o alergias al veneno de insectos.

Como se usa en la presente memoria, el término "asma" se refiere a cualquier trastorno de los pulmones caracterizado por variaciones en el flujo de gas pulmonar asociado con la constricción de las vías respiratorias por cualquier causa (intrínseca, extrínseca o ambas; alérgica o no alérgica). El término asma se puede usar con uno o más adjetivos para indicar la causa.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades inflamatorias" se refiere al grupo de afecciones que incluyen artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad (COPD), enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), estados de enfermedad impulsados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de la cirugía de bypass o estados de endotoxinas crónicas que contribuyen a, por ejemplo, insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades que implican el cartílago, tal como la de las articulaciones. Particularmente, el término se refiere a artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades inflamatorias del intestino. Más particularmente, la expresión se refiere a la artritis reumatoide, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y las enfermedades inflamatorias del intestino.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades autoinmunes" se refiere al grupo de enfermedades que incluyen la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, que incluye enfermedades tales como COPD, asma (por ejemplo, asma intrínseca, asma extrínseca, asma por polvo, asma infantil) particularmente asma crónica o inveterada (por ejemplo asma tardía e hiperreactividad de las vías respiratorias), bronquitis, que incluye asma bronquial, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus eritematoso cutáneo, nefritis lúpica, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad del ojo seco, diabetes mellitus de tipo I y complicaciones asociadas con la misma, eccema atópico (dermatitis atópica), tiroiditis (tiroiditis de Hashimoto y autoinmune), dermatitis de contacto y otras dermatitis eczematosas, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. Particularmente, el término se refiere a COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria intestinal. Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades proliferativas" se refiere a afecciones como cáncer (por ejemplo, leiomiocarcinoma uterino o cáncer de próstata), enfermedades mieloproliferativas (por ejemplo, policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis), leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y crónica), mieloma múltiple, psoriasis, reestenosis, esclerodermia o fibrosis. En particular, el término se refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.

Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a un crecimiento maligno o benigno de células en la piel o en órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Un cáncer tiende a infiltrarse en el tejido adyacente y diseminarse (metástasis) a órganos distantes, por ejemplo, a los huesos, el hígado, los pulmones o el cerebro. Como se usa en la presente memoria, el término cáncer incluye tanto los tipos de células tumorales metastásicas (tales como, entre otros, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y mastocitoma) como los tipos de carcinoma tisular (tales como 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 de hígado primario, cáncer de ovario, cáncer de próstata y leiomiocarcinoma uterino). En particular, el término "cáncer" se refiere a leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos (osteosarcoma y histiocitoma fibroso maligno), glioma del tallo cerebral, tumores cerebrales, tumores cerebrales y de la médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma células de T cutáneo, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, cáncer de ojo, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células estromales gastrointestinales, tumor de células germinales, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneo, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma, macroglobulinemia de Waldenstrom, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, mesotelioma, cáncer de boca, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide, mieloma múltiple, cáncer de la nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno óseo, cáncer de ovario, cáncer epitelial ovárico, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, papilomatosis, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales (riñón), retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, sarcoma, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, y

tumor de Wilms. En otra realización particular, el término cáncer se refiere a cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de mama o cáncer de colon.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "leucemia" se refiere a enfermedades neoplásicas de la sangre y los órganos que forman la sangre. Dichas enfermedades pueden causar la disfunción de la médula ósea y del sistema inmunitario, lo que hace que el huésped sea altamente susceptible a infecciones y hemorragias. En particular, el término leucemia se refiere a la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y la leucemia linfoblástica crónica (CLL). En otra realización particular, el término leucemia se refiere a leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), o linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "rechazo de trasplante" se refiere al rechazo agudo o crónico de alo- o xenoinjertos de células, tejidos u órganos sólidos, por ejemplo, islotes pancreáticos, células madre, médula ósea, piel, músculo, tejido corneal, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón y pulmón combinado, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago, o enfermedades de injerto contra huésped.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago" 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 neurógena o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis como osteoartritis deformante endémica, enfermedad de Mseleni y enfermedad de Handigodu; degeneración resultante de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "malformación o malformación congénitas del cartílago" incluye afecciones tales como condrólisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria y trastornos relacionados.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6" incluye afecciones tales como enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis mesangial proliferativa.

25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones" incluye afecciones tales como lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis lúpica, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis reumatoide.

30 La expresión "compuesto o compuestos de la invención", y expresiones equivalentes, pretenden abarcar compuestos de la fórmula o fórmulas como se ha descrito anteriormente, cuya expresión incluye las sales farmacéuticamente aceptables, y los solvatos, por ejemplo, hidratos, y los solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables, cuando el contexto así lo permita. De forma similar, la referencia a los intermedios, se reivindicuen o no ellos mismos, pretende abarcar sus sales, y solvatos, cuando el contexto así lo permita.

Cuando en la presente memoria se hace referencia a los intervalos, por ejemplo, pero sin limitación, alquilo C<sub>1-8</sub>, la cita de un intervalo debe considerarse una representación de cada miembro de dicho intervalo.

35 Otros derivados de los compuestos de esta invención tienen actividad tanto en sus formas de ácido como en sus formas de derivado de ácido, pero en la forma sensible a los ácidos a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retardada en el organismo de los mamíferos (Bundgaard, 1985). Los profármacos incluyen derivados de ácido bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, ésteres preparados por reacción del ácido original con un alcohol adecuado o amidas preparadas por reacción del compuesto ácido original con una amina sustituida o no sustituida, o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Los ésteres, amidas y anhídridos alifáticos o aromáticos sencillos derivados de grupos ácidos colgantes de los compuestos de esta invención son profármacos particularmente útiles. En algunos casos es deseable preparar profármacos de tipo doble éster, como (aciloxi) alquil ésteres o ((alcoxycarbonil)oxi) alquil ésteres. Particularmente, dichos profármacos son los ésteres de alquilo C<sub>1-8</sub>, alquenilo C<sub>2-8</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> opcionalmente sustituido, y ésteres (arilo C<sub>6-10</sub>)-(alquilo C<sub>1-4</sub>) de los compuestos de la invención.

40

45

Como se usa en la presente memoria, la expresión "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una "variante isotópica" de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radioactivos, tales como, por ejemplo, deuterio (<sup>2</sup>H o D), carbono-13 (<sup>13</sup>C), nitró (<sup>15</sup>N) o similares. Se entenderá que, en un compuesto donde se realiza dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, en caso de estar presentes, pueden variar, de modo que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser <sup>2</sup>H/D, cualquier carbono puede ser <sup>13</sup>C, o cualquier nitrógeno puede ser <sup>15</sup>N, y que la presencia y ubicación de dichos átomos se puede determinar dentro de la experiencia en la técnica. Asimismo, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos en el caso, por ejemplo, donde los compuestos resultantes se pueden usar para estudios de distribución de tejido del fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio, es decir <sup>3</sup>H, y carbono-14, es decir <sup>14</sup>C, son particularmente útiles para este fin en vista de su facilidad de incorporación y de los medios listos para la detección. Además, se pueden preparar compuestos que están sustituidos con isótopos emisores de positrones, tales como <sup>11</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>15</sup>O y <sup>13</sup>N, y serían útiles en estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor del sustrato.

50

55

Todas las variantes isotópicas de los compuestos proporcionados en la presente memoria, radiactivos o no, pretenden estar abarcados dentro del alcance de la invención.

5 También debe entenderse que los compuestos que tienen la misma fórmula molecular, pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros".

10 Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereómeros" y los que no son imágenes especulares superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe mediante las reglas de secuencia R y S de Cahn y Prelog, o por la forma en que la molécula rota el plano de luz polarizada y se designa como dextrógiro o levógiro. (es decir, como isómeros (+) o (-), respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina una "mezcla racémica".

15 Los "tautómeros" se refieren a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto particular, y que varían en el desplazamiento de los átomos de hidrógeno y electrones. Por lo tanto, dos estructuras pueden estar en equilibrio a través del movimiento de electrones  $\pi$  y un átomo (generalmente H). Por ejemplo, los enoles y las cetonas son tautómeros porque se interconvierten rápidamente mediante el tratamiento con ácido o base. Otro ejemplo de tautomerismo son las formas aci y nitro de fenilnitrometano, que también se forman mediante el tratamiento con ácido o base.

20 Las formas tautoméricas pueden ser relevantes para el logro de la reactividad química y la actividad biológica óptimas de un compuesto de interés.

Los compuestos de la invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; dichos compuestos pueden, por lo tanto, producirse como estereoisómeros (R) o (S) individuales o como mezclas de los mismos.

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

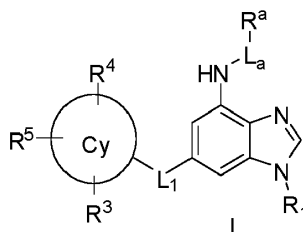
Se apreciará que los compuestos de la invención se pueden metabolizar para producir metabolitos biológicamente activos.

### 30 La invención

La presente invención se basa en la identificación de que los compuestos de la invención son inhibidores de JAK y que son útiles para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones. En una realización específica, los compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2,

40 La presente invención también proporciona métodos para la producción de los compuestos de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención y describe métodos para tratar enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones al administrar un compuesto de la invención. En una realización específica, los compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2,

45 Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, los compuestos de la invención se proporcionan de acuerdo con la Fórmula (I):



en la que,  
R<sup>1</sup> es H, o Me;

L<sub>1</sub> es -NR<sup>2</sup>-, -O-, o -CH<sub>2</sub>-;

Cy es fenilo, o heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O, y S;

R<sup>2</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;

5 R<sup>3</sup> es H, halo, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados entre halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados de halo;

R<sup>4</sup> es H o halo;

R<sup>5</sup> es -CN, halo o es -L<sub>2</sub>-R<sup>6</sup>

-L<sub>2</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)NR<sup>7</sup>, -NR<sup>7</sup>C(=O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR<sup>7</sup>, o -NR<sup>7</sup>SO<sub>2</sub>-;

10 R<sup>6</sup> es H, o alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más grupos R<sup>8</sup> independientemente seleccionados;

R<sup>7</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;

R<sup>8</sup> es OH, CN, halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub>,

L<sub>a</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)O- o -C(=O)NH-;

R<sub>a</sub> es:

15 • H,

• alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>b</sup> independientemente seleccionados,

• cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>c</sup> independientemente seleccionados, o

• heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, N, y S, o

20 • heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S;

R<sup>b</sup> es

• halo,

• CN,

25 • OH,

• alcoxi C<sub>1-4</sub>,

• cicloalquilo C<sub>3-7</sub>,

• heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S (heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido con uno o más independientemente

30 seleccionados entre halo, u oxo),

• -SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, o

• -C(=O)NR<sup>b1</sup>R<sup>b2</sup>

R<sup>c</sup> es

• halo,

35 • CN,

• OH,

• alquilo C<sub>1-4</sub>,

• -C(=O)OH, o

• -C(=O)NR<sup>c1</sup>R<sup>c2</sup>; y

40 cada R<sup>b1</sup>, R<sup>b2</sup>, R<sup>c1</sup> y R<sup>c2</sup> se selecciona independientemente entre H, y alquilo C<sub>1-4</sub>.

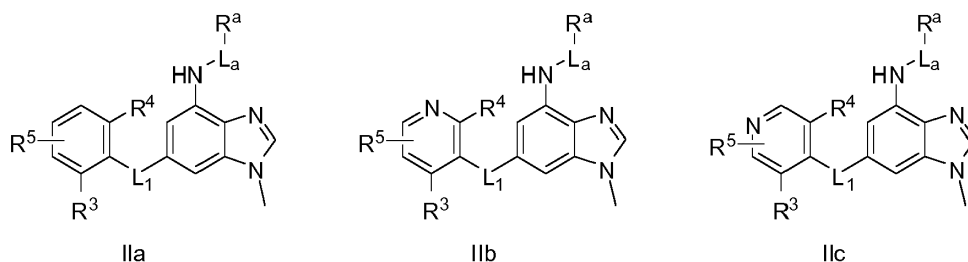
En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que R<sup>1</sup> es Me.

En otra realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que Cy es fenilo.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que Cy es un heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O y S. En otra realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que Cy es heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O y S. En una realización particular, Cy es pirazolilo, pirrolilo, imidazolilo, triazolilo, tiofenilo, tiazolilo, furanilo, piridilo, pirazinilo, pirimidilo, piridazinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzoxazolilo, indolilo o indazolilo.

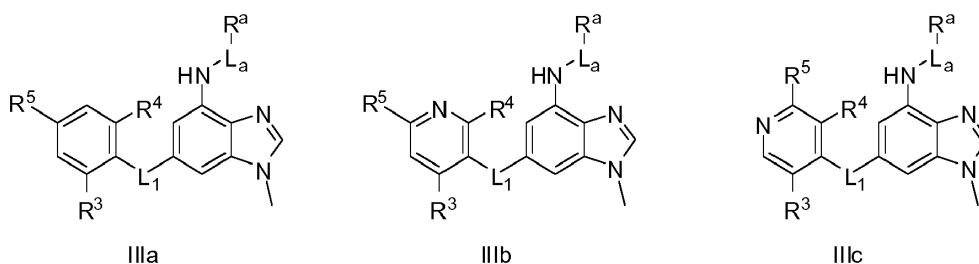
50 En otra realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que Cy es un heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O, y S. En aún otra realización, se usa un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I, en la que Cy es un heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O, y S. En una realización particular, Cy es pirazolilo, pirrolilo, imidazolilo, furanilo, tiofenilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, tiadiazolilo u oxadiazolilo. En otra realización particular, Cy es piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo o piridazolilo. En una realización más particular, Cy es piridilo.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con las Fórmulas IIa, IIb, o IIc:



en las que  $L_1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $L_a$ ,  $R^a$  y  $R^5$  son como se describen en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con las Fórmulas IIIa, IIIb, o IIIc:



5 en las que  $L_1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $L_a$ ,  $R^a$  y  $R^5$  son como se describen en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-IIIc, en las que  $L_1$  es  $-CH_2-$ .

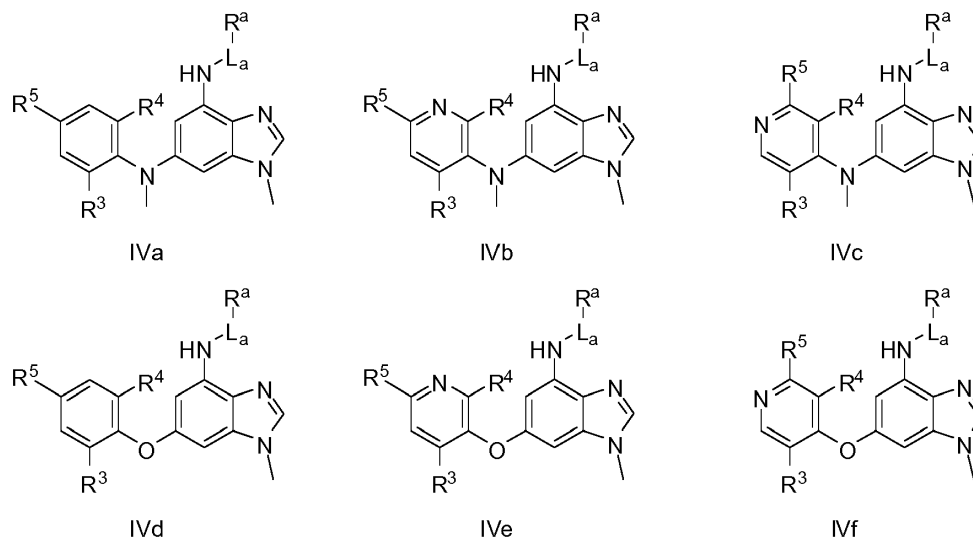
En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-IIIc, en las que  $L_1$  es  $-O-$ .

10 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-IIIc, en las que  $L_1$  es  $-NR^2-$ , y  $R^2$  es como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-IIIc, en las que  $L_1$  es  $-NR^2-$ , en las que  $R^2$  es H.

15 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-IIIc, en las que  $L_1$  es  $-NR^2-$ , en las que  $R^2$  es alquilo  $C_{1-4}$ . En una realización particular,  $R^2$  es Me, Et o iPr. En una realización más particular,  $R^2$  es Me. En otra realización más particular,  $R^2$  es Et.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con las Fórmulas IVa, IVb, IVc, IVd, IVe o IVf:

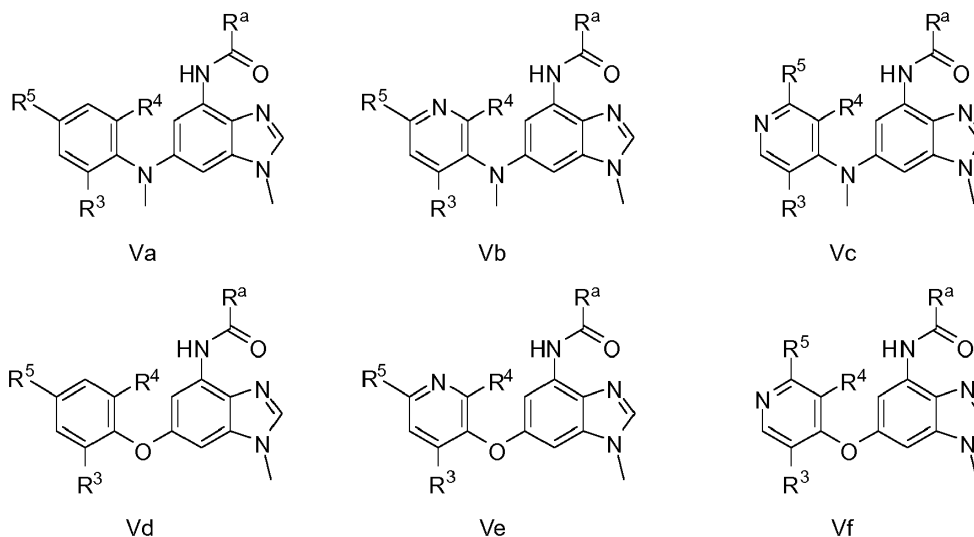


20 en las que  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L_a$ , y  $R^a$  son como se describen en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-IVf, en las que  $L_a$  está ausente.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-IVf, en las que  $L_a$  es  $-C(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ , o  $-C(=O)NH-$ . En una realización particular,  $L_a$  es  $-C(=O)-$ .

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con las Fórmulas Va, Vb, Vc, Vd, Ve o Vf:



5

en las que  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , y  $R^a$  son como se describen en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^4$  es H, o halo. En una realización particular,  $R^4$  es F, o Cl. En otra realización particular,  $R^4$  es H.

10 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^3$  es H.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^3$  es halo. En una realización particular,  $R^3$  es F, o Cl. En una realización más particular,  $R^3$  es Cl.

15 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^3$  es alquilo  $C_{1-4}$ . En una realización particular,  $R_3$  es Me, Et o *n*-Pr. En una realización más particular,  $R^3$  es Me o Et. En una realización más particular,  $R^3$  es Et. En otra realización más particular,  $R^3$  es Me.

En otra realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^3$  es alquilo  $C_{1-4}$  sustituido con uno o más independientemente seleccionados de halo. En una realización particular,  $R_3$  es  $-CHF_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-CH_2-CHF_2$  o  $-CH_2-CF_3$ . En una realización más particular,  $R^3$  es  $-CF_3$ , o  $-CH_2-CF_3$ .

20 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^3$  es alcoxi  $C_{1-4}$ . En una realización particular,  $R_3$  es  $-OMe$ ,  $-OEt$ , o  $-On-Pr$ . En una realización más particular,  $R^3$  es  $-OMe$  o  $-OEt$ .

En otra realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^3$  es alcoxi  $C_{1-4}$  sustituido con uno o más independientemente seleccionados de halo. En una realización particular,  $R_3$  es  $-OCHF_2$ ,  $-OCF_3$ , o  $-OCH_2-CHF_2$ . En una realización más particular,  $R^3$  es  $-OCHF_2$ .

25 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es CN.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es halo. En una realización particular,  $R^5$  es F, o Cl. En una realización más particular,  $R^5$  es F.

30 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $R^6$  es como se describió anteriormente,  $L_2$  es  $-C(=O)NR^7-$ ,  $-NR^7C(=O)-$ ,  $-SO_2NR^7$ , o  $-NR^7SO_2-$ , y  $R^7$  es como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. En una realización particular,  $R^7$  es H. En otra realización particular,  $R^7$  es alquilo  $C_{1-4}$ . En una realización más particular,  $R^7$  es Me, o Et. En una realización especialmente particular,  $R^7$  es Me.

35 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es como se describió anteriormente, y  $R^6$  es H.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es como se describió anteriormente, y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$ . En una realización particular,  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu. En una realización más particular,  $R^6$  es Me, o Et.

5 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es como se describió anteriormente, y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con uno o más grupos  $R^8$  independientemente seleccionados. En otra realización,  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más grupos  $R^8$  independientemente seleccionados. En una realización particular,  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con uno, dos o tres grupos  $R^8$  independientemente seleccionados. En otra realización particular,  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos o tres grupos  $R^8$  independientemente seleccionados. En una  
10 realización más particular,  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con un grupo  $R^8$ . En otra realización particular,  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con un grupo  $R^8$ .

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^8$  es OH, CN, halo o alcoxi  $C_{1-4}$ . En una realización particular,  $R^8$  es OH, CN, F, Cl, -OMe, u -OEt.

15 En una realización particular,  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$   $-C(=O)-$ , o  $-SO_2-$ , y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$ . En una realización más particular,  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es  $-C(=O)-$ , o  $-SO_2-$ , y  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu. En una realización especialmente particular,  $R^5$  es  $-C(=O)Me$ ,  $-C(=O)Et$ ,  $-SO_2Me$  o  $-SO_2Et$ .

20 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es  $-C(=O)NR^7-$ ,  $-NR^7C(=O)-$ ,  $-SO_2NR^7-$ , o  $-NR^7SO_2-$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son como se han definido en cualquiera de las realizaciones anteriores. En una realización particular,  $R^7$  es H, Me o Et, y  $R^6$  es como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. En otra realización particular,  $R^7$  es como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores, y  $R^6$  es H. En aún otra realización particular,  $R^7$  es como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores, y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados de OH, CN, halo, o alcoxi  $C_{1-4}$ . En una realización más particular,  $R^7$  es H, Me o Et, y  $R^6$  es H. En otra realización más particular,  
25  $R^7$  es H, Me o Et, y  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales es opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados de OH, CN, halo o alcoxi  $C_{1-4}$ . En aún otra realización más particular,  $R^7$  es H, Me o Et, y  $R^6$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados de OH, CN, F, Cl, OMe, o OEt. En una realización especialmente particular,  $R^5$  es  $-C(=O)NH_2$  o  $-SO_2NH_2$ .

30 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^a$  es H.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^a$  es alquilo  $C_{1-4}$ . En una realización particular,  $R^a$  es Me, Et, iPr o tBu. En una realización más particular,  $R^a$  es Me, o Et. En una realización más particular,  $R^a$  es Me.

35 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^a$  es alquilo  $C_{1-4}$  sustituido con uno o más  $R^b$  independientemente seleccionados. En otra realización,  $R^a$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más  $R^b$  independientemente seleccionados. En una realización particular,  $R^a$  es alquilo  $C_{1-4}$  sustituido con uno, dos o tres  $R^b$  independientemente seleccionados. En otra realización particular,  $R^a$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos o tres  $R^b$  independientemente seleccionados. En una realización más particular,  $R^a$  es alquilo  $C_{1-4}$  sustituido con un  $R^b$ . En otra  
40 realización más particular,  $R^a$  es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con un  $R^b$ .

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^b$  es halo, CN u OH. En una realización particular,  $R^b$  es F, Cl, CN, u OH.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^b$  es alcoxi  $C_{1-4}$ . En una realización particular,  $R^b$  es OMe, OEt u OiPr. En una realización más particular,  $R^b$  es OMe.

45 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^b$  es cicloalquilo  $C_{3-7}$ . En una realización particular,  $R^b$  es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, o ciclohexilo. En una realización más particular,  $R^b$  es ciclopropilo.

50 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^b$  es heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N y S. En una realización particular,  $R^b$  es oxetanilo, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, o tiomorfolino.

55 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que  $R^b$  es heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N y S, sustituido con uno o más independientemente seleccionados de halo, u oxo. En una realización particular,  $R^b$  es oxetanilo, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino o tiomorfolino, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más independientemente



5 seleccionados de halo, u oxo. En otra realización particular, R<sup>b</sup> es heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, N y S, sustituido con uno o más independientemente seleccionados de F, Cl, u oxo. En una realización más particular, R<sup>b</sup> es oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidínilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más independientemente seleccionados de F, Cl, u oxo. En una realización más particular, R<sup>b</sup> es heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N y S, sustituido con uno, dos o tres independientemente seleccionados de F, Cl, u oxo. En otra realización especialmente particular, R<sup>b</sup> es oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidínilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos o tres independientemente seleccionados de F, Cl, u oxo.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>b</sup> es -SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>. En una realización particular, R<sup>b</sup> es -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o -SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

15 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>b</sup> es -C(=O)NR<sup>b1</sup>R<sup>b2</sup>, en las que cada R<sup>b1</sup> o R<sup>b2</sup> se selecciona independientemente entre H, y alquilo C<sub>1-4</sub>. En una realización particular, cada R<sup>b1</sup> o R<sup>b2</sup> se selecciona independientemente entre H, -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. En una realización más particular, R<sup>b</sup> es -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NMeH, o -C(=O)NMe<sub>2</sub>.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>a</sup> es cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico. En una realización particular, R<sup>a</sup> es ciclopropilo, ciclobutilo o ciclopentilo. En una realización más particular, R<sup>a</sup> es ciclopropilo.

20 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>a</sup> es cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico sustituido con uno o más grupos R<sup>c</sup> independientemente seleccionados. En otra realización, R<sup>a</sup> es ciclopropilo, ciclobutilo o ciclopentilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más grupos R<sup>c</sup> independientemente seleccionados. En una realización particular, R<sup>a</sup> es cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico sustituido con uno, dos o tres grupos R<sup>c</sup> independientemente seleccionados. En otra realización particular, R<sup>a</sup> es ciclopropilo, ciclobutilo o ciclopentilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos o tres grupos R<sup>c</sup> independientemente seleccionados. En una realización más particular, R<sup>a</sup> es cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico sustituido con un grupo R<sup>c</sup>. En otra realización particular, R<sup>a</sup> es ciclopropilo, ciclobutilo o ciclopentilo, cada uno de los cuales está sustituido con un grupo R<sup>c</sup>.

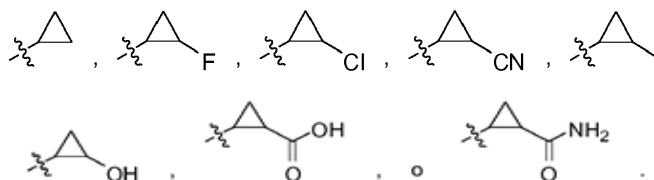
30 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>c</sup> es halo, CN, u OH. En una realización particular, R<sup>c</sup> es F, Cl, CN, u OH. En una realización más particular, R<sup>c</sup> es F.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>c</sup> es alquilo C<sub>1-4</sub>. En una realización particular, R<sup>c</sup> es -Me, -Et, o -iPr.

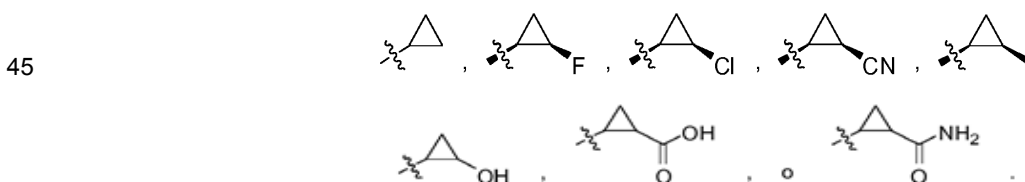
En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>c</sup> es -C(=O)OH.

35 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>c</sup> es -C(=O)NR<sup>c1</sup>R<sup>c2</sup>, en las que cada R<sup>c1</sup> o R<sup>c2</sup> se selecciona independientemente entre H, y alquilo C<sub>1-4</sub>. En una realización particular, cada R<sup>c1</sup> o R<sup>c2</sup> se selecciona independientemente entre H, -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. En una realización más particular, R<sup>c</sup> es -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NMeH o -C(=O)NMe<sub>2</sub>.

40 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>a</sup> es:



En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>a</sup> es:



En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>a</sup> es heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S. En una realización particular, R<sup>a</sup> es oxetaniolo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiraniolo, azetidiniolo, pirrolidiniolo, piperidiniolo, piperaziniolo, morfoliniolo, o tiomorfoliniolo.

5 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I-Vf, en las que R<sup>a</sup> es heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S. En una realización particular, R<sup>a</sup> es furanilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tetrazol, piridinilo, pirazinilo, o pirimidinilo.

10 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto se selecciona de:

N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida,

N-(6-(4-ciano-2-etil-6-fluorofenilamino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida,

N-(6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida,

6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo,

15 6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo,

(1R,2R)-N-[6-((6-ciano-4-etil-3-piridil)oxi)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

N-(6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida (1S, 2S)/(1R, 2R) mezcla racémica,

20 (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida,

(1R, 2R)-N-[6-(4-ciano-2-etil-fenoxi)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-(2-cloro-4-ciano-6-fluoro-N-metil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

25 (1R,2R)-2-fluoro-N-[6-((6-fluoro-4-metil-3-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-((2,6-difluoro-3-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-((6-ciano-2-fluoro-3-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-(4-ciano-2-fluoro-N-metil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

30 (1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N-metil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

N-[6-((4-etil-6-metilsulfonil-3-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-((6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

35 (1R,2R)-N-[6-((6-ciano-2-fluoro-4-metil-3-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-((2-ciano-3-fluoro-5-metil-4-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

N-[6-((6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

5-((4-ciclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)-4-etilpicolinamida,

40 4-etil-5-((4-((1R,2R)-2-fluorociclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)picolinamida,

(1R,2R)-N-[6-(N,2-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

(1R,2R)-N-[6-(4-etilsulfonil-N,2-dimetil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

5-(7-amino-3-metil-bencimidazol-5-il)oxi-4-metil-piridin-2-carbonitrilo,

N-[6-[(4-etil-6-metilsulfonil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

N-[6-[4-(cianometil)anilino]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

N-[6-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilamino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida, y

5 5-[7-[[[(1R,2R)-2-fluorociclopropanocarbonil]amino]-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metilpiridin-2-carboxamida.

En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto se selecciona de

1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea,

4-metil-5-[3-metil-7-(metilamino)bencimidazol-5-il]oxi-piridin-2-carbonitrilo,

10 5-[7-(dimetilamino)-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metil-piridina-2-carbonitrilo,

N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-hidroxi-azetidina-1-carboxamida,

N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]morfolina-4-carboxamida, y

1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea.

15 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto es N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida. En una realización más particular, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.

20 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto no es N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida. En una realización más particular, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto no es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.

25 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto es N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida. En una realización más particular, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto es (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.

30 En una realización, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto no es N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida. En una realización más particular, un compuesto de la invención es de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto no es (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metilo)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.

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

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria está presente como la base libre.

35 En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria es una sal farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria es un solvato del compuesto.

40 En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria es un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto.

45 Aunque los grupos especificados para cada realización generalmente se han enumerado anteriormente por separado, un compuesto de la invención incluye uno en el que varias o cada realización en la fórmula anterior, así como otras fórmulas presentadas en la presente memoria, se seleccionan de uno o más miembros o grupos particulares designado respectivamente, para cada variable. Por lo tanto, esta invención pretende incluir todas las combinaciones de dichas realizaciones dentro de su alcance.

Aunque los grupos especificados para cada realización generalmente se han enumerado anteriormente por separado, un compuesto de la invención puede ser uno para el que una o más variables (por ejemplo, grupos R) se seleccionan de una o más realizaciones de acuerdo con cualquier fórmula o fórmulas anteriormente citadas. Por lo tanto, la

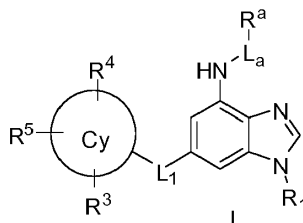
presente invención pretende incluir todas las combinaciones de variables de cualquiera de las realizaciones descritas dentro de su alcance.

De forma alternativa, la presente invención también contempla la exclusión de una o más de las variables especificadas de un grupo o una realización, o combinaciones de las mismas.

- 5 En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona profármacos y derivados de los compuestos de acuerdo con las fórmulas anteriores. Los profármacos son derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos metabólicamente escindibles y se convierten por solvólisis o bajo condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención, que son farmacéuticamente activos, *in vivo*. Dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, derivados de éster de colina y similares, ésteres de N-alquilmorfina y similares.
- 10 Otros derivados de los compuestos de esta invención tienen actividad tanto en sus formas de ácido como en sus formas de derivados de ácidos, pero la forma sensible a los ácidos a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retardada en el organismo de los mamíferos (Bundgard, H, 1985). Los profármacos incluyen derivados de ácidos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, ésteres preparados por reacción del ácido original con un alcohol adecuado o amidas preparadas por reacción del compuesto ácido original con una amina sustituida o no sustituida o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Los ésteres, amidas y anhídridos alifáticos o aromáticos sencillos derivados de grupos ácidos colgantes de los compuestos de esta invención son los profármacos preferidos. En algunos casos es deseable preparar profármacos de tipo doble éster, tales como (aciloxi)alquil ésteres o ((alcoxycarbonil)oxi)alquil ésteres. Particularmente útiles son los ésteres de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub> a C<sub>8</sub>, arilo, arilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, y arilalquilo C<sub>7</sub> a C<sub>12</sub> de los compuestos de la invención.

## 20 Cláusulas

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



en la que,

- 25 R<sup>1</sup> es H, o Me;  
 L<sub>1</sub> es -NR<sup>2</sup>-, -O-, o -CH<sub>2</sub>-;  
 Cy es fenilo, o heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O, y S;  
 R<sup>2</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;  
 R<sup>3</sup> es H, halo, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados entre halo, o  
 30 alcoxi C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados de halo;  
 R<sup>4</sup> es H, o halo;  
 R<sup>5</sup> es -CN, halo o es -L<sub>2</sub>-R<sup>6</sup>  
 -L<sub>2</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)NR<sup>7</sup>, -NR<sup>7</sup>C(=O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR<sup>7</sup>, o -NR<sup>7</sup>SO<sub>2</sub>-;  
 R<sup>6</sup> es H, o alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más grupos R<sup>8</sup> independientemente seleccionados;  
 35 R<sup>7</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;  
 R<sup>8</sup> es OH, CN, halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub>,  
 L<sub>a</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)O- o -C(=O)NH-;  
 R<sub>a</sub> es:  
 • H,  
 40 • alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>b</sup> independientemente seleccionados,  
 • cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>c</sup> independientemente seleccionados, o  
 • heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, N, y S, o  
 • heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente  
 45 seleccionados entre O, N, y S;  
 R<sup>b</sup> es  
 • halo,  
 • CN,  
 • OH,  
 50 • alcoxi C<sub>1-4</sub>,  
 • cicloalquilo C<sub>3-7</sub>,

• heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S (heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados entre halo, u oxo),

• -SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, o

• -C(=O)NR<sup>b1</sup>R<sup>b2</sup>

R<sup>c</sup> es

• halo,

• CN,

• OH,

• alquilo C<sub>1-4</sub>,

• -C(=O)OH, o

• -C(=O)NR<sup>c1</sup>R<sup>c2</sup>, y

cada R<sup>b1</sup>, R<sup>b2</sup>, R<sup>c1</sup> y R<sup>c2</sup> se selecciona independientemente entre H, y alquilo C<sub>1-4</sub>;

o una sal farmacéuticamente aceptable, o un solvato, o un solvato de las sales farmacéuticamente aceptables.

2) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 1, en donde R1 es Me.

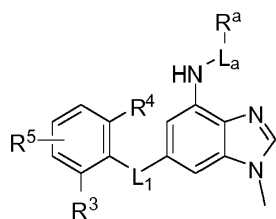
3) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-2, en donde Cy es fenilo.

4) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-2, en donde Cy es un heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O, y S.

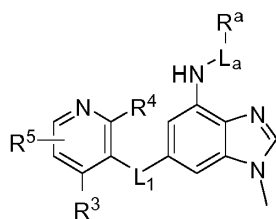
5) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-2, en donde el heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos se selecciona independientemente de N, O y S.

6) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-2, en donde Cy es piridilo.

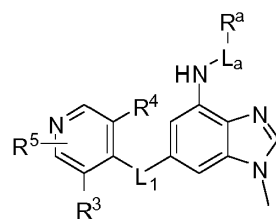
7) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas IIa, IIb, o IIc:



IIa



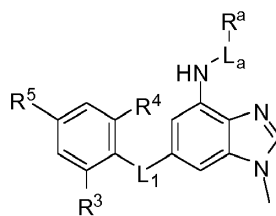
IIb



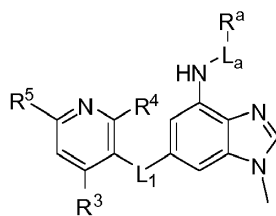
IIc

en las que L<sub>1</sub>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, L<sub>a</sub>, R<sup>a</sup> y R<sup>5</sup> son como se describen en la cláusula 1,

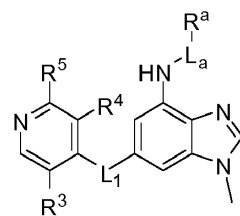
8) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas IIIa, IIIb, o IIIc:



IIIa



IIIb



IIIc

en las que L<sub>1</sub>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, L<sub>a</sub>, R<sup>a</sup> y R<sup>5</sup> son como se describen en la cláusula 1,

9) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-8, en donde L<sub>1</sub> es -CH<sub>2</sub>-.

10) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-8, en donde L<sub>1</sub> es O.

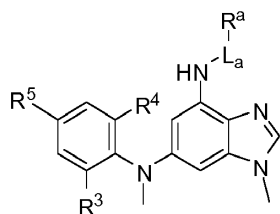
11) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-8, en donde  $L_1$  es  $-NR^2-$ .

12) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 11, en donde  $R^2$  es H.

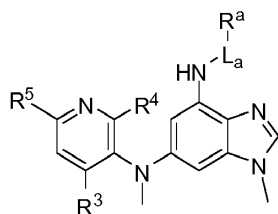
5 13) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 11, en donde  $R^2$  es alquilo  $C_{1-4}$ ,

14) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 11, en donde  $R^2$  es Me.

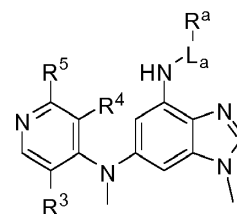
15) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas IVa, IVb, IVc, IVd, IVe o IVf:



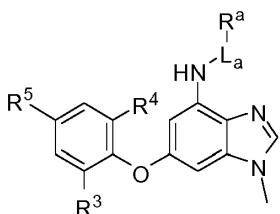
IVa



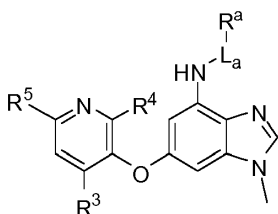
IVb



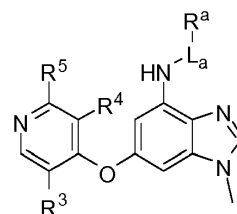
IVc



IVd



IVe



IVf

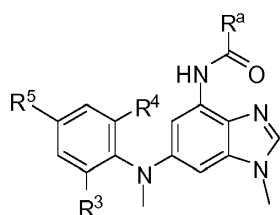
10

en donde  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L_a$ , y  $R^a$  son como se describen en la cláusula 1.

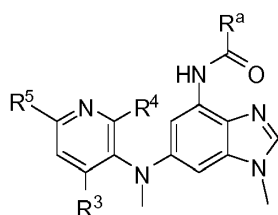
16) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-15, en donde  $L_a$  está ausente.

15 17) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-15, en donde  $L_a$  es  $-C(=O)-$ .

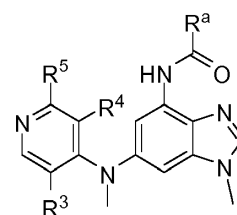
18) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas Va, Vb, Vc, Vd, Ve o Vf:



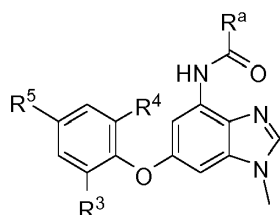
Va



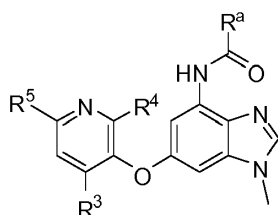
Vb



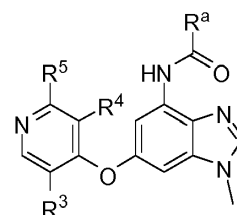
Vc



Vd



Ve

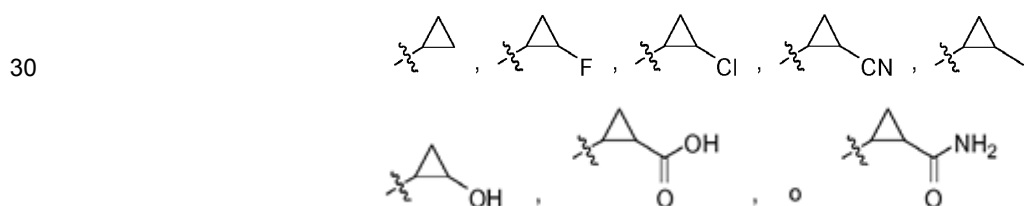


Vf

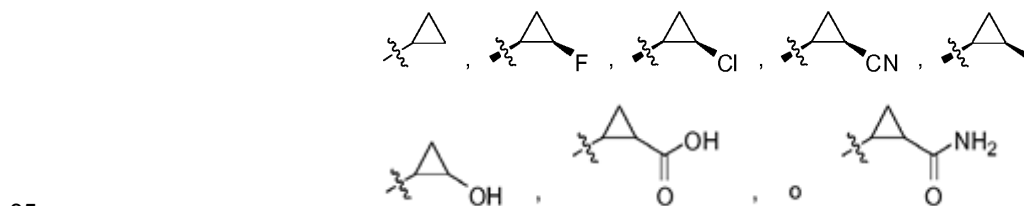
20 en donde  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L_a$ , y  $R^a$  son como se describen en la cláusula 1,

- 19) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-18, en donde  $R^4$  es H.
- 20) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-18, en donde  $R^4$  es F, o Cl.
- 5 21) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-18, en donde  $R^3$  es H.
- 22) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-18, en donde  $R^3$  es alquilo  $C_{1-4}$ .
- 23) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 22, en donde  $R^3$  es Me o Et.
- 10 24) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es CN.
- 25) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es halo.
- 26) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 25, en donde  $R^5$  es F, o Cl.
- 15 27) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $R^6$  es como se describe en la cláusula 1, y  $L_2$  es  $-C(=O)NR^7-$ ,  $-NR^7C(=O)-$ ,  $-SO_2NR^7-$ , o  $-NR^7SO_2$ .
- 28) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 27, en donde  $R^7$  es H.
- 29) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es como se describe en la cláusula 1, y  $R^6$  es H.
- 20 30) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-26, en donde  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es como se describe en la cláusula 1, y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$ .
- 31) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 30, en donde  $R^6$  es Me.
- 32) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ ,  $L_2$  es como se describe en la cláusula 1, y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con uno o más grupos  $R^8$  independientemente seleccionados.
- 25 33) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 32, en donde  $R^6$  es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más grupos  $R^8$  independientemente seleccionados.
- 34) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 33, en la que  $R^8$  es OH, CN, F, Cl, -OMe, u -OEt.
- 30 35) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ , en donde  $L_2$  es  $-C(=O)-$ , o  $-SO_2-$ , y  $R^6$  es alquilo  $C_{1-6}$ .
- 36) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 35, en la que  $R^5$  es  $-C(=O)Me$ ,  $-C(=O)Et$ ,  $-SO_2Me$  o  $-SO_2Et$ .
- 35 37) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde  $R^5$  es  $-L_2-R^6$ , en donde  $L_2$  es  $-C(=O)NR^7-$ ,  $-NR^7C(=O)-$ ,  $-SO_2NR^7-$ , o  $-NR^7SO_2-$ , en donde  $R^7$  es H, Me, o Et, y  $R^6$  es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más OH, CN, halo, o alcoxi  $C_{1-4}$  independientemente seleccionados.
- 38) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 37, en la que  $R^5$  es  $-C(=O)NH_2$ , o  $-SO_2NH_2$ .
- 40 39) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde  $R^a$  es alquilo  $C_{1-4}$ .
- 40) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 39, en donde  $R^a$  es Me, o Et.
- 41) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde  $R^a$  es alquilo  $C_{1-4}$  sustituido con uno o más  $R^b$  independientemente seleccionados.
- 45 42) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41, en donde  $R^a$  es Me, Et, iPr, o tBu.

- 43) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es F, Cl, CN, u OH.
- 44) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es OMe, OEt, u OiPr.
- 5 45) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo.
- 46) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidino, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo.
- 10 47) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidino, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más halo, u oxo independientemente seleccionados.
- 48) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o -SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.
- 15 49) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 41 o 42, en donde R<sup>b</sup> es -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NMeH, o -C(=O)NMe<sub>2</sub>.
- 50) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde R<sup>a</sup> es cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico.
- 20 51) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde R<sup>a</sup> es cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico sustituido con uno o más grupos R<sup>c</sup> independientemente seleccionados.
- 52) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 50 o 51, en donde R<sup>a</sup> es ciclopropilo, ciclobutilo, o ciclopentilo.
- 53) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 51, en donde R<sup>c</sup> es F, Cl, CN, u OH.
- 54) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 51, en donde R<sup>c</sup> es -Me, -Et, o -iPr.
- 25 55) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 51, en donde R<sup>c</sup> es -C(=O)OH.
- 56) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 51, en donde R<sup>c</sup> es -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NMeH, o -C(=O)NMe<sub>2</sub>.
- 57) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde R<sup>a</sup> es:



- 58) Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde R<sup>a</sup> es:



- 59) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde R<sup>a</sup> es heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, N, y S.



- 60) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 59, en donde R<sup>a</sup> es oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiraniilo, azetidiniilo, piroolidiniilo, piperidiniilo, piperaziniilo, morfoliniilo, o tiomorfoliniilo.
- 5 61) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-38, en donde R<sup>a</sup> es heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S.
- 62) Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la cláusula 61, en donde R<sup>a</sup> es furanilo, tienilo, pirroliilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tetrazol, piridinilo, pirazinilo, o pirimidiniilo.
- 63) Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto se selecciona de la Tabla I.
- 10 64) Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metilo-benzimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.
- 15 65) Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto no es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-benzimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.
- 66) Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto es (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.
- 20 67) Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la cláusula 1 en donde el compuesto no es (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.
- 68) Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67.
- 69) La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 68, que comprende un agente terapéutico adicional.
- 25 70) El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67, o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 68-69, para su uso en medicina.
- 71) Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67, o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 68-69, para uso en el tratamiento, o profilaxis de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.
- 30 72) Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67, o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 68-69, para uso en el tratamiento, o profilaxis de enfermedades proliferativas.
- 73) Un compuesto de acuerdo con la cláusula 72, en donde las enfermedades proliferativas se seleccionan de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.
- 35 74) Un método para el tratamiento, o profilaxis de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones, que comprende administrar una cantidad de compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67, o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 68-69, suficiente para efectuar dicho tratamiento o profilaxis.
- 40 75) Un método para el tratamiento, o profilaxis de enfermedades proliferativas, que comprende administrar una cantidad de compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67, o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 68-69, suficiente para efectuar dicho tratamiento, o profilaxis.
- 45 76) Un método de tratamiento de acuerdo con la cláusula 76, en donde las enfermedades proliferativas se seleccionan de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.
- 50

77) El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 75-77, en donde el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-67, o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 68-69, se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.

5 78) La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 69, o el método de acuerdo con la cláusula 78, en donde el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.

10 79) La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 69, o el método de acuerdo con la cláusula 78, en donde el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento, o profilaxis de la mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

### Composiciones farmacéuticas

15 Cuando se emplea como un producto farmacéutico, un compuesto de la invención se administra típicamente en forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I. Generalmente, un compuesto de la invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad  
20 de compuesto de la invención realmente administrada será típicamente determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real de la invención administrado, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

25 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 prevista de administración, un compuesto de la invención se formula preferiblemente como composiciones inyectables u orales o como pomadas, como lociones o como parches, todos para administración transdérmica.

30 Las composiciones para administración oral pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones líquidas a granel, o polvos a granel. Más comúnmente, sin embargo, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitarias para facilitar una dosificación precisa. La expresión "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad 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  
35 ampollas o jeringas precargadas, premedidas, de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas. En dichas composiciones, el compuesto activo es normalmente un componente menor (de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso o, preferiblemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40% en peso) siendo el resto diversos vehículos o portadores y adyuvantes de procesamiento útiles para formar la forma de dosificación deseada.

40 Las formas líquidas adecuadas para administración oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispensación, colorantes, aromatizantes y similares. Las formas sólidas pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, o un compuesto de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma 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.

45 Las composiciones inyectables se basan típicamente en disolución salina estéril inyectable o disolución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Como antes, el compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I en dichas composiciones es típicamente un componente menor, que a menudo es de aproximadamente 0,05 a 10% en peso, siendo el resto el vehículo inyectable y similares.

50 Las composiciones transdérmicas se formulan, típicamente, como una pomada o crema tópica que contiene el ingrediente o ingredientes activos, generalmente, en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20% en peso, preferiblemente, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20% en peso, preferiblemente, de aproximadamente el 10% en peso y, más preferiblemente, de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 15% en peso. Cuando se formulan como una pomada, los ingredientes  
55 activos se combinan, típicamente, con una base de ungüento parafínico o miscible en agua. De manera alternativa, los ingredientes activos se pueden formular en una crema con, por ejemplo, una base de crema de aceite en agua. Dichas formulaciones transdérmicas son bien conocidas en la técnica y, generalmente, incluyen ingredientes adicionales para mejorar la penetración dérmica de la estabilidad de los ingredientes activos o la formulación. La

totalidad de dichas formulaciones transdérmicas e ingredientes conocidos están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

5 Un compuesto de la invención también se puede administrar mediante un dispositivo transdérmico. Por consiguiente, la administración transdérmica se puede lograr usando un parche de tipo depósito o membrana porosa, o una variedad de matriz sólida.

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

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

15 Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas que se pueden preparar de acuerdo con esta invención. La presente invención, sin embargo, no está limitada a las siguientes composiciones farmacéuticas.

#### **Formulación 1 - Comprimidos**

20 Un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Se puede agregar una pequeña cantidad de estearato de magnesio como lubricante. La mezcla se puede formar en comprimidos de 240-270 mg (80-90 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I por comprimido) en una prensa para comprimidos.

#### **Formulación 2 - Cápsulas**

Un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un diluyente de almidón en una relación 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).

#### **25 Formulación 3 - Líquido**

30 Un 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, pasar a través de un tamiz de malla n.º 10 y luego mezclar con una disolución preparada previamente de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica (11:89, 50 mg) en agua. El benzoato de sodio (10 mg), aroma, y colorante se pueden diluir con agua y agregar con agitación. A continuación, se puede agregar suficiente agua con agitación. Luego, se puede agregar suficiente agua para producir un volumen total de 5 ml.

#### **Formulación 4 - Comprimidos**

35 Un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Se puede agregar una pequeña cantidad de estearato de magnesio como lubricante. La mezcla se puede formar en comprimidos de 450-900 mg (150-300 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I) en una prensa para comprimidos.

#### **Formulación 5 - Inyección**

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

#### **40 Formulación 6 - tópica**

Se pueden fundir alcohol estearílico (250 g) y un petrolato blanco (250 g) a aproximadamente 75°C y, a continuación, se añade una mezcla de un 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 agita hasta que se congela.

#### **45 Métodos de tratamiento**

50 Un compuesto de la invención se puede usar como un agente terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos que están causalmente relacionadas o son atribuibles a la actividad aberrante de JAK. En particular, las afecciones relacionadas con la actividad aberrante de JAK1 y/o TYK2. Por consiguiente, los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención encuentran uso como agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartilago, malformaciones congénitas

del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones en mamíferos, incluidos los seres humanos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar como un medicamento.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la fabricación de un medicamento.

En otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para tratar un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, una enfermedad descrita en la presente memoria, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En un aspecto particular, la presente invención  
10 proporciona un método para tratar un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.

15 En un método de aspectos de tratamiento, se describen métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, una reacción alérgica, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la reacción alérgica se selecciona entre la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la sinusitis, el eczema y la urticaria, las alergias a  
20 los alimentos y las alergias al veneno de los insectos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento, y/o profilaxis de una reacción alérgica. En una realización específica, la reacción alérgica se selecciona entre la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la sinusitis, el eczema y la urticaria, las alergias a los alimentos y las alergias al veneno de los insectos.

25 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, o profilaxis de una reacción alérgica. En una realización específica, la reacción alérgica se selecciona entre la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la sinusitis, el eczema y la urticaria, las alergias a los alimentos y las alergias al veneno de los insectos.

30 En un método adicional de aspectos de tratamiento, esta descripción proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, una afección inflamatoria. Los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la afección inflamatoria se selecciona entre la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y las enfermedades inflamatorias del intestino.  
35

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento y/o profilaxis de una afección inflamatoria. En una realización específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias del intestino.

40 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento, y/o profilaxis de una afección inflamatoria. En una realización específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades inflamatorias del intestino.

45 En un método adicional de aspectos de tratamiento, esta divulgación proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, una enfermedad autoinmune. Los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona de COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria del intestino.  
50

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento, y/o profilaxis de una enfermedad autoinmune. En una realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona de EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria del intestino. En una realización más específica, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico.

55 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el

tratamiento, y/o profilaxis de una enfermedad autoinmune. En una realización específica, la enfermedad autoinmune se selecciona de EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria del intestino.

5 En un método adicional de aspectos de tratamiento, esta divulgación proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, una enfermedad proliferativa, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y psoriasis.

10 En una realización más específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento, y/o profilaxis de una enfermedad proliferativa. En una realización específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y psoriasis. En una realización más específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

20

25 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento, y/o profilaxis de una enfermedad proliferativa. En una realización específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y psoriasis. En una realización más específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de colon.

30 En otro método de aspectos de tratamiento, esta descripción proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, el rechazo de trasplante, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz para tratar una afección o prevenir una afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o compuestos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, el rechazo de trasplante es rechazo de trasplante de órgano.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento y/o profilaxis del rechazo de trasplantes. En una realización específica, el rechazo de trasplante es rechazo de trasplante de órgano.

40 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis del rechazo de trasplante. En una realización específica, el rechazo de trasplante es rechazo de trasplante de órgano.

En un método de aspecto de tratamiento, esta descripción proporciona un método de tratamiento, y/o profilaxis en un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartílago, método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartílago.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartílago.

50 La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento y/o profilaxis de malformaciones congénitas del cartílago, método que comprende administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos de la invención descritos en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento y/o profilaxis de malformaciones congénitas del cartílago.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento, y/o profilaxis de malformaciones congénitas del cartílago.

5 En otro método de aspectos de tratamiento, esta divulgación proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6 se selecciona de la enfermedad de Castleman y la glomerulonefritis proliferativa mesangial.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento, y/o profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En una realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6 se selecciona de la enfermedad de Castleman y la glomerulonefritis proliferativa mesangial.

15 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento, y/o profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En una realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6 se selecciona de la enfermedad de Castleman y la glomerulonefritis proliferativa mesangial.

20 En un método adicional de aspectos de tratamiento, esta divulgación proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero que padece, o está en riesgo de padecer, enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones, comprendiendo dichos procedimientos administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones o compuestos farmacéuticos de la invención descritos en la presente memoria. En una realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones se selecciona entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis lúpica, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, psoriasis, y artritis reumatoide.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para usar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones. En una realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones se selecciona entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis lúpica, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, psoriasis, y artritis reumatoide.

30 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento, y/o profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones. En una realización específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones se selecciona entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis lúpica, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, psoriasis, y artritis reumatoide.

35 Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de la invención para usar como un producto farmacéutico, especialmente en el tratamiento y/o la profilaxis de las afecciones y enfermedades anteriormente mencionadas. También se proporciona en la presente memoria el uso de los presentes compuestos en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una de las afecciones y enfermedades antes mencionadas.

40 Un régimen particular del presente método comprende la administración a un sujeto que padece una enfermedad que implica inflamación, de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación en el sujeto, y preferiblemente acabar con los procesos responsables de dicha inflamación. Una realización especial del método comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un paciente sujeto que padece, o está en riesgo de padecer, artritis reumatoide, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la inflamación de las articulaciones de dicho paciente, y preferiblemente acabar con, los procesos responsables de dicha inflamación.

45 Un régimen particular adicional del presente método comprende la administración a un sujeto que padece una enfermedad caracterizada por la degradación del cartílago o la articulación (por ejemplo, artritis reumatoide y/u osteoartritis) de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir, y preferiblemente acabar con, los procesos autoperpetuadores responsables de dicha degradación. Una realización particular del método comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un  
50 paciente sujeto que padece o es susceptible de desarrollar osteoartritis, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación del cartílago en las articulaciones de dicho paciente, y preferiblemente acabar con, los procesos autoperpetuadores responsables de dicha degradación. En una realización particular, dicho compuesto puede exhibir propiedades anabólicas y/o anticatabólicas del cartílago.

55 Los niveles de dosis de inyección oscilan de aproximadamente 0,1 mg/kg/h a al menos 10 mg/kg/h, todos de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 h y, especialmente, de 24 a 96 h. También se puede administrar un bolo de precarga de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más, para alcanzar niveles de estado estacionario adecuados. No se espera que la dosis total máxima exceda aproximadamente los 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

Para la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones a largo plazo, como las afecciones degenerativas, el régimen de tratamiento generalmente se extiende durante muchos meses o años, por lo que se prefiere la dosificación oral para la conveniencia y tolerancia del paciente. Con la administración oral, de una a cinco y especialmente de dos a cuatro y, típicamente, tres dosis orales por día son regímenes representativos. Usando estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de un compuesto de la invención, proporcionando dosis particulares cada una de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg y, especialmente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg.

Las dosis transdérmicas se seleccionan, generalmente, para proporcionar niveles en sangre similares o inferiores a los que se logran usando la dosis de inyección.

10 Cuando se usa para prevenir la aparición de una afección, se administrará un compuesto de la invención a un paciente con riesgo de desarrollar la afección, típicamente, bajo el asesoramiento y la supervisión de un médico, a los niveles de dosificación descritos anteriormente. Los pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad en particular incluyen generalmente aquellos que tienen un historial familiar de la afección, o aquellos que han sido identificados por pruebas genéticas o detección como particularmente susceptibles de desarrollar la enfermedad.

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

20 En una realización, un compuesto de la invención o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención se administra como un medicamento. En una realización específica, dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente un ingrediente activo adicional.

25 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que implica inflamación; los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunorreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticosteroides (por ejemplo, prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato de mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3, por ejemplo, Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno, y piroxicam.

30 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de la artritis (por ejemplo, artritis reumatoide); los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS), esteroides, DMARDS sintéticos (por ejemplo, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofina, aurotiomato de sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxicloraquina, azatioprina, y ciclosporina) y DMARDS biológicos (por ejemplo, pero no se limitan a, Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab, y Abatacept).

35 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de trastornos proliferativos; agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: metotrexato, leucovorina, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ejemplo, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (por ejemplo, Avastin™), inhibidores del proteosoma (por ejemplo, Velcade™), inhibidores de Glivec® y hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Adicionalmente, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con otras terapias que incluyen, pero no se limitan a, radioterapia o cirugía. En una realización específica, el trastorno proliferativo se selecciona de cáncer, enfermedad mieloproliferativa y leucemia.

45 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades autoinmunes, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: glucocorticoides, agentes citostáticos (por ejemplo, análogos de purina), agentes alquilantes, (por ejemplo, mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino y otros), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ejemplo, dactinomicina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OKT3), Atgam® y Timoglobulina®), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones (por ejemplo, IFN-β), proteínas de unión a TNF (por ejemplo, infliximab (Remicade™), etanercept (Enbrel™) o adalimumab (Humira™)), micofenolato, Fingolimod y Myriocin.

55 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención del rechazo de trasplante, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (por ejemplo, sirolimus, everolimus), antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos s (por ejemplo, anticuerpos de receptor anticuerpo monoclonal anti-IL-2Rα,

basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti células T (por ejemplo, globulina antitimocito (ATG), globulina antilinfocito (ALG)).

5 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de asma y/o rinitis y/o COPD, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: agonistas beta2-adrenérgicos (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhala-  
 10 da o comprimidos), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio), glucocorticoides (orales o inhalados) agonistas  $\beta_2$  de acción prolongada (por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol, y albuterol oral de liberación sostenida), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ejemplo fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrienos e inhibidores de síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlukast y zileuton), inhibidores de liberación de mediadores (por ejemplo, cromoglicato y ketotifeno), reguladores biológicos de la respuesta IgE (por ejemplo omalizumab), antihistaminas (por ejemplo, ceterizina, cinarizina, fexofenadina), y vasoconstrictores (por ejemplo oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

15 Adicionalmente, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con terapias de emergencia para asma y/o la COPD, dichas terapias incluyen la administración de oxígeno o de heliox, salbutamol o terbutalina nebulizada (opcionalmente combinado con un anticolinérgico (por ejemplo ipratropio), esteroides sistémicos (oral o intravenoso, por ejemplo, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona o hidrocortisona), salbutamol intravenoso, betaagonistas no específicos, inyectados o inhalados (por ejemplo, epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol), anticolinérgicos (IV o nebulizado, por ejemplo, glicopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina, bamifilina), anestésicos inhalatorios que tienen un efecto broncodilatador (por ejemplo, isoflurano, halotano, enflurano), ketamina, sulfato de magnesio intravenoso.

20 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, budesonida) agentes inmunomoduladores que modifican la síntesis de la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptapurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores que modifican una enfermedad biológica (infiximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

25 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de SLE; los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) tales como los antipalúdicos (por ejemplo plaquenil, hidroxicloroquina), los inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), la ciclofosfamida y el ácido micofenólico; fármacos inmunosupresores y analgésicos, tales como los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, los opiáceos (por ejemplo, dextropropoxifeno y co-codamol), los opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona, MS Contin o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo duragesic.

30 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de la psoriasis, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: tratamientos tópicos, como disoluciones de baño, cremas hidratantes, cremas medicadas y ungüentos que contienen alquitrán de hulla, ditranol (antralina), corticosteroides, tales como desoximetasona (Topicort<sup>TM</sup>), fluocinonida, análogos de la vitamina D3 (por ejemplo, calcipotriol), aceite de Argan y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos, tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxíurea, sulfasalazina, micofenolato de mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o agentes biológicos tales como Amevive<sup>TM</sup>, Enbrel<sup>TM</sup>, Humira<sup>TM</sup>, Remicade<sup>TM</sup>, Raptiva<sup>TM</sup> y ustekinumab (un bloqueador de IL-12 e IL-23). Además, se puede administrar un compuesto de la invención en combinación con otras terapias, que incluyen, pero no se limitan a, fototerapia, o fotoquimioterapia (por ejemplo, psoraleno y fototerapia ultravioleta A (PUVA)).

35 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de reacción alérgica, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: antihistamínicos (por ejemplo, cetirizina, difenhidramina, fexofenadina, levocetirizina), glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, betametasona, beclometasona, dexametasona), epinefrina, teofilina o antileucotrienos (por ejemplo, montelukast o zafirlukast), anticolinérgicos y descongestionantes.

40 Durante la administración conjunta se incluye cualquier medio de suministro de dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para el experto en la técnica. Aunque los dos o más agentes pueden ser administrados simultáneamente en una única formulación, esto no es esencial. Los agentes se pueden administrar en formulaciones diferentes y en momentos diferentes.

## Procedimientos de química sintética

### General

45 Los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes procedimientos y métodos generales. Se apreciará que cuando se proporcionan condiciones de procesamiento típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones en moles de reactivos, disolventes, presiones, etc.), también se pueden usar otras condiciones del procedimiento, a menos que se indique lo



contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactantes o disolventes particulares usados, pero dichas condiciones pueden ser determinadas por un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización rutinarios.

- 5 Además, como será evidente para el experto en la técnica, se pueden necesitar grupos protectores convencionales para prevenir que ciertos grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, así como las condiciones adecuadas para la protección y desprotección, son bien conocidas en la técnica (Greene, T W; Wuts, P G M; 1991).

- 10 Los siguientes procedimientos se presentan con detalle en cuanto a la preparación de un compuesto de la invención como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y los ejemplos comparativos. Un experto en la técnica de la síntesis orgánica puede preparar un compuesto de la invención a partir de materiales de partida y reactantes conocidos o disponibles comercialmente.

- 15 Todos los reactivos fueron de calidad comercial y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. Se usaron disolventes anhidros disponibles comercialmente para reacciones llevadas a cabo en atmósfera inerte. Se usaron disolventes de calidad reactiva en todos los demás casos, a menos que se especifique lo contrario. Se realizó una cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (35-70  $\mu\text{m}$ ). Se realizó una cromatografía de capa fina usando placas F-254 de gel de sílice pre-revestidas (espesor 0,25 mm). Se registraron los espectros  $^1\text{H}$  RMN en un espectrómetro Bruker DPX 400 NMR (400 MHz o un espectrómetro Bruker Advance 300 NMR (300 MHz)). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) para los espectros  $^1\text{H}$  RMN se presentan en partes por millón (ppm) con relación a tetrametilsilano ( $\delta$  0,00) o el pico del disolvente residual apropiado, es decir,  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta$  7,27), como referencia interna. Las multiplicidades se dan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), quinteto (quin), multiplete (m) y ancho (br). Los espectros de electropulverización MS se obtuvieron en un espectrómetro Platform LC/MS o con un sistema Waters Acquity H-Class UPLC acoplado a un espectrómetro detector de masas Waters 3100. Columnas utilizadas: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm ID x 50 mm L, Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm ID x 30 mm L, o Waters Xterra MS 5  $\mu\text{m}$  C18, 100 x 4,6 mm. Todos los procedimientos usan gradientes de  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{H}_2\text{O}$  contiene o bien 0,1% de TFA o bien 0,1% de  $\text{NH}_3$ ) o gradientes de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{H}_2\text{O}$  contiene 0,05% de TFA). El calentamiento por microondas se realizó con un equipo Biotage Initiator.

- 20 Las purificaciones mediante HPLC preparativa se realizaron con un sistema de autopurificación dirigido a masa acoplado con un espectrómetro de masas de cuadrupolo único ZQ. Todas las purificaciones por HPLC se realizaron con un gradiente de  $\text{H}_2\text{O}$  (pH diferentes)/ $\text{MeCN}$ . Las separaciones por HPLC preparativa en condiciones básicas se llevaron a cabo usualmente usando una precolumna BEH X Brigde C18 (5  $\mu\text{m}$ , 19x5 mm) y una precolumna BEH X Brigde C18 (5  $\mu\text{m}$ , 19x100 mm). Las separaciones en condiciones ácidas se llevaron a cabo usualmente usando una precolumna CSH Select C18 (5  $\mu\text{m}$ , 19x5 mm) y una precolumna CSH Select C18 (5  $\mu\text{m}$ , 19x100 mm). El gradiente objetivo fue de x% a x + 25% de acetonitrilo en agua en 5 min con un tiempo de ciclo de 10 min. El caudal de columna fue de 20 ml/min. El volumen de inyección varió de 200 a 750  $\mu\text{L}$ . Se usó un divisor de columna capilar para desviar el flujo después de la separación de la columna al espectrómetro de masas que se diluyó en 1 ml/min de flujo de reposición. El flujo de reposición es 0,1% de ácido fórmico en metanol. Todas las muestras se purificaron mediante una colección de fracciones dirigidas por masa de Waters.

**Tabla I. Lista de abreviaturas utilizadas en la sección experimental:**

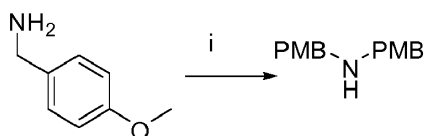
Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
AcOH	Ácido acético	DCM	diclorometano
ATP	Trifosfato de adenosina	DMF	dimetil formamida
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo	DMSO	dimetilsulfóxido
br s	singlete ancho	DPPA	difenilfosforilazida
Brettphos	2-(diciclohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropilo-1,1'-bifenilo	Dsc'd	completamente descrito antes
BSA	Albúmina de suero bovino	TDT	ditiotreitól
C'ial	disponible comercialmente	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Conc	concentrado	EGTA	ácido etilenglicol tetraacético
Cpd	compuesto	$\text{Et}_2\text{O}$	dietil éter
EtOH	etanol	$\text{Et}_3\text{B}$	trietilborano
FACS	clasificación de célula activada por fluorescencia	$\text{Et}_3\text{N}$	trietilamina
FBS	Suero fetal bovino	EtOAc	acetato de etilo
g	gramo	NMP	N-metilpirrolidona
h	hora	NMR	resonancia magnética nuclear
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico	PBS	disolución salina tamponada con fosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta presión	pBSK	fagémido pBluescript
Int	intermedio	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	acetato de paladio(II)
iPrOH	iso-Propanol	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)

Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
m	multiplete	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0)
M	masa	PdCl <sub>2</sub> (dppf). DCM	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloro-paladio(II), complejo con diclorometano
MC	metilcelulosa	PDX	xenoinjertos derivados de pacientes
MeCN	acetonitrilo	PET	tomografía de emisión de positrones
Mel	yodometano	PMB	para-metoxibencilo
MeNH <sub>2</sub>	metil amina	ppm	partes por millón
Metanol	MeOH	p-TsOH.H <sub>2</sub> O	monohidrato de ácido para-toluensulfónico
mg	miligramo	rt	temperatura ambiente
mim	minuto	s	singlete
mililitro	ml	sat	saturado
mmol	milimoles	SiO <sub>2</sub>	silíce
MOPS	ácido 3-(N-morfolin)propano-sulfónico	SM	materia de partida
MS Ms'd	peso molecular medido por espectrometría de masas	TFA	Ácido trifluoroacético
Mtd	método	THF	tetrahidrofurano
MW	peso molecular	Xantphos	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno
NCS	N-clorosuccinimida	XPhos	2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-bifenilo

## Preparación sintética del compuesto de la invención

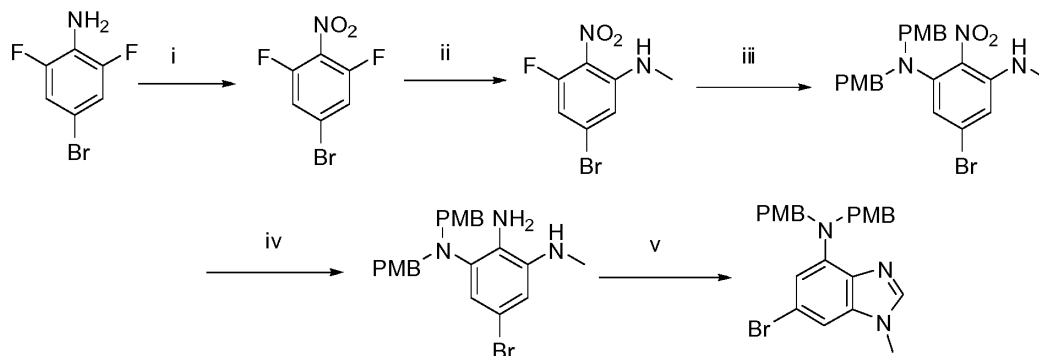
### Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos intermedios de la invención

#### 5 1.1. Síntesis de bis-(4-metoxi-bencil)-amina (Int. 1)



Se combinaron *p*-anisaldehído (411 mmol), 4-metoxibencilamina (411 mmol) y tolueno (500 ml) en un matraz de fondo redondo provisto de un condensador y una trampa Dean-Stark. La reacción se calentó a reflujo durante 1 h, durante lo cual se eliminó agua de la mezcla de reacción. Se enfrió y se concentró la reacción. El residuo se disolvió en MeOH (120 ml). La mezcla se enfrió hasta 5°C y se añadió NaBH<sub>4</sub> (205 mmol) en porciones durante 45 min. La reacción se calentó lentamente a reflujo. Después de 2 h a reflujo, la reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó (3 x H<sub>2</sub>O y salmuera), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

#### 15 1.2. Síntesis de (6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il)-bis-(4-metoxi-bencil)-amina (Int.2)



##### 1.2.1. Etapa i: 5-Bromo-1,3-difluoro-2-nitro-benceno

Se añadió gota a gota una disolución de 4-bromo-2,6-difluoroanilina (240 mmol) en AcOH (150 ml) a una suspensión de NaBO<sub>3</sub>·4 H<sub>2</sub>O (325 mmol) en AcOH (450 ml) a 70°C durante 30 min. Se añadieron otros 2.080 mmol de NaBO<sub>3</sub>·4 H<sub>2</sub>O durante 5 horas a la mezcla. Durante este período, la mezcla se agitó a 70°C. La mezcla se vertió en agua y se extrajo con Et<sub>2</sub>O. La capa orgánica se combinó con otra disolución de Et<sub>2</sub>O obtenida de otra reacción usando las mismas condiciones descritas anteriormente. Se concentró la mezcla. Se formó un precipitado y se separó por

filtración. El filtrado se concentró para proporcionar el producto deseado después de la cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, éter de petróleo).

#### 1.2.2. Etapa ii: (5-Bromo-3-fluoro-2-nitro-fenil)-metil-amina

5 Se añadió gota a gota 2 M de MeNH<sub>2</sub> en THF (82 ml) a una disolución de 5-bromo-1,3-difluoro-2-nitrobenzoceno (164 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (197 mmol) en THF (1 L). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 hora y luego a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se repartió entre EtOAc y H<sub>2</sub>O. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

#### 1.2.3. Etapa iii: 5-Bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N'-metil-2-nitro-benceno-1,3-diamina

10 Se agitó una mezcla de bis-(4-metoxi-bencil)-amina (346 mmol), 5-bromo-3-fluoro-N-metil-2-nitroanilina (297 mmol) y Et<sub>3</sub>N (891 mmol) a 120°C durante 16 h. A continuación, se enfrió la mezcla. El producto bruto se combinó con otro obtenido siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. La mezcla resultante se diluyó en EtOAc y se lavó (2 x 0,2 M de HCl, H<sub>2</sub>O y NaHCO<sub>3</sub> sat.). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

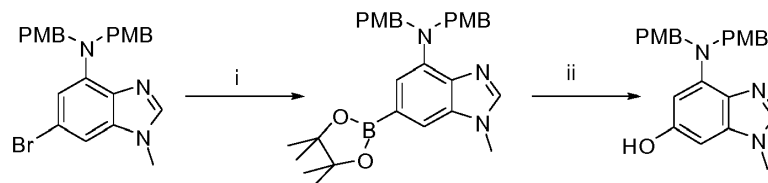
#### 1.2.4. Etapa iv: 5-Bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N"-metil-benceno-1,2,3-triamina

15 Se agitó una mezcla de 5-Bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N'-metil-2-nitro-benceno-1,3-diamina (170 mmol), NH<sub>4</sub>Cl (2.038 mmol) y Zn (2.034 mmol) en MeOH/THF 1:1 (1 L) a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta 0°C y se añadió HCOOH (20 ml) lentamente. La mezcla se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla se filtró y combinó con otra obtenida siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se concentró la mezcla resultante. El residuo se disolvió en DCM. La mezcla orgánica se lavó (NH<sub>4</sub>Cl sat.), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

#### 1.2.5. Etapa v: (6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il)-bis-(4-metoxi-bencil)-amina

25 Se disolvió 5-Bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N"-metil-benceno-1,2,3-triamina (170 mmol) en una mezcla de HC(OEt)<sub>3</sub> (100 mol) y MeCN (500 ml). La mezcla se agitó a 85°C durante 0,5 h y luego a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. La mezcla se combinó con otra obtenida siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. La mezcla resultante se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 15:85 a 60:40 de EtOAc/éter de petróleo) para obtener el producto deseado.

### 1.3. Síntesis de 5-{7-[Bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int. 3).



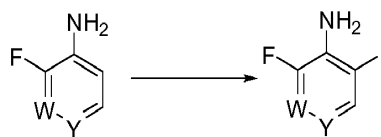
#### 1.3.1. Etapa i: Bis-(4-metoxi-bencil)-[1-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2] dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol-4-il]-amina

35 Se sonicó una mezcla de (6-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il)-bis-(4-metoxi-bencil)-amina (54 mmol), bis(pinacolato)diboro (81 mmol), PdCl<sub>2</sub>(dppf).DCM (2,71 mmol) y KOAc (162,5 mmol) en DMF (150 ml) durante 5 minutos bajo una corriente de nitrógeno. La mezcla se agitó después a 110°C en un matraz de fondo redondo provisto de un condensador durante 1 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite y se concentró el filtrado. El residuo se disolvió en EtOAc y la capa orgánica se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

#### 1.3.2. Etapa ii: 5-{7-[Bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metilpiridina-2-carbonitrilo

40 Se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en peso en H<sub>2</sub>O (20 ml) a una disolución de N,N-bis(4-metoxibencil)-1-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol-4-amina (58,5 mmol) en DMF (600 ml) y la mezcla se agitó durante aproximadamente 16 h a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> acuoso al 5%. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

#### 45 1.4. Método general: yodación orto-dirigida

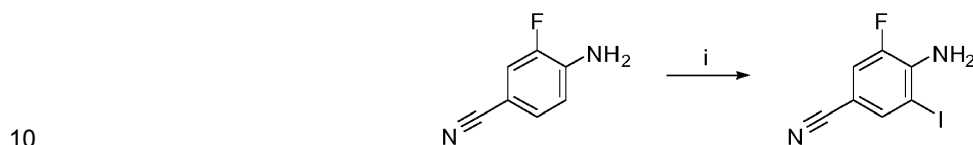


en la que W puede ser: -N=, -CH=, -C(Cl)=; Y puede ser: -N=, -C(CN)=

#### 1.4.1. Método A1

5 Se agitó una mezcla del material de partida amino aromático o heteroaromático (1 eq),  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  (1 eq) e  $\text{I}_2$  (1 eq) en EtOH, a temperaturas que varían desde la temperatura ambiente hasta  $50^\circ\text{C}$  durante un período que puede variar desde 1 h hasta aproximadamente 16 h. La mezcla se filtra, concentra y diluye en un disolvente orgánico. La mezcla orgánica se somete a un tratamiento acuoso. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida para producir el producto deseado.

#### 1.4.2. Ejemplo ilustrativo del método A1: síntesis de 4-amino-3-fluoro-5-yodo-benzonitrilo (Int.4).

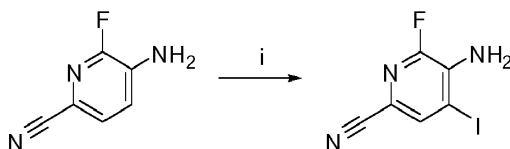


Se agitó una mezcla de 4-amino-3-fluorobenzonitrilo (147 mmol),  $\text{I}_2$  (147 mmol) y  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  (147 mmol) en EtOH (700 ml) a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se filtró y concentró la mezcla. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 3 \text{ sat.}$ ). Se filtró y concentró la capa orgánica ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , ciclohexano/EtOAc de 95:5 a 70:30) para producir el producto deseado.

#### 15 1.4.3. Método A2

Se agitó una mezcla del material de partida amino aromático o heteroaromático (1 eq),  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  (de 3 a 4 eq) e  $\text{I}_2$  (de 3 a 4 eq) en EtOH a  $70^\circ\text{C}$  durante 16 h. Se podían agregar más equivalentes de  $\text{I}_2$  y  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  para aumentar la conversión. Se filtró y concentró la mezcla. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para producir el producto deseado.

#### 20 1.5. Ejemplo ilustrativo del método A2: síntesis de 5-amino-6-fluoro-4-yodo-piridina-2-carbonitrilo (Int. 5).



25 Se agitó una mezcla de Int.11 (3,62 mmol),  $\text{I}_2$  (14,5 mmol) y  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  (14,5 mmol) en EtOH (200 mL) a  $70^\circ\text{C}$  durante 16 h. Se añadieron 5 equivalentes más de  $\text{I}_2$  y  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  y la reacción se agitó a  $70^\circ\text{C}$  durante otras 72 h. La mezcla se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , de 20:80 a 40:60 de EtOAc/ciclohexano) para producir el producto deseado.

#### 1.6. Método general: introducción del grupo del nitrilo por la reacción de Negishi

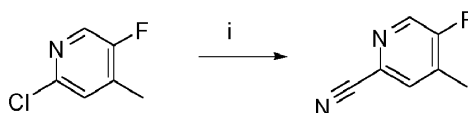


en la que  $\text{R}_A$  puede ser arilo o heteroarilo; y X puede ser Cl, Br o I.

#### 30 1.6.1. Método B

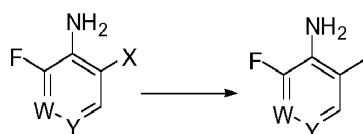
35 Se calentó una mezcla de haluro de arilo/heteroarilo (1 eq), cianuro de cinc (de 1 a 3 eq), Pd ( $\text{PPh}_3$ )<sub>4</sub> (de 0,1 a 0,2 eq) en DMF, a  $150^\circ\text{C}$  en un aparato de microondas durante un período que varió de 5 min a 0,5 h. Se filtró y concentró la mezcla. El residuo se diluyó con un disolvente orgánico. La mezcla orgánica se sometió a un tratamiento y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se trituró o purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para producir el producto deseado.

#### 1.6.2. Ejemplo ilustrativo del método B: síntesis de 5-fluoro-4-metil-piridina-2-carbonitrilo (Int. 7).



Se cargó un tubo de microondas con 2-cloro-5-fluoro-4-metilpiridina (5,5 mmol), Zn (CN)<sub>2</sub> (16,6 mmol), Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,1 mmol) en DMF (20 ml). La mezcla se agitó a 150°C durante 5 min en un reactor de microondas. La mezcla se combinó con otros productos brutos obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se filtró la mezcla resultante. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó (NH<sub>4</sub>Cl sat.), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 5:95 a 15:85 de EtOAc/éter de petróleo) para producir el producto deseado.

#### 1.7. Método general: Suzuki con ácido metil borónico

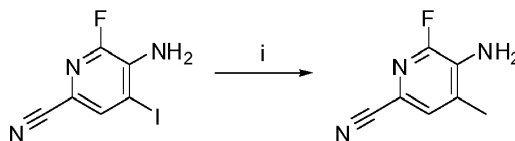


en la que W puede ser: -N=, -CH=, -C(Cl)=; e Y puede ser: -N=, -C(CN)=; y X puede ser -I o -Br.

##### 1.7.1. Método C

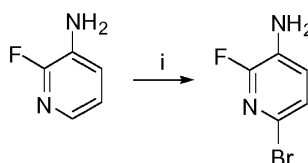
Se agitó una mezcla del haluro aromático/heteroaromático (1 eq), ácido metil borónico (de 1,3 a 3 eq), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>.DCM (de 0,11 a 0,2 eq) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (de 3 a 5 eq) en 1,4-dioxano, a 100°C. La mezcla se diluyó con un disolvente orgánico. La mezcla orgánica se sometió a un tratamiento acuoso y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para producir el producto deseado.

##### 1.7.2. Ejemplo ilustrativo del método C: síntesis de 5-amino-6-fluoro-4-metil-piridina-2-carbonitrilo (Int. 12).



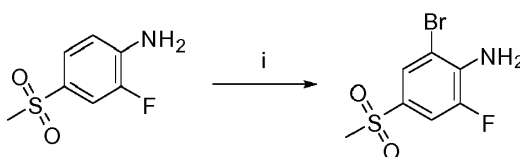
Se agitó una mezcla de Int.5 (3 mmol), ácido metil borónico (9,1 mmol), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>.DCM (0,32 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15,2 mmol) en 1,4-dioxano (8 ml), a 105°C durante 5 h. La mezcla se diluyó (EtOAc), se lavó (NaHCO<sub>3</sub> sat.), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 10:90 a 50:50 de EtOAc/éter de petróleo) para producir el producto deseado.

#### 1.8. Síntesis de 6-bromo-2-fluoro-piridin-3-ilamina (Int. 15)



Se agitó una mezcla de 2-fluoropiridin-3-amina (44,6 mmol) y KOAc (44,6 mmol) en AcOH se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se enfrió a 0°C y se añadió Br<sub>2</sub> (44,6 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos. La mezcla se concentró y el residuo se disolvió en EtOAc/MeOH. La disolución orgánica se lavó (NaHCO<sub>3</sub> sat., Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sat.), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 80:20 de éter de petróleo/EtOAc) para producir el producto deseado.

#### 1.9. Síntesis de 2-bromo-6-fluoro-4-metanosulfonil-fenilamina (Int. 16).

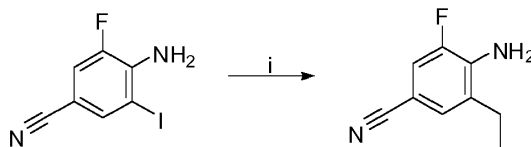


Se agitó una mezcla de 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina (22,76 mmol) y KOAc (22,7 mmol) en AcOH a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió hasta 0°C y se añadió Br<sub>2</sub> (22,7 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó durante 30 min

a 0°C. La mezcla se concentró y el residuo se recogió en EtOAc. La mezcla orgánica se lavó (NaHCO<sub>3</sub> sat., Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sat.), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

1.10. Síntesis de 4-amino-3-etil-5-fluorobenzonitrilo (Int. 17).

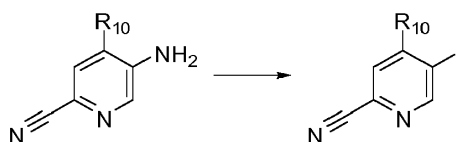
5



10

Se suspendió una mezcla de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (46 mmol) y Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>.DCM (0,76 mmol) en DMF (35 ml) y se desgasificó con nitrógeno. Se añadieron H<sub>2</sub>O (400 µL), Et<sub>3</sub>B 1 M en THF (11,5 mL) y una disolución de Int.4 (7,63 mmol) en DMF (5 mL) a la mezcla y la reacción se agitó a 60°C durante 30 min. La mezcla se concentró y el residuo se recogió en EtOAc, se lavó (NaHCO<sub>3</sub> sat., H<sub>2</sub>O), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 95:5 de éter de petróleo/EtOAc) para producir el producto deseado.

1.11. Método general: conversión de NH<sub>2</sub> en yoduro



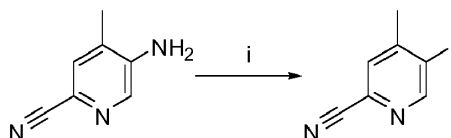
en la que R<sub>10</sub> puede ser Me o Et.

15 1.11.1. Método D

Se agregó HCl Conc. (6 eq) gota a gota a una mezcla del compuesto amino aromático/heteroaromático (1 eq) en H<sub>2</sub>O a 0°C. Se agregó gota a gota una disolución de NaNO<sub>2</sub> (1,05 eq) en H<sub>2</sub>O. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 15 min. Se agregó gota a gota una disolución de KI (1,05 eq) en H<sub>2</sub>O. La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos y durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con un disolvente orgánico. Después del tratamiento acuoso y la eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo sometió a trituración o cromatografía para producir el producto deseado.

20

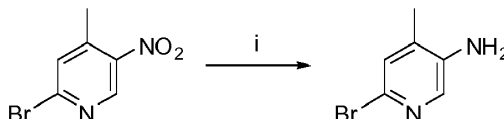
1.11.2. Ejemplo ilustrativo del método D: síntesis de 5-yodo-4-metilpiridina-2-carbonitrilo (Int. 18).



25

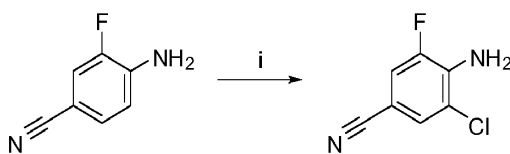
Se agregó HCl Conc. (0,9 ml) gota a gota a una mezcla de Int.8 (1,88 mmol) en H<sub>2</sub>O (10 ml) a 0°C, seguido de la adición gota a gota de una disolución de NaNO<sub>2</sub> (1,97 mmol) en H<sub>2</sub>O (0,5 ml). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 15 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de KI (1,97 mmol) en H<sub>2</sub>O (1 ml). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 15 minutos y durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 75:25 de ciclohexano/EtOAc) para producir el producto deseado.

30 1.12. Síntesis de 6-bromo-4-metilpiridin-3-ilamina (Int.20)



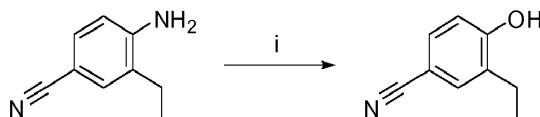
Se agitó una mezcla de NH<sub>4</sub>Cl (14,9 mmol) y polvo de hierro (18,4 mmol) en H<sub>2</sub>O (5 mL) a 90°C. Se añadió 2-bromo-4-metil-5-nitropiridina (2,3 mmol) por partes. La mezcla se agitó a 90°C durante 1 hora y 15 minutos. La reacción se detuvo y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

35 1.13. Síntesis de 4-amino-3-cloro-5-fluorobenzonitrilo (Int. 21)



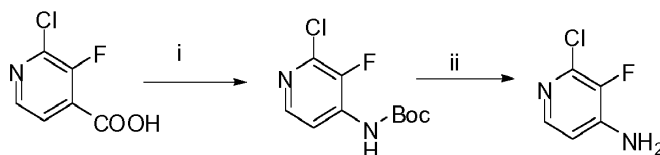
Se agitó una mezcla de 4-amino-3-fluorobenzonitrilo (184 mmol) y NCS (276 mmol) en AcOH (300 ml) a 70°C durante aproximadamente 16 h. Se concentró la mezcla. Se añadió H<sub>2</sub>O al residuo y el producto sólido se separó por filtración y se lavó (NaHCO<sub>3</sub> sat. y H<sub>2</sub>O). Para eliminar H<sub>2</sub>O, se añadió THF y se eliminó a presión reducida para producir el producto deseado.

#### 1.14. Síntesis de 3-etil-4-hidroxibenzonitrilo (Int.22)



Se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (3,4 ml) gota a gota a una disolución de 4-amino-3-etilbenzonitrilo (6,84 mmol) en H<sub>2</sub>O (12 ml) a 0°C. Se añadió una disolución de NaNO<sub>2</sub> (7,52 mmol) en H<sub>2</sub>O (5 ml) gota a gota a 0°C a la mezcla resultante. La reacción se agitó a 0°C durante 30 min y a 100°C durante 2 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó y se concentró para producir el producto deseado.

#### 1.15. Síntesis de 2-cloro-3-fluoro-piridin-4-ilamina (Int.23)



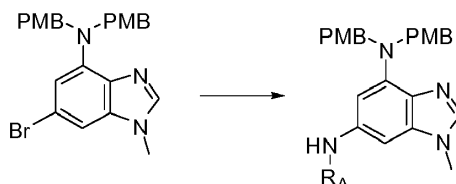
##### 1.15.1. Etapa i: N-(2-cloro-3-fluoro-4-piridil)carbamato de terc-butilo

Se añadió difenilfosforilazida (DPPA) (129 mmol) a una mezcla de ácido 2-cloro-3-fluoropiridin-4-carboxílico (85,7 mmol), Et<sub>3</sub>N (257 mmol) en 1:1 de terc-BuOH/tolueno (200 ml). La mezcla se calentó a 110°C durante 4 h. La mezcla se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 80:20 de DCM/EtOAc) para producir el producto deseado N-(2-cloro-3-fluoro-4-piridil)carbamato de terc-butilo.

##### 1.15.2. Etapa ii: 2-cloro-3-fluoro-piridin-4-ilamina

Se agitó una disolución de N-(2-cloro-3-fluoro-4-piridil)carbamato de terc-butilo (20,2 mmol) en 1:2 de TFA/DCM (45 ml) a temperatura ambiente durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 90:10 de DCM/NH<sub>3</sub> 7N en MeOH) para producir el producto deseado.

1.16. Método general: acoplamiento de Buchwald con (6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il) -bis-(4-metoxi-bencil) -amina (Int.2).

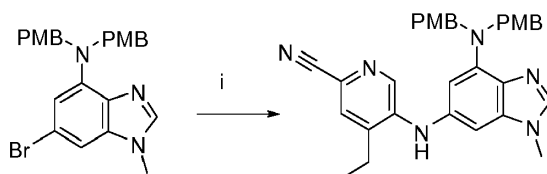


en la que R<sub>A</sub> puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

##### 1.16.1. Método E1

Una mezcla de Int.2 (1 eq), la anilina correspondiente (1,1 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq) y XPhos (0,3 eq) en tolueno seco se purgó con un gas inerte antes de añadir Pd(OAc)<sub>2</sub> (de 0,1 a 0,15 eq). La mezcla se agitó a 110°C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se dividió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, la mezcla de reacción se filtró y concentró. El residuo se pudo mantener como tal o purificar por cromatografía para producir el producto deseado.

1.16.2. Ejemplo ilustrativo del método E1: síntesis de 5-[7-[Bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-ilamino]-4-etil-piridina-2-carbonitrilo (Int.24).

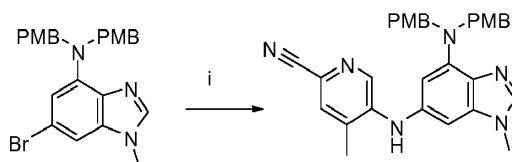


Una mezcla de Int.2 (0,75 mmol), Int.10 (0,79 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 mmol) y XPhos (0,225 mmol) en tolueno seco (6,3 mL) se purgó con argón antes de añadir Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,075 mmol). La mezcla se agitó a 110°C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó (salmuera), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 50:50 de ciclohexano/EtOAc) para producir el producto deseado.

### 1.16.3. Método E2

Una mezcla de Int.2 (1 eq), la anilina correspondiente (1,1 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (de 4 a 5 eq) y XPhos (0,4 eq) en tolueno seco se purgó con un gas inerte antes de añadir Pd(OAc)<sub>2</sub> (de 0,2 a 0,3 eq). La mezcla se agitó a 110°C durante un período que varió de 1 h a 24 h. La mezcla se pudo dividir entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, la mezcla de reacción se filtró y concentró. El residuo pudo mantenerse como tal o purificarse por cromatografía para producir el producto deseado.

1.16.4. Ejemplo ilustrativo del método E2: síntesis de 5-[7-[Bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzimidazol-5-ilamino]-4-metil-piridina-2-carbonitrilo (Int.27).

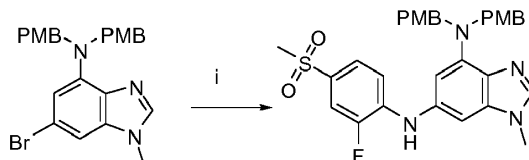


Una mezcla de Int.2 (4 mmol), Int.8 (4,3 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mmol) y XPhos (1,6 mmol) en tolueno seco (35 mL) se purgó con argón durante 10 min antes de añadir Pd(OAc)<sub>2</sub> (1,2 mmol). La mezcla se agitó a 110°C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 98:2 a 25:75 de ciclohexano/EtOAc) para producir el producto deseado.

### 1.16.5. Método E3

Una mezcla de Int.2 (1 eq), la anilina (1,1 eq), BINAP (0,3 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 eq) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,2 eq) en 1,4-dioxano seco se desgasificó con un gas inerte. La reacción se agitó durante un período que varió de 4 horas a aproximadamente 16 horas a 100-110°C. La mezcla se pudo dividir entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, la mezcla de reacción se filtró y concentró. El residuo pudo mantenerse como tal o purificarse por cromatografía para producir el producto deseado.

1.16.6. Ejemplo ilustrativo del método E3: síntesis de N6-(2-Fluoro-4-metanosulfonil-fenil)-N4,N4-bis-(4-metoxi-bencil)-1-metil-1H-benzimidazol-4,6-diamina (Int. 34).



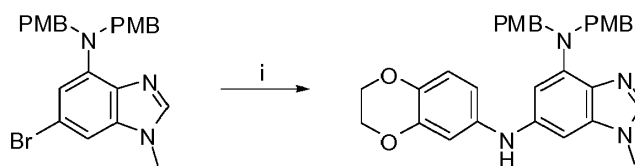
Una mezcla de Int.2 (1,48 mmol), 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina (1,58 mmol), BINAP (0,47 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,32 mmol) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,32 mmol) en 1,4-dioxano seco (15 ml) se desgasificó con nitrógeno. La reacción se agitó a 100°C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

### 1.16.7. Método E4

Una mezcla de Int.2 (1 eq), la anilina (1,1 eq), Brettphos (0,1 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 eq) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,05 eq) en 1,4-dioxano seco se desgasificó con un gas inerte. La reacción se agitó durante un período que varió de 2 h a aproximadamente 8 h a 85-95°C. La mezcla se pudo dividir entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, la mezcla de reacción pudo filtrarse y concentrarse. El residuo se pudo mantener como tal o purificar por cromatografía para producir el producto deseado.

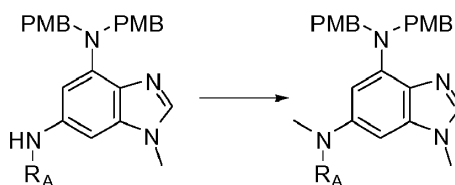


1.16.8. Ejemplo ilustrativo del método E4: síntesis de N6-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-N4,N4-bis[(4-metoxifenil)metil]-1-metil-bencimidazol-4,6-diamina (Int. 78).



5 Una mezcla de Int.2 (1,17 mmol), 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-amina (1,29 mmol), Brettphos (0,117 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,32 mmol) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,058 mmol) en 1,4-dioxano seco (15 ml) se desgasificó con nitrógeno. La reacción se agitó a 90°C durante aproximadamente 5 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

1.17. Método general: metilación del producto de Buchwald

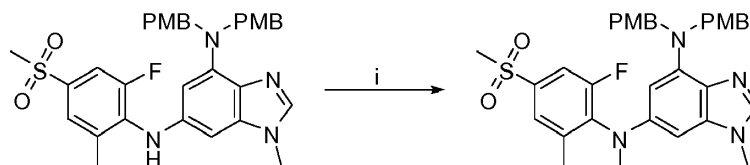


10 en la que R<sub>A</sub> puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

1.17.1. Método F

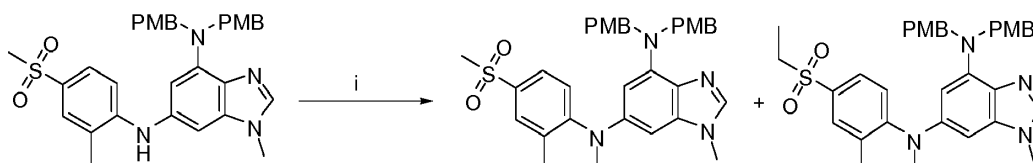
15 Se añadió NaH (60% en aceite mineral, de 1,1 a 3 eq) a una disolución del intermedio obtenido a partir del acoplamiento de Buchwald (1 eq) en THF o DMF a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min. Se agregó Mel (de 1,1 a 3 eq) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante un período que varió de 1 hora a aproximadamente 16 horas. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice o se usó como tal sin purificación adicional.

1.17.2. Ejemplo ilustrativo del método F: síntesis de N6-(2-Fluoro-4-metanosulfonyl-6-metilfenil)-N4,N4-bis-(4-metoxibencil)-1,N6-dimetil-1H-benzoimidazol-4,6-diamina (Int. 37).



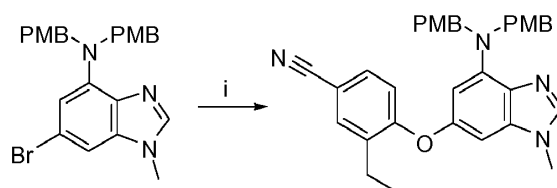
20 Se añadió NaH (60% en aceite mineral, 6,76 mmol) a una disolución de Int.35 (2,25 mmol) en THF (10 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos. Se añadió Mel (6,76 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 20:80 a 80:20 de EtOAc/éter de petróleo) para producir el producto deseado.

25 1.17.3. Ejemplo ilustrativo del método F: síntesis de N4,N4-bis[(4-metoxifenil)metil]-N6,1-dimetil-N6-(2-metil-4-metilsulfonyl-fenil)bencimidazol-4,6-diamina (Int.49A) y N6-(4-etilsulfonyl-2-metilfenil)-N4,N4-bis[(4-metoxifenil)metil]-N6,1-dimetilbencimidazol-4,6-diamina (Int.49B).



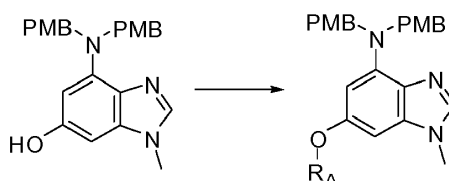
30 Se añadió NaH (60% en aceite mineral, 4,86 mmol) a una disolución de Int.36 (1,62 mmol) en THF (10 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos. Se añadió Mel (4,86 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 20:80 a 80:20 de EtOAc/éter de petróleo) dio como resultado una mezcla del producto deseado (Int.49A, producto más importante) junto con el producto secundario (Int.49B, producto menos importante).

35 1.18. Síntesis de 4-{7-[Bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-3-etilbenzonitrilo (Int.50).



Una mezcla de Int.2 (0,4 mmol), Int.22 (0,4 mmol), CuI (0,06 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mmol) en piridina (2 ml) se barrió con argón, se cerró herméticamente y se calentó en un reactor de microondas durante 3 h a 200°C. La mezcla se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó y se concentró para producir el producto deseado.

- 5 1.19. Método general: acoplamiento de Ullmann entre 5-{7-[bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int. 3) y haluros aromáticos o heteroaromáticos

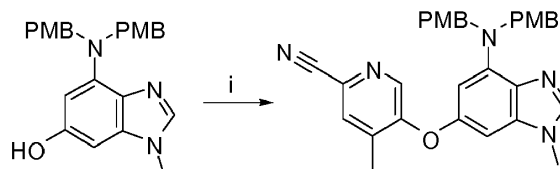


en la que R<sub>A</sub> puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

#### 1.19.1. Método G

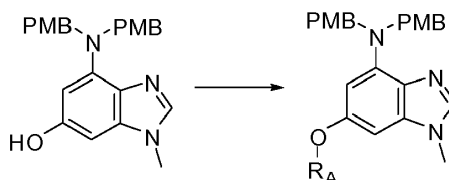
- 10 Una mezcla de Int.3 (1 eq), el haluro de arilo (de 1,2 a 1,3 eq), CuI (de 0,1 a 0,2 eq), N,N-dimetilglicina (de 0,3 a 0,5 eq) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq) en 1:1 de DMF/1,4-dioxano se barrió con un gas inerte y se agitó a 110°C durante un periodo que varió de 4,5 h a 16 h. La mezcla se filtró, se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice.

- 15 1.19.2. Ejemplo ilustrativo del método G: síntesis de 5-{7-[bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metil-piridina-2-carbonitrilo (Int.51).



20 Una mezcla de Int.3 (0,39 mmol), Int.18 (0,47 mmol), CuI (0,08 mmol), N,N-dimetilglicina (0,2 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,17 mmol) en 1:1 de DMF/1,4-dioxano (4 ml) se barrió con argón y se agitó a 110°C durante aproximadamente 16 h en un tubo herméticamente cerrado. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (SiO<sub>2</sub>, de 100:0 a 40:60 de ciclohexano/EtOAc) para producir el producto deseado.

1.20. Método general: acoplamiento de SNAr entre 5-{7-[bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int.3) y haluros aromáticos o heteroaromáticos

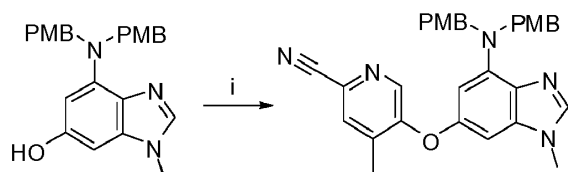


en la que R<sub>A</sub> puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

#### 1.20.1. Método H

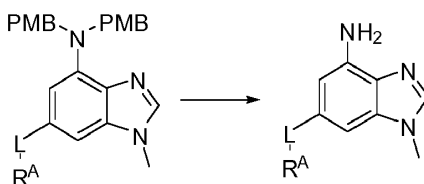
- 30 Una mezcla de Int.3 (1 eq), el haluro de arilo/heteroarilo (de 1,2 a 1,5 eq) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq) en DMF se agita a 100°C durante un periodo que varió de 3 h a aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó varias veces con H<sub>2</sub>O, se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida.

1.20.2. Ejemplo ilustrativo del método H: síntesis de 5-{7-[bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int.51).



Una mezcla de Int.3 (58 mmol), Int.7 (70 mmol) y  $K_2CO_3$  (116 mmol) en DMF (160 ml) se agitó a  $100^\circ C$ . Después de 3 h, se añadieron otros 7,35 mmol de Int.7 a la reacción y la mezcla se agitó durante 1 h adicional a  $100^\circ C$ . La mezcla resultante se diluyó con EtOAc, se lavó varias veces con  $H_2O$ , se secó ( $Na_2SO_4$ ) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna ( $SiO_2$ , de 15:85 a 35:75 de EtOAc/éter de petróleo) para producir el producto deseado.

#### 1.21. Método general: desprotección de bis-PMB

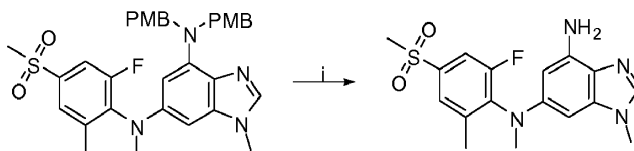


en la que  $R_A$  puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; y -L- puede ser: -NH-, -NMe- o -O-.

##### 1.21.1. Método I1

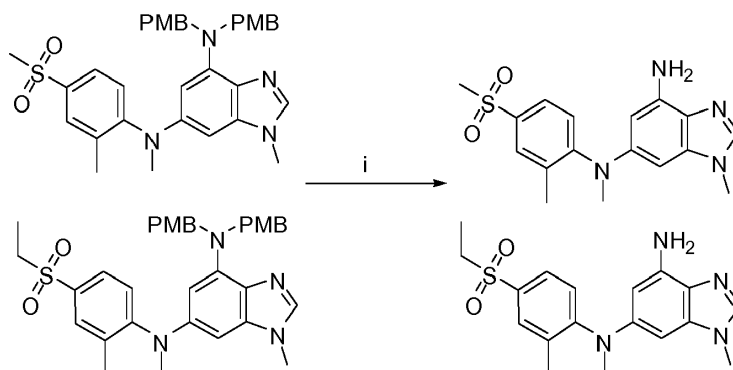
Una mezcla de bis-PMB amina protegida (1 eq) en TFA se agitó a temperatura ambiente durante un período que varió de 30 minutos a aproximadamente 16 horas. La temperatura se aumentó a 50 o  $60^\circ C$  y la mezcla se agitó adicionalmente durante un período que varió de 0,5 a 3 h. La mezcla se sometió a un tratamiento usando una disolución acuosa básica y un disolvente orgánico. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, la mezcla de reacción se concentró primero y luego el residuo se sometió al tratamiento descrito anteriormente. El residuo obtenido del tratamiento se purificó por cromatografía sobre sílice o por resina de intercambio iónico ISOLUTE® SCX-3 (Biotage) o se mantuvo como tal.

##### 1.21.2. Ejemplo ilustrativo del método I1: síntesis de N6-(2-fluoro-4-metanosulfonyl-6-metilfenil)-1,N6-dimetil-1H-benzimidazol-4,6-diamina (Int. 53).



Una mezcla de Int.37 (0,33 mmol) en TFA (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a  $50^\circ C$  durante 0,5 horas. Se concentró la mezcla. El residuo se dividió entre  $NaHCO_3$  sat. y DCM. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó ( $Na_2SO_4$ ) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida ( $SiO_2$ , de 20:80 a 100:0 de EtOAc/éter de petróleo) para producir el producto deseado.

##### 1.21.3. Ejemplo ilustrativo del método I1: síntesis de N6,1-dimetil-N6-(2-metil-4-metilsulfonylfenil) bencimidazol-4,6-diamina (Int.56A) y N6-(4-etilsulfonyl-2-metil-fenilo)-N6,1-dimetil-bencimidazol-4,6-diamina (Int.56B).



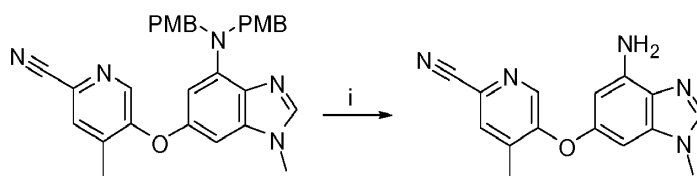
Una mezcla de Int.49A y 49B (aproximadamente 0,61 mmol en total) en TFA (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas y a  $50^\circ C$  durante 3 horas. Se concentró la mezcla. El residuo se dividió entre

NaHCO<sub>3</sub> sat. y DCM. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, de 20:80 a 100:0 de EtOAc/éter de petróleo) produjo una mezcla del producto deseado (Int.56A, producto más importante) junto con un producto secundario (Int.56B, producto menos importante) derivado de la desprotección de Int.49B.

#### 5 1.21.4. Método I2

Una mezcla de bis-PMB amina protegida (1 eq) en DCM/TFA (relación 3:1 a 1:1) se agitó a temperatura ambiente durante un período que varió de 20 minutos a 3 horas. La mezcla se sometió a tratamiento usando una disolución acuosa básica y un disolvente orgánico. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, la mezcla de reacción se pudo concentrar primero y luego el residuo se sometió al tratamiento descrito anteriormente. El residuo obtenido del tratamiento se purificó por cromatografía sobre sílice o por resina de intercambio iónico ISOLUTE® SCX-3 (Biotage) o se mantuvo como tal.

1.21.5. Ejemplo ilustrativo del método I2: síntesis de 5-(7-amino-3-metil-benzimidazol-5-il)oxi-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Cpd 28).

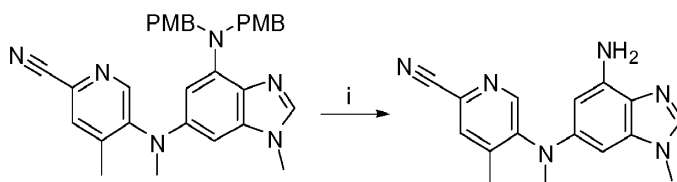


15 Se añadió TFA (55 ml) a una disolución de Int.51 (23,1 mmol) en DCM (55 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadió tolueno y se concentró la mezcla. El residuo se repartió entre DCM y NaHCO<sub>3</sub> sat., Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH de 100:0 a 95:5). El producto obtenido de la columna se lavó con THF para producir el producto deseado (Int 79).

#### 20 1.21.6. Método I3

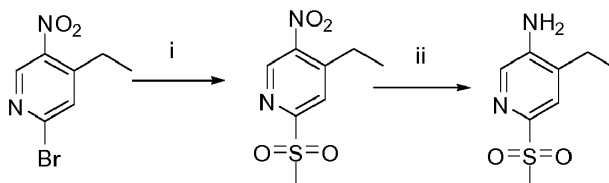
Una mezcla de bis-PMB amina protegida (1 eq) en TFA se agitó a temperatura ambiente durante un período que varió de 30 minutos a aproximadamente 16 horas. La mezcla se diluyó en un disolvente orgánico y se lavó con una disolución acuosa básica. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. Alternativamente, antes del lavado, la mezcla de reacción se podría concentrar en primer lugar. A continuación, la capa orgánica se concentró y el residuo o bien se purificó por cromatografía sobre sílice o por resina de intercambio iónico ISOLUTE® SCX-3 (Biotage) o bien se usó como tal sin más purificación.

1.21.7. Ejemplo ilustrativo del método I3: síntesis de 5-[(7-amino-3-metil-3H-benzimidazol-5-il)-metil-amino]-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int. 62)



30 Una disolución de Int.41 (2,4 mmol) en TFA (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. y luego con NaOH 5N. Las dos capas se separaron y la capa acuosa se extrajo posteriormente con DCM. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (filtración a través del separador de fases) y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH de 100:0 a 90:10) para producir el producto deseado.

#### 35 1.22. Síntesis de 4-etil-6-metanosulfonyl-piridin-3-ilamina (Int. 70).



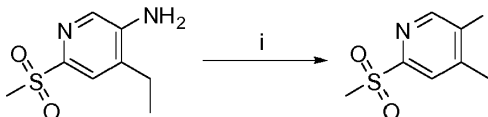
1.22.1. Etapa i: 4-etil-2-metilsulfonyl-5-nitro-piridina

Una mezcla de 2-bromo-4-etil-5-nitro-piridina (4,35 mmol) y metanosulfonato de sodio (4,35 mmol) en DMSO (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla se vertió en agua helada y se agitó hasta que se derritió el hielo. Se filtró la mezcla y se recogió el sólido (el producto deseado).

#### 1.22.2. Etapa ii: 4-etil-6-metilsulfonil-piridin-3-amina

- 5 Una mezcla de 4-etil-2-metilsulfonil-5-nitro-piridina (4,1 mmol), NH<sub>4</sub>Cl (26,65 mmol) y polvo de hierro (33 mmol) en H<sub>2</sub>O (10 mL) se agitó a 90°C durante 1 h. La reacción se detuvo, se filtró y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para producir el producto deseado.

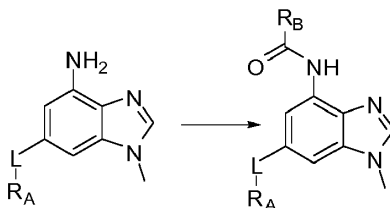
#### 1.23. Síntesis de 4-etil-5-yodo-2-metilsulfonil-piridina (Int. 74).



- 10 Se añadió gota a gota una disolución de KI (15 mmol) y NaNO<sub>2</sub> (12 mmol) en H<sub>2</sub>O (1,8 ml) a una mezcla de Int.70 (6 mmol) y p-TsOH · H<sub>2</sub>O (18 mmol) en MeCN (12 ml) manteniendo la temperatura entre 10 y 15°C. La mezcla se agitó durante 10 min a 10 a 15°C y luego a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta 0°C, se neutralizó (NaHCO<sub>3</sub> sat.) y se extrajo (DCM). La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 70:30 de éter de petróleo/ETOAc) para producir el producto deseado.

#### 15 **Ejemplo 2. Síntesis de los compuestos de la invención**

2.1. Método general: acilación del intermedio de amina con un derivado de cloruro de carbonilo para obtener un compuesto final



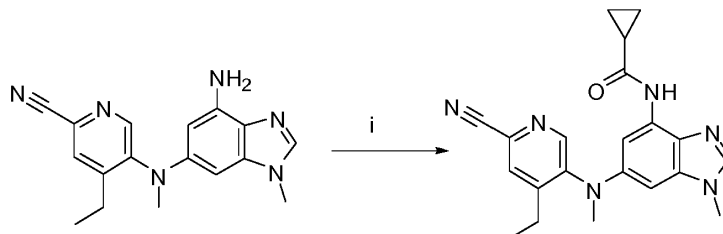
- 20 en la que R<sub>A</sub> puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; L puede ser NH, NMe u O; y R<sub>B</sub> puede ser cicloalquilo, OMe.

##### 2.1.1. Método J1

Se agregó R<sub>B</sub>COCl (1 eq) a una disolución de la amina intermedia (1 eq) en DCM/piridina (de una relación de 2:1 a 5:1) a 0°C. La mezcla se agitó durante un período que varió de 40 minutos a 2 horas. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una disolución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró.

- 25 Alternativamente, la mezcla de reacción podría concentrarse sin someterse a tratamiento. El residuo se podría purificar por cromatografía sobre sílice o por HPLC preparativa o por precipitación usando la mezcla de disolventes apropiada.

2.1.2. Ejemplo ilustrativo del método J1: síntesis de N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-henzo [d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida (Cpd 1).



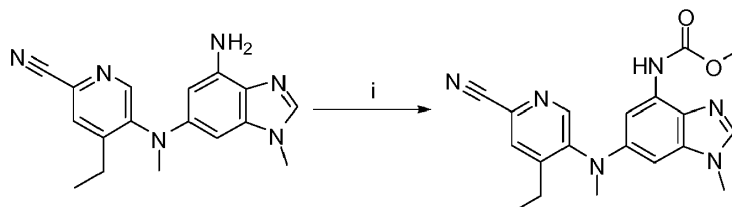
- 30 Se añadió cloruro de ciclopropanocarboxilo (0,39 mmol) a una disolución de Int.63 (0,39 mmol) en piridina/DCM 1:2 (2,55 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH de 100:0 a 97:3) para proporcionar el producto deseado.

##### 2.1.3. Método J2

- 35 Se agregó R<sub>B</sub>C(=O)Cl (1,5 a 3 eq) a una disolución de la amina intermedia (1 eq) en DCM seguido de piridina (1,5 a 3 eq). La mezcla se agitó durante un período que varió de 2 h a aproximadamente 16 h. La mezcla se repartió entre un

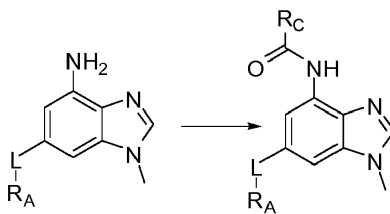
disolvente orgánico y una disolución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice, mediante HPLC preparativa o mediante precipitación usando la mezcla de disolventes apropiada.

5 2.1.4. *Ejemplo ilustrativo del método J2: síntesis de 6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo (Cpd 4).*



10 Se añadió cloroformiato de metilo (0,33 mmol) a una disolución de Int.63 (0,22 mmol) en DCM seco (2,2 ml) seguido de piridina (0,33 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se dividió entre H<sub>2</sub>O y DCM. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó (NaHCO<sub>3</sub> sat.), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH de 100:0 a 95:5) para producir el producto deseado.

2.2. *Método general: acilación del intermedio de amina con un derivado de ácido carboxílico para obtener un compuesto final*

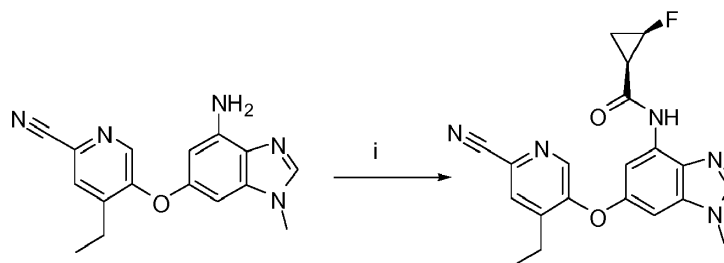


15 en la que R<sub>A</sub> puede ser arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; L puede ser: NH, NMe u O; y R<sub>C</sub> puede ser: cicloalquilo, cicloalquilo sustituido.

### 2.2.1. *Método K1*

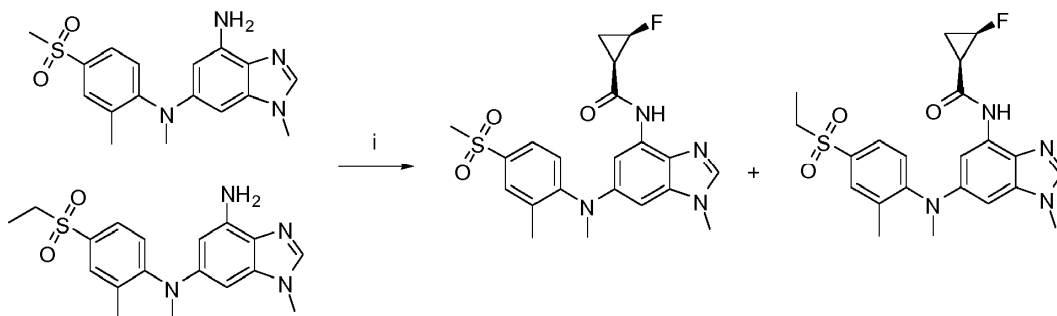
20 Se añadió (COCl)<sub>2</sub> (de 1,4 a 2 eq) a una disolución del ácido carboxílico (de 1,5 a 2 eq) en DCM a 0°C. Se añadió una cantidad catalítica de DMF y la reacción se agitó a 0°C durante un período que varió de 30 min a 1 h. Se añadió a la mezcla una disolución de la amina intermedia (1 eq) y piridina (de 2 a 4 eq) en DCM. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante un período que varió de 30 minutos a 2 horas. La mezcla se dividió entre un disolvente orgánico y una disolución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre sílice, mediante HPLC preparativa o mediante precipitación usando la mezcla de disolventes apropiada.

25 2.2.2. *Ejemplo ilustrativo del método K1: síntesis de (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-etil-3-piridil)oxi]-1-metil-benzimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida (Cpd 6).*



30 Se añadió (COCl)<sub>2</sub> (0,186 mmol) a una disolución de ácido ((1R,2R)-(-)-cis-2-fluorociclopropanocarboxílico (ChemCollect, lote n.º 1241399, 0,186 mmol) en DCM (1 ml) seguido de DMF (2 gotas). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 0°C durante 1 h. Se añadió a la mezcla una disolución de Int.65 (0,093 mmol) y piridina (0,186 mmol) en DCM (1 mL). La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> sat. y las dos fases se separaron. Se concentró la capa orgánica. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH de 100:0 a 95:5) para producir el producto deseado.

2.2.3. Ejemplo ilustrativo del método K1: síntesis de (1R,2R)-N-[6-(N,2-dimetil-4-metilsulfonilnitino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida (Cpd 26) y (1R,2R)-N-[6-(4-etilsulfonil-N,2-dimetil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida (Cpd 27).

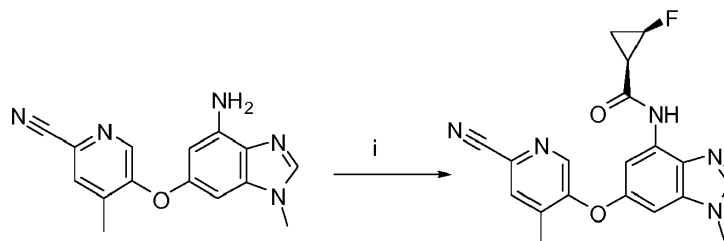


5 Se añadió  $(\text{COCl})_2$  (0,82 mmol) a una disolución de ácido ((1R,2R)-(-)-cis-2-fluorociclopropanocarboxílico (ABCR, lote n.º 1242863, 0,92 mmol) en DCM (1 ml) seguido de DMF (1 gota). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 0°C durante 45 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución de una mezcla de Int.56A e Int.56B (aproximadamente 0,46 mmol en total) y piridina (1,85 mmol) en DCM (1 ml) y la reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con DCM, se lavó ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y se separaron las dos fases. La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró. La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , 20:80 de EtOAc/éter de petróleo a 90:10 de EtOAc/MeOH) dio como resultado una mezcla del Compuesto 26 y el Compuesto 27. Los dos componentes se separaron mediante HPLC preparativa.

#### 2.2.4. Método K2

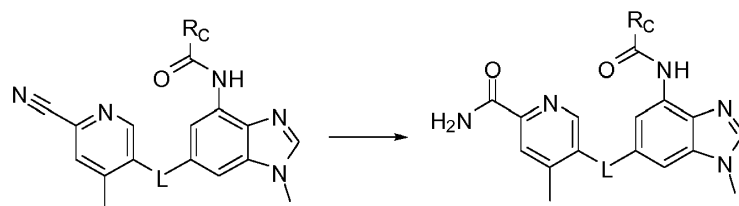
15 Se añadió  $(\text{COCl})_2$  (de 1,35 a 2,5 eq) a una disolución del ácido carboxílico (de 1,4 a 3 eq) en DCM a 0°C. Se añadió una cantidad catalítica de DMF y la reacción se agitó a 0°C durante un periodo que varió de 30 min a 1 h. Se preparó una disolución de la amina intermedia (1 eq) y piridina (de 1,7 a 4 eq) en NMP o NMP/DCM por separado, asegurándose de que la amina intermedia estuviera completamente disuelta. Para ayudar a la disolución, se podía aplicar calor (temperaturas de hasta 70°C). La última disolución se añadió gota a gota a la disolución que contenía el cloruro de acilo recién formado a 0°C. La mezcla resultante se dejó bajo agitación a temperatura ambiente durante un periodo que varió de 1 a 2 h. La mezcla se dividió entre un disolvente orgánico y una disolución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre sílice, mediante HPLC preparativa o mediante precipitación usando la mezcla de disolventes apropiada.

2.2.5. Ejemplo ilustrativo del método K2: síntesis de (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida (Cpd 20).



25 Se añadió  $(\text{COCl})_2$  (16,6 mmol) a una disolución de ácido ((1R,2R)-(-)-cis-2-fluorociclopropanocarboxílico (ABCR, lote n.º 1242863, 17,5 mmol) en DCM (70 mL) seguido de DMF (200  $\mu\text{L}$ ). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 0°C durante 45 minutos. Una disolución del Compuesto 28 (12,5 mmol) y piridina (21,3 mmol) en NMP (15 ml) se calentó a 65°C, para ayudar a la disolución, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La disolución que contenía el Compuesto 28 y piridina se añadió a la mezcla que contenía el derivado carboxílico activado a 0°C y la reacción se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se dividió entre EtOAc y  $\text{NaHCO}_3$  sat. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó posteriormente ( $\text{NaHCO}_3$  sat.,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ), se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró. El producto bruto se purificó por precipitación en DCM/iPrOH y el sólido resultante se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  y se secó a vacío para proporcionar el producto deseado.

35 2.3. Método general: hidrólisis de un grupo nitrilo para obtener un compuesto final

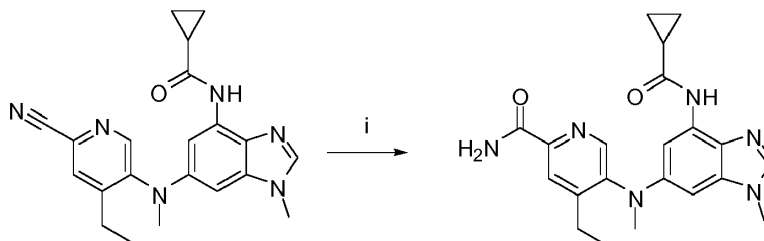


en la que L es NH, NMe u O; R<sub>c</sub> es cicloalquilo, cicloalquilo sustituido; Z es N o CH; y R<sup>10</sup> es Me o Et.

### 2.3.1. Método L

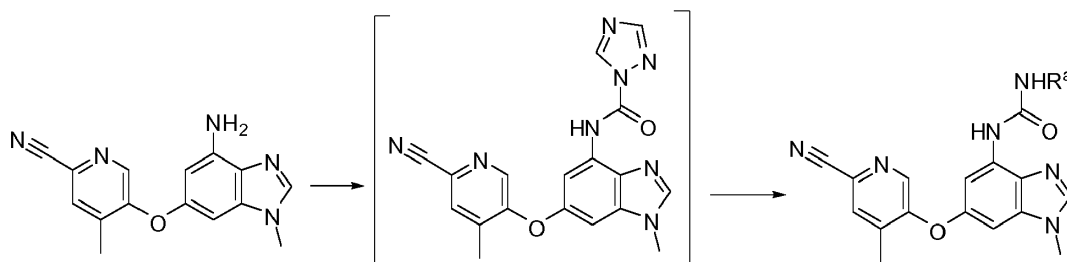
5 Se disolvió una disolución del material de partida de nitrilo (1 eq) en una mezcla 4:1 de EtOH/DMSO. La disolución orgánica resultante se mezcló con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O al 30% y NaOH 1N con las siguientes proporciones 10:2:1 de disolución orgánica /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH 1N. La mezcla se agitó a 50°C durante 1 h. La mezcla se dividió entre un disolvente orgánico y una disolución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre sílice, mediante HPLC preparativa o mediante precipitación usando la mezcla de disolventes apropiada.

10 2.3.2. Ejemplo ilustrativo del método L: síntesis de 5-((4-(ciclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo [d] imidazol-6-il)(metil amino)-4-etilpicolinamida (Cpd 24).



15 Se disolvió una disolución del compuesto 1 (0,19 mmol) en una mezcla 4:1 de EtOH/DMSO (2,3 ml). La disolución orgánica resultante se mezcló con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (0,4 ml) al 30% y NaOH 1N (0,23 ml). La mezcla se agitó a 50°C durante 1 h. La mezcla de reacción se dividió entre diclorometano y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se filtró a través de un separador de fases y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa para producir el producto deseado.

### 2.3.3. Método M: método general de síntesis de urea



20 Se añadió carbonilditriazol (1,5 eq.) a una mezcla de Cpd 28 (1,0 eq.) y piridina (5 eq.) en DCM. La mezcla se agitó a 50°C durante 1 h. Sin ningún tratamiento adicional, la amina R<sup>a</sup>NH<sub>2</sub> requerida se añadió a la disolución a 50°C y se dejó bajo agitación durante otra 1 h. Una vez completada la reacción por UPLC, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó con DCM, y luego la mezcla se dividió en agua. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó con una disolución de HCl 0,25 M, disolución de bicarbonato de sodio, se secó y se concentró.

25 El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice, por HPLC preparativa o por precipitación usando la mezcla de disolventes apropiada

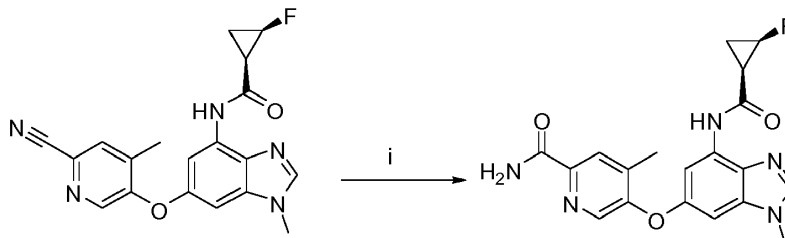
2.3.4. Ejemplo ilustrativo del Método M: síntesis de 1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea (Cpd 33)

30 Se añadió carbonilditriazol (1,07 mmol) a una mezcla de Cpd 28 (0,71 mmol) y piridina (3,55 mmol) en DCM (3 ml) y la mezcla resultante se agitó a 50°C. Se formó un precipitado después de 2 minutos y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 h. A continuación, se añadió metil-amina (disolución 2M en THF) (2,84 mmol) a la disolución a 50°C y se dejó bajo agitación durante 1 h más. Una vez completada la reacción por UPLC, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con DCM y se dividió en agua. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se



lavó con una disolución de HCl 0,25 M, disolución de bicarbonato de sodio, se secó y se concentró. El residuo se usó sin ninguna purificación adicional.

2.4. Síntesis de 5-[7-[[*(1R,2R)*-2-fluorociclopropanocarbonil]amino]-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metil-piridin-2-carboxamida (Cpd 32).



5 Una mezcla del Compuesto 20 (0,27 mmol) y DMSO (0,5 ml) en H<sub>2</sub>O (pH 13, 10 ml) se agitó a 50°C durante 72 h. Se filtró la mezcla. El sólido se recogió y se purificó por HPLC preparativa para producir el producto deseado.

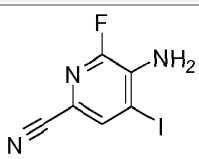
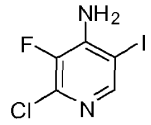
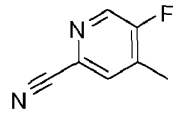
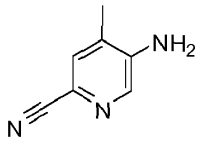
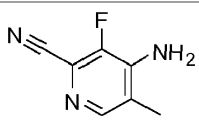
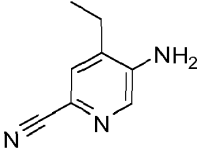
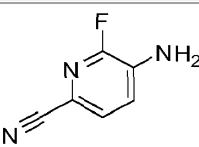
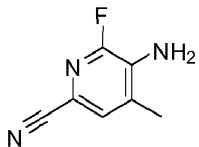
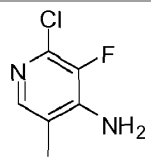
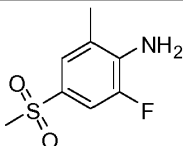
2.5. Síntesis de 4-metil-5-[3-metil-7-(metilamino)bencimidazol-5-il]oxi-piridin-2-carbonitrilo (Cpd 34) y 5-[7-(dimetilamino)-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metilpiridina-2-carbonitrilo (Cpd 35)

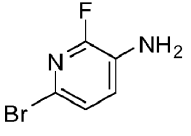
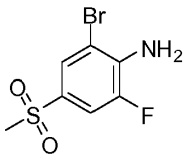
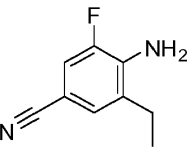
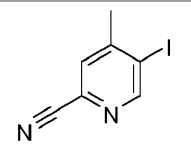
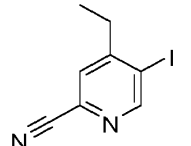
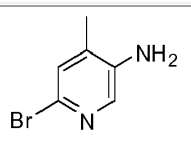
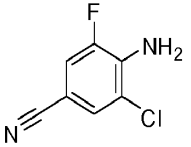
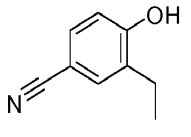
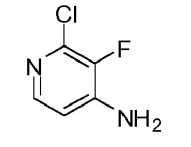
10 Se añadió NaH a una mezcla de Cpd 28 (0,36 mmol) en THF (10 ml) a 0°C. Después de 30 minutos, se añadió Mel (0,36 mmol) y la mezcla de reacción se dejó atemperar hasta la temperatura ambiente y se agitó hasta su finalización. Una vez controlada la reacción por UPLC, la reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El Cpd 34 y el Cpd 35 se aislaron mediante HPLC preparativa.

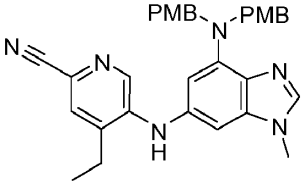
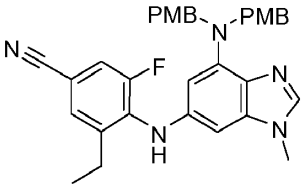
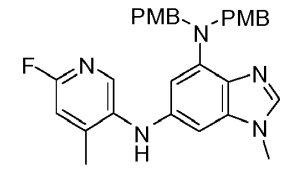
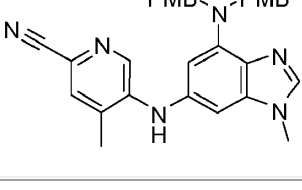
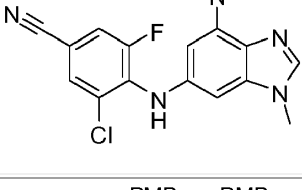
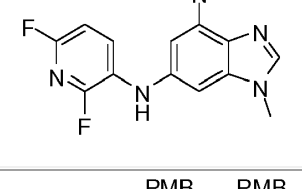
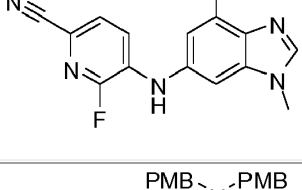
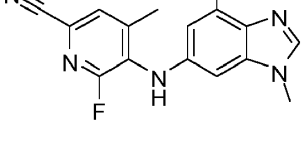
15 Los compuestos ilustrativos de la invención enumerados en la Tabla III a continuación y los ejemplos comparativos se han preparado de acuerdo con los métodos de síntesis descritos en la presente memoria usando los productos intermedios enumerados en la Tabla II. Los datos espectrales de NMR de los compuestos de la invención y algunos de los ejemplos comparativos se proporcionan en la Tabla IV.

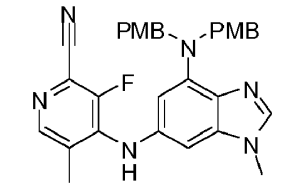
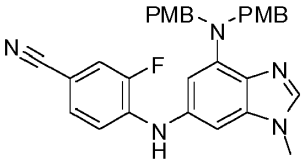
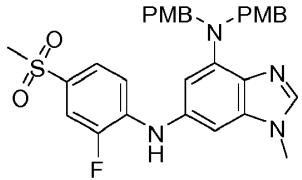
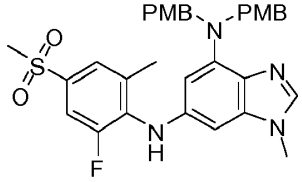
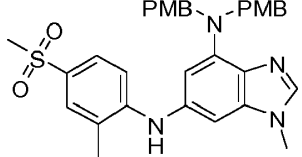
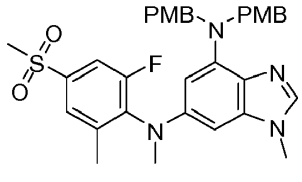
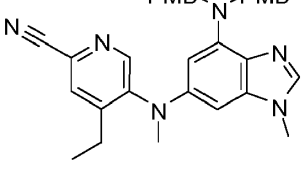
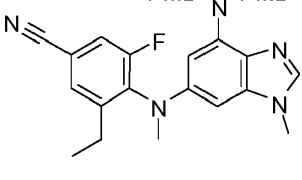
**Tabla II. Intermedios ilustrativos hacia los compuestos de la invención**

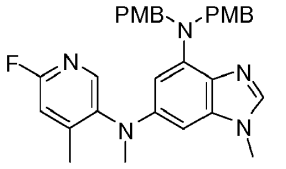
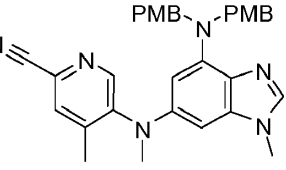
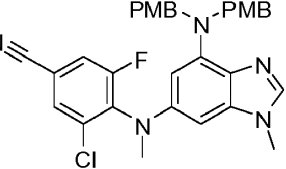
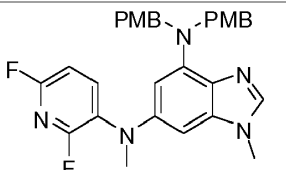
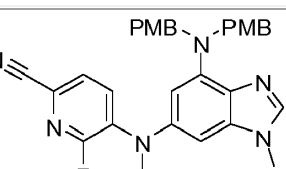
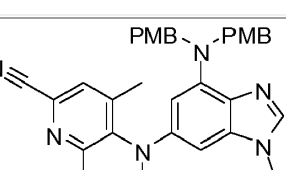
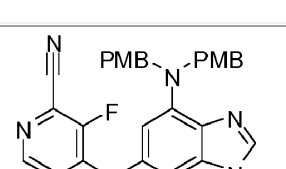
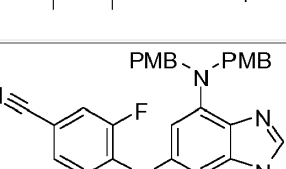
n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
1		4-Metoxi bencilamina	Dsc'd	257,3	258,1 (M+1)
2		Int.1 + 5-bromo-3-fluoro-N-metil-2-nitro-anilina	Dsc'd -	466,4	465,9 / 467,9 (M+1)
3		Int.2	Dsc'd -	403,5	404,4 (M+1)
4		4-amino-3-fluorobenzonitrilo	A1	262,0	261,5 (M-1)

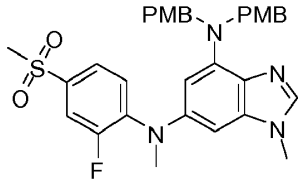
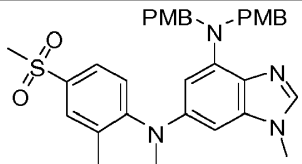
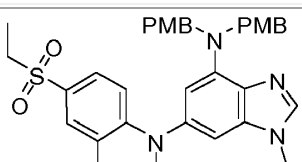
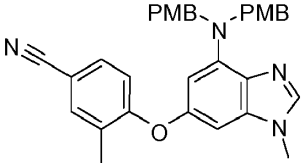
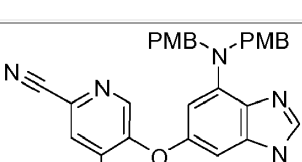
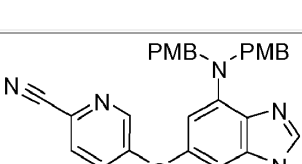
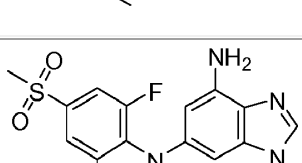
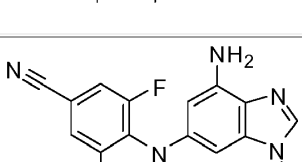
n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
5		Int. 11	A2	263,0	263,9 (M+1)
6		Int.23	A1	272,4	272,8 (M+1)
7		2-cloro-5-fluoro-4-metilpiridina	B	136,1	137,1 (M+1)
8		Int.20	B	133,2	134,1 (M+1)
9		Int. 13	B	151,1	152,0 (M+1)
10		6-bromo-4-etil-piridin-3-amina	B	147,2	148,0 (M+1)
11		Int. 15	B	137,1	138,0 (M+1)
12		Int.5	C	151,1	152,0 (M+1)
13		Int.6	C	160,6	161,0 (M+1)
14		Int. 16	C	203,2	204,0 (M+1)

n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
15		2-fluoropiridin-3-amina	Dsc'd	191,0	190,9/ 192,9 (M+1)
16		2-fluoro-4-metilsulfonyl-anilina	Dsc'd	268,1	267,0 / 268,9 (M+1)
17		Int.4	Dsc'd	164,2	165,5 (M+1)
18		Int. 8	D	244,0	245,0 (M+1)
19		Int. 10	D	258,1	259,1 (M+1)
20		2-bromo-4-metil-5-nitro-piridina	Dsc'd	187,0	187,0/ 189,0 (M+1)
21		4-amino-3-fluorobenzonitrilo	Dsc'd	170,6	No se pudo determinar la masa por diversos métodos
22		4-amino-3-etilbenzonitrilo	Dsc'd	147,2	146,1 (M-1)
23		Ácido 2-cloro-3-fluoropiridina-4-carboxílico	Dsc'd	146,6	147,0 (M+1)

n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
24		Int.2 + Int.10	E1	532,6	533,2 (M+1)
25		Int.2 + Int.17	E1	549,6	550,4 (M+1)
26		Int.2 + 6-fluoro-4-metilpiridin-3-amina	E1	511,6	512,5 (M+1)
27		Int.2 + Int. 8	E2	518,6	519,4 (M+1)
28		Int.2 + Int.21	E2	556,0	556,3 (M+1)
29		Int.2 + 2,6-difluoropiridin-3-amina	E2	515,6	516,4 (M+1)
30		Int.2 + Int.11	E2	522,6	523,3 (M+1)
31		Int.2 + Int.12	E2	536,6	537,0 (M+1)

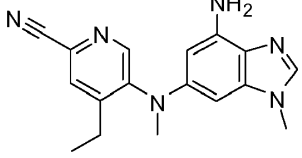
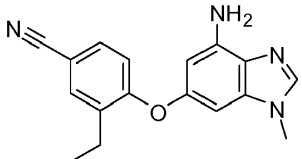
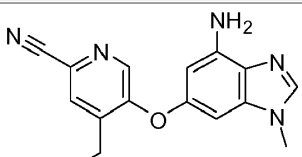
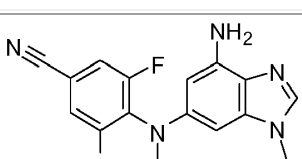
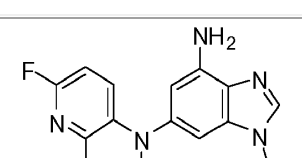
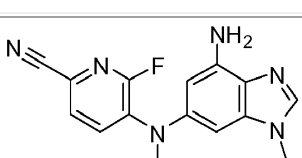
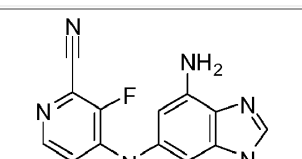
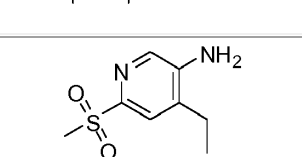
n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
32		Int.2 + Int.9	E2	536,6	537,0 (M+1)
33		Int.2 + 4-amino-3-fluorobenzonitrilo	E2	521,6	522,4 (M+1)
34		Int.2 + 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina	E3	574,7	575,0 (M+1)
35		Int.2 + Int.14	E3	588,7	589,2 (M+1)
36		Int.2 + 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina	E3	570,7	571,4 (M+1)
37		Int.35	F	602,7	603,3 (M+1)
38		Int.24	F	546,7	547,2 (M+1)
39		Int.25	F	563,7	564,3 (M+1)

n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
40		Int.26	F	525,6	526,4 (M+1)
41		Int.27	F	532,6	533,5 (M+1)
42		Int.28	F	570,1	570,4 (M+1)
43		Int.29	F	529,6	530,5 (M+1)
44		Int.30	F	536,6	536,5 (M+1)
45		Int.31	F	550,6	551,0 (M+1)
46		Int.32	F	550,6	551,0 (M+1)
47		Int.33	F	535,6	522,4 (M+1)

n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
48		Int.34	F	588,7	589,5 (M+1)
49A		Int.36	F	584,7	585,1 (M+1)
49B		Int.36	F (by product)	598,8	599,1 (M+1)
50		Int.2 + Int.22	Dsc'd	532,6	533,4 (M+1)
51		Int.3 + Int.18 (método G), Int.3 + Int.7 (método H)	GorH	519,6	520,4 (M+1)
52		Int.3 + Int.19	G	533,6	534,4 (M+1)
53		Int.37	I1	362,4	363,1 (M+1)
54		Int.25	I1	309,3	310,3 (M+1)

n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
55		Int.43	I1	289,3	290,0 (M+1)
56A		Int.49A	I1	344,4	344,9 (M+1)
56B		Int.49B	I1	358,5	359,0 (M+1)
57		Int.45	I1	310,3	311,0 (M+1)
58		Int.47	I1	295,3	296,0 (M+1)
59		Int.48	I1	348,4	349,0 (M+1)
61		Int.39	I2	323,4	324,3 (M+1)
62		Int.41	I3	292,3	293,3 (M+1)



n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
63		Int.38	I3	306,4	307,1 (M+1)
64		Int.50	I3	292,3	293,3 (M+1)
65		Int.52	I3	293,3	294,2 (M+1)
66		Int.42	I3	329,8	330,2 (M+1)
67		Int.40	I3	285,3	286,2 (M+1)
68		Int.44	I3	296,3	297,0 (M+1)
69		Int.32	I3	310,3	311,0 (M+1)
70		2-bromo-4-etil-5-nitro-piridina	Dsc'd	200,3	201,1 (M+1)

n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
71		Int.70 + Int.2	E2	585,7	586,0 (M+1)
72		Int.71	F	599,8	600,1 (M+1)
73		Int.72	I3	359,5	360,0 (M+1)
74		Int.70	Dsc'd	311,1	311,8 (M+1)
75		Int.3 + Int.74	G	586,7	587,3 (M+1)
76		Int.75	I2	346,4	347,0 (M+1)
77		Int.2 + 2- (4-aminofenil) acetonitrilo	E4	517,6	518,0 (M+1)
78		Int.2 + 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6- amina	E4	536,6	537,33 (M+1)

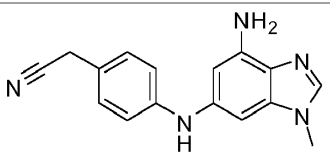
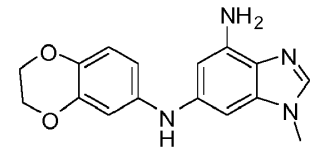
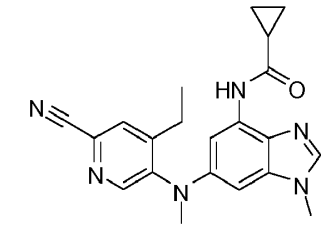
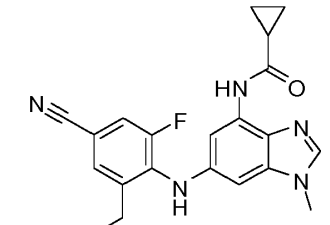
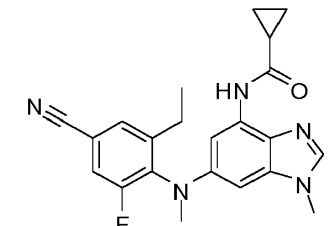
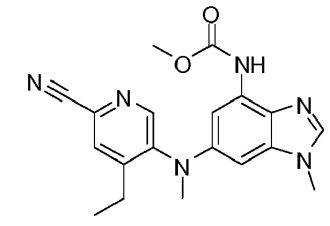
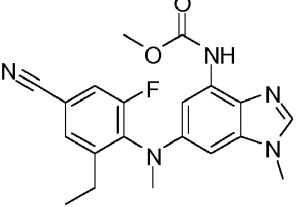
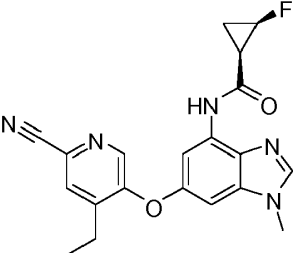
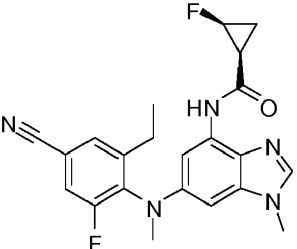
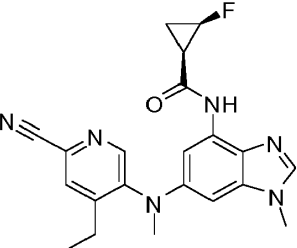
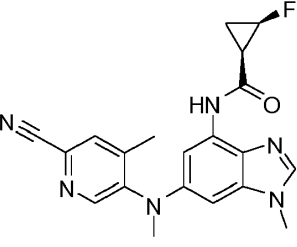
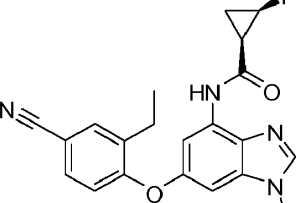
n.º Int	Estructura	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
79		Int.77	I2	277,3	278,0 (M+1)
80		Int. 78	I2	296,3	297,0 (M+1)

Tabla III. Compuestos ilustrativos de la invención

n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
1		N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida	Int 63	J1	374,4	375,3
2		N-(6-(4-ciano-2-etil-6-fluorofenilamino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida	Int 54	J1	377,4	378,0
3		N-(6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida	Int 61	J1	391,4	392,4
4		6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo	Int 63	J2	364,4	365,1

n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
5		6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo	Int 61	J2	381,4	382,1
6		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-etil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 65	K1	379,4	380,4
7		N-(6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo [d] imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida (1S,2S) / (1R,2R) mezcla racémica	Int 61	K1	409,4	410,2
8		(1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 63	K1	392,4	393,1
9		(1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil) amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 62	K1	378,4	378,9
10		(1R,2R)-N-[6-(4-ciano-2-etilfenoxi)-1-metilbenzimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 64	K1	378,4	379,4

n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
11		(1R,2R)-N-[6-(2-cloro-4-ciano-6-fluoro-N-metil-anilino)-1-metil-benzimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 66	K1	415,8	416,0
12		(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-[(6-fluoro-4-metil-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-benzimidazol-4-il]-ciclopropanocarboxamida	Int 67	K1	371,4	372,5
13		(1R,2R)-N-[6-[(2,6-difluoro-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-benzimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 55	K1	375,4	376,1
14		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-2-fluoro-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-benzimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 68	K1	382,4	383,0
15		(1R,2R)-N-[6-(4-ciano-2-fluoro-N-metil-anilino)-1-metil-benzimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 58	K1	381,4	382,1
16		(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonyl-anilino)-1-metil-benzimidazol-4-il]-ciclopropanocarboxamida	Int 53	K1	448,5	448,9

n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
17		(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N-metil-4-metilsulfonyl-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 59	K1	434,5	435,1
18		N-[6-[(4-etil-6-metilsulfonyl-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 73	K1	427,5	428,2
19		N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonyl-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 53	K1	430,5	431,0
20		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Cpd 28	K2	365,4	366,0
21		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-2-fluoro-4-metil-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 58 57	K2	396,4	397,1
22		(1R,2R)-N-[6-[(2-ciano-3-fluoro-5-metil-4-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 58 69	K2	396,4	397,1

n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
23		N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Cpd 28	K2	347,4	348,1
24		5-((4-(ciclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)-4-etilpicolinamida	Cpd 1	L	392,5	393,3
25		4-etil-5-((4-((1R,2R)-2-fluorociclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)picolinamina	Cpd 8	L	410,5	411,3
26		(1R,2R)-N-[6-(N,2-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 58 56A	-	430,5	431,0
27		(1R,2R)-N-[6-(4-etilsulfonil-N,2-dimetil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 58 56B	K1	444,5	445,0
28		5-(7-amino-3-metil-bencimidazol-5-il)oxi-4-metilpiridina-2-carbonitrilo	Int 58 51	12	279,3	280,1

n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
29		N-[6-[(4-etil-6-metilsulfonyl-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 58 76	K1	414,5	415,1
30		N-[6-[4-(cianometil)anilino]-bencimidazol-4-il] ciclopropanocarboxamida	Int 58 79	K1	345,4	346,0
31		N-[6-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilamino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 80	K1	364,4	365,0
32		5-[7-[(1R,2R)-2-fluorociclopropanocarbonil] amino]-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4- metilpiridina-2-carboxamida	Cpd 20	Dsc' d	383,4	384,1
33		1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea	Int 83	M	336,4	337,0
34		4-metil-5-[3-metil-7-(metilamino)benzimidazol-5-il] oxipiridina-2-carbonitrilo	Int 83	Dsc' d	293,3	294,0



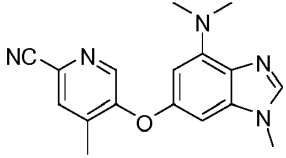
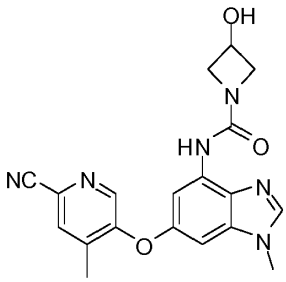
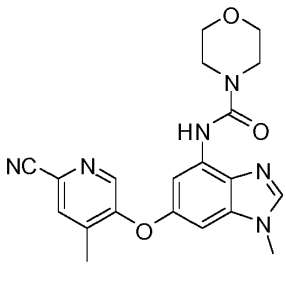
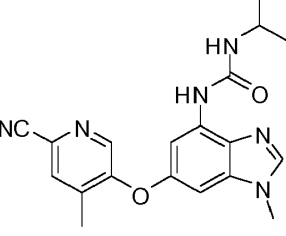
n.º Cpd	Estructura	Nombre	SM	Mtd	MW	MS Ms'd
35		5-[7-(dimetilamino)-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metilpiridina-2-carbonitrilo	Int 83	Dsc' d	307,4	308,0
36		N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-hidroxi-azetidina-1-carboxamida	Int 83	M	378,1	379,0
37		N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]morfolina-4-carboxamida	Int 83	M	392,2	393,1
38		1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea	Int 83	M	364,2	365,1

Tabla IV. Datos de RMN de compuestos ilustrativos de la invención

n.º Cpd	NMR
1	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 0,69 - 0,77 (m, 4H), 1,04 (t, 3H), 2,15 - 2,24 (m, 1H), 2,34 (q, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 6,72 (d, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 10,05 (s, 1H).
2	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 0,70-0,80 (m, 4H), 1,09 (t, 3H), 2,19-2,27 (m, 1H), 2,64 (q, 2H), 3,68 (s, 3H), 6,42 (t, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,64 (dd, 1H), 7,67 (br.s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 10,01 (s, 1H).
3	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 9,93 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,81 (dd, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,29 (br s, 1H), 6,47 (d, finely split, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,21 (s, 3H), 2,54-2,48 (m, partially obscured by solvent peak, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,09 (t, 3H), 0,71-0,69 (m, 4H).
4	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 1,05 (t, 3H), 2,36 (q, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 6,72 (d, 1H), 7,06 (d, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,00 (dd, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,91 (bs, 1H).

## ES 2 693 019 T3

n.º Cpd	NMR
5	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 1,10 (t, 3H), 2,52 (q, 2H), 3,23 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 6,51 (d, 1H), 6,86 (d, 1H), 7,76 (bs, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,75 (s, 1H).
6	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 1,14 (ddt, H), 1,24 (t, 3H), 1,53 - 1,67 (m, 1H), 2,51 - 2,55 (m, 1H), 2,75 (q, 2H), 3,79 (s, 3H), 4,77 - 5,03 (m, 1H), 7,13 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 10,43 (s, 1H).
7	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 0,99 - 1,15 (m, 1H), 1,09 (t, 3H), 1,54 (m, 1H), 2,39 (m, 1H), 2,52 (q, 2H), 3,22 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 4,85 (m, 1H), 6,49 (d, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,96 (s, 1H), 9,96 (s, 1H).
8	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 0,99 - 1,18 (m, 1H), 1,05 (t, 3H), 1,56 (m, 1H), 2,29 - 2,45 (m, 1H), 2,35 (q, 2H), 3,35 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 4,88 (m, 1H), 6,72 (d, 1H), 7,51 (bs, 1H), 7,95 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 10,09 (bs, 1H).
9	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 10,13 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,55 (br s, 1H), 6,79 (d, finely split, 1H), 5,0-4,7(m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 2,5-2,3 (m, 1H), 1,97 (s, 3H), 1,6-1,5 (m, 1H), 1,2-1,0 (m, 1H).
10	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 1,07 - 1,20 (m, 1H), 1,24 (t, 3H), 1,53 - 1,67 (m, 1H), 2,43 - 2,48 (m, 1H), 2,75 (q, 2H), 3,80 (s, 3H), 4,78 - 5,01 (m, 1H), 6,78 (d, 1H), 7,11 (d, 1H), 7,59 (dd, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 8,22 (s, 1H), 10,40 (s, 1H).
11	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 1,08 (ddt, 1H), 1,41 - 1,67 (m, 1H), 2,41 (dt, 1H), 3,27 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 4,65 - 5,05 (m, 1H), 6,61 (d, 1H), 7,42 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 8,04 (dd, 1H), 8,12 (t, 1H), 10,04 (s, 1H).
12	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ = 1,08 (ddt, 1H), 1,50-1,60 (m, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,39 (dt, 1H), 3,25 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 4,76-4,96 (m, 1H), 6,49 (d, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 10,02 (s, 1H).
13	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,12 (s, 1H), 8,06-8,00 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,22-7,19 (m, 1H), 6,76 (s, 1H), 4,98-4,77 (d, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,25 (s, 3H), 2,45-2,42 (m, 1H), 1,59-1,52 (m, 1H), 1,27-1,10 (m, 1H).
14	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,30 (1 H, s), 8,20 (1 H, s), 7,92 (1 H, dd), 7,85 (1 H, d), 7,63 (1 H, dd), 7,17 (1 H, d), 4,92 (1H, dF), 3,79 (3 H, s), 3,40 (3 H, s), 2,48-2,44 (1H, m), 1,64-1,53 (1H, m), 1,19-1,15 (1H, m).
15	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,22 (1H, s), 8,16 (1H, s), 7,80 (1H, s), 7,70-7,67 (1H, m), 7,59-7,58 (1H, d), 7,25-7,21 (1H, m), 7,07 (1H, s), 4,99-4,81 (1H, d), 3,79 (3H, s, CH <sub>3</sub> ), 3,38 (3H, s, CH <sub>3</sub> ), 2,46-2,42 (1H, m, CH), 1,61-1,55 (1H, m), 1,19-1,09 (1H, m)
16	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,30 (1 H, s), 7,95 (1 H, s), 7,78(1 H, d), 7,74 (1 H, dd), 7,36 (1 H, d), 6,49 (1 H, d), 4,87 (1H, dF), 3,78 (3 H, s), 3,28 (3 H, s), 3,21 (3 H, s), 2,43-2,38 (1H, m), 2,22 (3 H, s), 1,62-1,51 (1H, m), 1,15-1,08 (1H, m).
17	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,84 (1 H, s), 9,21 (1 H, s), 7,79 (2 H, dt), 7,55 (1 H, t), 7,42 (1 H, s), 7,26 (1 H, d), 4,95 (1H, dF), 3,96 (3 H, s), 3,43 (3 H, s), 3,28 (3 H, s), 2,43-2,38 (1 H, m), 1,62-1,51 (1 H, m), 1,15-1,08 (1 H, m).
18	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,08 (1 H, s), 8,53 (1 H, s), 8,05 (1 H, s), 7,93 (1 H, s), 7,48 (1 H, br s), 6,69 (1 H, d), 3,75 (3 H, s), 3,29 (3 H, s), 3,21 (3 H, s), 2,46 (2 H, q), 2,25 - 2,17 (1 H, m), 1,08 (3 H, t), 0,76-0,69 (4 H, m).
19	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): 9,55 (1 H, br s), 8,05-8,00 (2 H, m), 7,70 (1 H, d), 7,61 (1 H, dd), 6,01 (1 H, d), 3,78 (3 H, s), 3,33 (3 H, s), 3,13 (3 H, s), 2,25 (3 H, s), 1,97-1,92 (1 H, m), 0,91-0,85 (4 H, m).

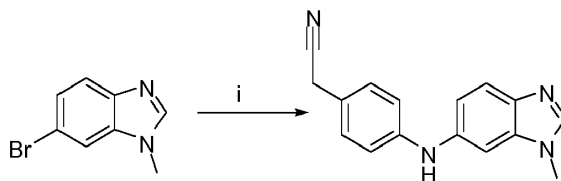
## ES 2 693 019 T3

n.º Cpd	NMR
20	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 1,15 (ddt, 1H), 1,54 - 1,66 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,52 - 2,54 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 4,77 - 5,03 (m, 1H), 7,12 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 8,08 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 10,44 (s, 1H).
21	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,12 (1H, s), 8,11 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,41 (1H, s), 6,61 (1H, d), 4,88 (1H, m), 3,75 (3H, s), 3,26 (3H, s), 2,42 (1H, m), 2,22 (3H, s), 1,57 (1H, m), 1,09 (1H, m).
22	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,18 (1H, s), 8,50 (1H, s), 8,06 (1H, s), 7,51 (1H, s), 6,73 (1H, d), 4,87 (1H, m), 3,75 (3H, s), 3,32 (3H, s), 2,45 (1H, m), 2,11 (3H, s), 1,60 (1H, m), 1,11 (1H, m).
23	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,39 (1 H, s), 8,23 (1 H, s), 8,11 (1 H, s), 8,07 (1 H, s), 7,84 (1 H, d), 7,11 (1 H, d), 3,79 (3 H, s), 2,35 (3 H, s), 2,33 - 2,27 (1 H, m), 0,81-0,76 (4 H, m).
24	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 0,56 - 0,78 (m, 4H), 1,09 (t, 3H), 2,18 (br. s., 1H), 2,46 (br. s., 2H), 3,30 (br. s., 3H), 3,73 (br. s., 3H), 6,56 (br. s., 1H), 7,38 (br. s., 1H), 7,59 (br. s., 1H), 7,98 (br. s., 2H), 8,05 (br. s., 1H), 8,33 (br. s., 1H), 9,96 (br. s., 1H).
25	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): d = 1,05 - 1,08 (m, 1H), 1,09 (t, 3H), 1,50 - 1,59 (m, 1H), 2,39 (dt, 1H), 2,45 - 2,49 (m, 2H), 3,31 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 4,70 - 4,97 (m, 1H), 6,57 (d, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,59 (d, 1H), 7,99 (s, 2H), 8,06 (d, 1H), 8,34 (s, 1H), 10,00 (s, 1H).
26	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,10 (1 H, s), 8,04 (1 H, s), 7,78(1 H, s), 7,76 (1 H, dd), 7,51 (1 H, d), 7,35 (1 H, d), 6,68 (1 H, d), 4,90 (1H, d), 3,75 (3 H, s), 3,29 (3 H, s), 3,21 (3 H, s), 2,40 (1H, t), 2,08 (3 H, s), 1,64-1,53 (1H, m), 1,15-1,08 (1H, m).
27	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,10 (1 H, s), 8,03 (1 H, s), 7,73-7,71 (2 H, m), 7,48 (1 H, d), 7,38 (1 H, d), 6,68 (1 H, dd), 4,90 (1H, dF), 3,74 (3 H, s), 3,29 (3 H, s), 3,23 (2 H, q), 2,40 (1H, t), 2,07 (3 H, s), 1,64-1,53 (1H, m), 1,15-1,08 (1H, m) 1,11 (3 H, t).
28	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,09 (1 H, s), 8,05 (1 H, s), 7,95 (1 H, s), 6,53 (1 H, d), 6,11 (1 H, d), 5,60 (2 H, br s) 3,68 (3 H, s), 2,34 (3 H, s).
29	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,42 (1 H, s), 8,23 (1 H, s), 8,13 (1 H, s), 8,03 (1 H, s), 7,86 (1 H, d), 7,13 (1 H, d), 3,80 (3 H, s), 3,24 (3 H, s), 2,83 (2 H, q), 2,33 - 2,27 (1 H, m), 1,26 (3 H, t), 0,81-0,76 (4 H, m).
30	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 8,81 (1 H, s), 8,02 (1 H, d), 7,71 (1 H, s), 7,17 (2 H, d), 7,04 (2 H, d), 6,83 (1 H, d), 6,05 (1 H, s), 3,73 (3 H, s), 3,65 (2 H, s), 1,73-1,66 (1 H, m), 1,10-1,06 (2 H, m), 0,87-0,82 (2 H, m).
31	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 8,77 (1 H, s), 7,89 (1 H, s), 7,66 (1 H, s), 6,78 (1 H, d), 6,68 (2 H, t), 6,63 (1 H, dd), 5,73 (1 H, br s), 4,25-4,21 (4 H, m), 3,69 (3 H, s), 1,73-1,66 (1 H, m), 1,11-1,06 (2 H, m), 0,87-0,82 (2 H, m).
32	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,41 (1 H, br s), 8,20 (1 H, s), 8,07 (1 H, s), 8,03 (1 H, s), 7,98 (1 H, br s), 7,84 (1 H, d), 7,55 (1 H, br s), 7,01 (1 H, d), 5,02-4,80 (1 H, m), 3,78 (3 H, s), 2,34 (3 H, s), 1,66-1,55 (1 H, m), 1,21-1,02 (2 H, m).
33	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,89 (1 H, br s), 8,23 (1 H, br s), 8,10 (2 H, m), 7,72 (1 H, br m), 6,4-6,8 (2 H, m), 3,78 (3 H, s), 2,65 (3 H, d), 2,36 (3 H, s).
34	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,07 (1 H, s), 8,05 (1 H, s), 7,97 (1 H, s), 6,47 (1 H, d), 6,10 (1 H, m), 6,01 (1 H, d), 3,69 (3 h, s), 2,77 (3 H, d), 2,36 (3 H, s)
35	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,07 (1 H, s), 8,05 (1 H, s), 8,01 (1 H, s), 6,63 (1 H, d), 6,16 (1 H, d), 3,70 (3 H, s), 3,19 (6H, s), 2,36 (3H, s)
36	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,16 (1 H, s), 8,10 (1 H, s), 0,07 (1 H, s), 8,00 (1 H, s), 7,62 (1 H, d), 6,99 (1 H, d), 5,68 (1 H, m), 4,45 (1 H, m), 4,21 (2 H, m), 3,78 (4 H, m), 2,57 (3 H, s)

n.º Cpd	NMR
37	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,42 (1 H, br s), 8,16 (1 H, s), 8,10 (1 H, s), 8,07 (1 H, s), 7,56 (1 H, d), 7,02 (1 H, d), 3,78 (3 H, s), 3,61 (4 H, m), 3,44 (4 H, m), 2,36 (3 H, s)
38	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,68 (1 h, br, s), 8,13 (1 H, s), 8,08 (1 H, s), 8,06 (1 H, s), 7,73 (1 H, d), 6,99 (1 h, br d), 6,89 (1 H, d), 3,75 (3 H, s), 3,72 (1 H, m), 2,35 (3 H, s), 1,07 (6 H, d)

### Ejemplo 3. Compuestos comparativos

#### 3.1. Compuesto A 2-[4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]fenil]acetonitrilo

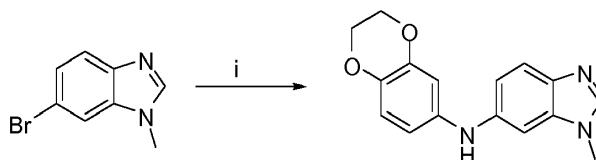


5 Se sonicó una mezcla de Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,01 mmol) y Xantphos (0,01 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) y se añadió bajo nitrógeno a una mezcla de 6-bromo-1-metil-bencimidazol (0,45 mmol), 2-(4-aminofenil)acetonitrilo (0,58 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,62 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml). La mezcla se agitó a 110°C durante 12 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (separador de fases) y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa para producir el producto deseado (Compuesto A).

10 MW: 262,3, MS Ms'd: 263,2,

NMR: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,13 (1 H, s), 7,68 (1 H, dd), 7,60 (1 H, dd), 7,54 (1 H, d), 7,32 (1 H, d), 7,24 (1 H, t), 6,91 (1 H, dd), 3,77 (3 H, s), 3,39 (3 H, s).

#### 3.2. Compuesto B

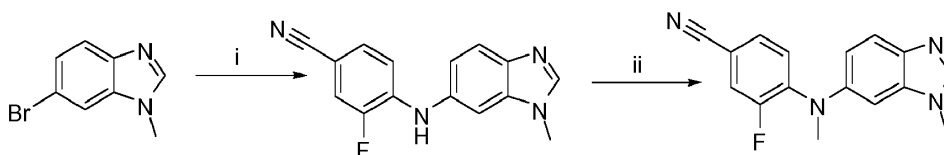


15 Se sonicó una mezcla de Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,01 mmol) y Xantphos (0,01 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) y se añadió bajo nitrógeno a una mezcla de 6-bromo-1-metil-bencimidazol (0,45 mmol), 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-amina (0,58 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,62 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml). La mezcla se agitó a 110°C durante 12 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (separador de fases) y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa para producir el producto deseado (Compuesto B).

20 MW: 281,3, MS Ms'd: 282,1,

NMR: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7,94 (1 H, s), 7,80 (1 H, br s), 7,45 (1 H, d), 7,05 (1 H, d), 6,86 (1 H, dd), 6,73 (1 H, dd), 6,61-6,57 (2 H, m), 4,22-4,16 (4 H, m), 3,71 (3 H, s).

#### 3.3. Compuesto C 3-fluoro-4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo



##### 3.3.1. Etapa i: 3-fluoro-4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo

Una mezcla que contenía 6-bromo-1-metil-bencimidazol (2,38 mmol), 4-amino-3-fluoro-benzonitrilo (3,57 mmol), XPhos (0,95 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,14 mmol) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,71 mmol) en tolueno seco (8 ml) se agitó a 110°C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó (EtOAc), se lavó (H<sub>2</sub>O), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el producto deseado 3-fluoro-4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo.

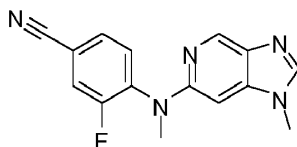
### 3.3.2. Etapa ii: 3-fluoro-4-[metil-(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo (Compuesto C)

Se añadió NaH (7,14 mmol) a una disolución de 3-fluoro-4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo (2,38 mmol) en THF (10 ml) a 0°C. La mezcla se agitó durante 30 min. Se añadió Mel (4,76 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó (H<sub>2</sub>O) y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa para producir el producto deseado (Compuesto C).

MW: 280,1, MS Ms'd: 281,0,

NMR: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,13 (1 H, s), 7,68 (1 H, dd), 7,60 (1 H, dd), 7,54 (1 H, d), 7,32 (1 H, d), 7,24 (1 H, t), 6,91 (1 H, dd), 3,77 (3 H, s), 3,39 (3 H, s).

### 3.4. Compuesto D



La síntesis de este compuesto se describió en la solicitud de patente internacional PCT (2013) WO 2013117645 (Menet et al., 2013).

### Ejemplos biológicos

#### Ejemplo 4. Ensayos in vitro

##### 4.1. Ensayo de inhibición de JAK1

##### 4.1.1. Ensayo JAK1 con sustrato polyGT

Se adquirió un dominio catalítico de JAK1 recombinante humana (aminoácidos 850-1.154, número de catálogo 08-144) de Carna Biosciences. Se incubaron 10 ng de JAK1 con 12,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo de Sigma P0275) en tampón de reacción de quinasa (15 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,01% de Tween-20, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 µM de ATP no radiactivo, 0,25 µCi <sup>33</sup>P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 µl que contenían compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final del 1%), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, con fondo en V). Después de 45 min a 30°C, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. La totalidad de la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas prelavadas de filtro de 96 pocillos (ácido fosfórico 75 mM) (número de catálogo de Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una disolución de ácido fosfórico 75 mM y se cerró herméticamente la parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se cerró herméticamente la parte superior de las placas y se realizó una lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) de las cpm obtenidas en presencia de un vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{RFU Compuesto de ensayo} - \text{RFU control})}{(\text{RFU vehículo} - \text{RFU control})} * 100$$

RFU compuesto de ensayo = RFU determinado para muestra con compuesto de ensayo presente

RFU control = RFU determinado para muestra con inhibidor de control positivo

RFU vehículo = RFU determinado en presencia de vehículo

Se prepararon diluciones en serie de dosificación para los compuestos que permitían el ensayo de efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK1 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se sometió a ensayo de manera rutinaria a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM - 6,67 µM - 2,22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de DMSO al 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujeron las concentraciones superiores (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

##### 4.1.2. Ensayo JAK1 con péptido Ulight-JAK1

Se adquirió JAK1 humano recombinante (dominio catalítico, aminoácidos 866-1154; número de catálogo PV4774) de Invitrogen. 1 ng de JAK1 se incubó con péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) 20 nM (número de catálogo TRF0121 de Perkin Elmer) en tampón de reacción de quinasa (MOPS 25 mM, pH 6,8, Brij-35 al 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, ATP 7 µM) con o sin 4 µl que contenían compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final del 1%), en un volumen

5 total de 20  $\mu$ L, en una placa 384 Opti blanca (Perkin Elmer, número de catálogo 6007290). Después de 60 min a temperatura ambiente, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 20  $\mu$ L/pocillo de mezcla de detección (1 x tampón de detección (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), europio-antifosfotirosina 0,5nM (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), EDTA 10 mM). La lectura se realizó utilizando el sistema Envision con excitación a 320 nm y midiendo la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó sustrayendo las unidades de fluorescencia relativa (RFU) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10  $\mu$ M) a partir de RFU obtenidas en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

10 Porcentaje de inhibición = ((RFU determinada para muestra con compuesto de ensayo presente - RFU determinada para muestra con inhibidor de control positivo) dividida entre (RFU determinada en presencia de vehículo - RFU determinada para muestra con inhibidor de control positivo)) \* 100.

15 Se prepararon diluciones en serie de dosificación para los compuestos que permitían el ensayo de los efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK1 y el cálculo del valor  $IC_{50}$  para el compuesto. Cada compuesto se sometió a ensayo de manera rutinaria a una concentración de 20  $\mu$ M seguido de una dilución 1/5 en serie, 10 puntos en una concentración final de DMSO al 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujeron las concentraciones superiores (por ejemplo, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M). Los datos se expresan como la  $IC_{50}$  promedio de los ensayos  $\pm$  error estándar de la media.

**Tabla V. JAK1  $IC_{50}$  valores de compuestos ilustrativos de la invención**

n.º de Cpd	JAK1 $IC_{50}$
1	****
2	****
3	****
4	****
5	****
6	****
7	****
8	****
9	****
10	****
11	****
12	****
13	***
14	****
15	****
16	****
17	**

ES 2 693 019 T3

n.º de Cpd	JAK1 IC <sub>50</sub>
18	****
19	****
20	****
21	****
22	****
23	****
24	****
25	****
26	****
27	****
28	***
29	****
32	***
33	****
34	**
35	*
36	*
37	*
38	****
<p>* &gt; 500 nM            ** &gt;100-500 nM            *** &gt;50-100 nM            **** 0,1-50 nM</p>	

Tabla VI. JAK1 IC<sub>50</sub> Valores de compuestos comparativos

n.º de Cpd	JAK1 IC <sub>50</sub>
A	*
B	*
C	*
D	*

#### 4.1.3. Ensayo de determinación de Ki de JAK1

5 Para la determinación del Ki, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima y se siguió la reacción  
enzimática en función de la concentración de ATP. El valor Ki se determinó por medio del trazado recíproco doble de  
Km frente a la concentración de compuesto (trazado Lineweaver-Burk). Se usó 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774) en  
el ensayo. El sustrato fue péptido 50 nM de péptido Ulight-JAK-1 (Tyr1023) (Perkin Elmer, TRF0121). La reacción se  
llevó a cabo en 25 mM MOPS pH 6,8, 0,01%, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> Brij-35 con diversas concentraciones de ATP y  
10 compuesto. El sustrato fosforilado se midió usando un anticuerpo antifosfotirosina marcado con Eu PT66 (Perkin  
Elmer, AD0068) como se describió en 1.1.2. Se llevo a cabo la lectura en el instrumento Envision (Perkin Elmer), con  
una excitación a 320 nm de emisión seguida a 615 nm y 665 nm.

#### 4.2. Ensayo de inhibición de JAK2

##### 4.2.1. Ensayo JAK2 con sustrato polyGT

15 Se adquirió un dominio catalítico de JAK2 recombinante humana (aminoácidos 808-1.132, número de catálogo  
PV4210) de Invitrogen. Se incubaron 0,025mU de JAK2 con 2,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma  
P0275) en tampón de reacción de quinasa (5 mM MOPS pH 7,5, 9 mM MgAc, 0,3 mM EDTA, 0,06% Brij y 0,6 mM  
DTT, 1 µM ATP no radioactivo, 0,25 µCi <sup>33</sup>P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968)  
20 concentraciones finales) con o sin 5 µl que contenían compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final  
del 1%), en un volumen total de 25 µl, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Greiner, con fondo en V). Después  
de 90 min a 30°C, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. La  
totalidad de la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas prelavadas de filtro de 96 pocillos (ácido fosfórico  
75 mM) (número de catálogo de Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas  
se lavaron 6 veces con 300 µl por pocillo de una disolución de ácido fosfórico 75 mM y se cerró herméticamente la  
parte inferior de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se cerró herméticamente la parte superior de  
25 las placas y se realizó una lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó restando las  
cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) de las  
cpm obtenidas en presencia de un vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se  
determinó como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{RFU Compuesto de ensayo} - \text{RFU control})}{(\text{RFU vehículo} - \text{RFU control})} * 100$$

30 RFU compuesto de ensayo = RFU determinado para muestra con compuesto de ensayo presente

RFU control = RFU determinado para muestra con inhibidor de control positivo

RFU vehículo = RFU determinado en presencia de vehículo

35 Se prepararon diluciones en serie de dosificación para los compuestos que permitían el ensayo de efectos dosis-  
respuesta en el ensayo JAK2 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se sometió a ensayo  
de manera rutinaria a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM - 6,67 µM -  
2,22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de DMSO al 1%. Cuando la potencia  
de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujeron las concentraciones superiores (por  
ejemplo, 5 µM, 1 µM).

##### 4.2.2. Ensayo JAK2 con péptido Ulight-JAK1

40 Se adquirió JAK2 humano recombinante (dominio catalítico, aminoácidos 866-1154; número de catálogo PV4210) de  
Invitrogen. Se incubaron 0,0125 mU de JAK2 con péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) 25 nM (número de catálogo TRF0121  
de Perkin Elmer) en tampón de reacción de quinasa (HEPES 25 mM pH 7,0, Triton X-100 al 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM,



DTT 2 mM, ATP 7,5 μM) con o sin 4μL que contenía el compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final del 1%), en un volumen total de 20 μL, en una placa Opti 384 blanca (Perkin Elmer, número de catálogo 6007290). Después de 60 min a temperatura ambiente, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 20 μL/pocillo de mezcla de detección (1 x tampón de detección (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), europio-antifosfotirosina 0,5nM (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), EDTA 10 mM). La lectura se realizó utilizando el sistema Envision con excitación a 320 nm y midiendo la emisión a 615 nm (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó sustrayendo las unidades de fluorescencia relativa (RFU) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 μM) a partir de RFU obtenidas en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

- 5
- 10  $\text{Porcentaje de inhibición} = ((\text{RFU determinada para muestra con compuesto de ensayo presente} - \text{RFU determinada para muestra con inhibidor de control positivo}) / (\text{RFU determinada en presencia de vehículo} - \text{RFU determinada para muestra con inhibidor de control positivo})) * 100.$

15 Se prepararon diluciones en serie de dosificación para los compuestos que permitían el ensayo de los efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK2 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para el compuesto. Cada compuesto se sometió a ensayo de manera rutinaria a una concentración de 20 μM seguido de una dilución 1/5 en serie, 10 puntos en una concentración final de DMSO al 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujeron las concentraciones superiores (por ejemplo, 5 μM, 1 μM). Los datos se expresan como la IC<sub>50</sub> promedio de los ensayos ± error estándar de la media.

20 Los siguientes compuestos se sometieron a ensayo para determinar su actividad contra JAK2 y los valores de IC<sub>50</sub>, como se determinaron usando los ensayos descritos en la presente memoria, se proporcionan a continuación en la Tabla VII.

**Tabla VII. JAK2 IC<sub>50</sub> Valores de compuestos comparativos**

n.º de Cpd	JAK2 IC <sub>50</sub>
1	****
2	****
3	****
4	****
5	****
6	****
7	****
8	****
9	****
10	****
11	****
12	***
13	**
14	***
15	**

## ES 2 693 019 T3

n.º de Cpd	JAK2 IC <sub>50</sub>
16	****
17	*
18	****
19	****
20	***
21	****
22	****
23	***
24	****
25	****
26	***
27	**
28	*
29	**
32	***
33	****
34	*
35	*
36	*
38	*
38	**

**Table VIII. JAK2 IC<sub>50</sub> Valores de compuestos comparativos**

n.º de Cpd	JAK2 IC <sub>50</sub>
A	*
B	*
C	*
D	*

#### 4.2.3. Ensayo de determinación de K<sub>d</sub> de JAK2

- 5 Se usó JAK2 (Invitrogen, PV4210) a una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se realizó en Hepes 50 mM, pH 7,5, Brij-35 al 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 1 mM utilizando trazador de quinasa 25nM 236 (Invitrogen, PV5592) y Eu-anti-GST 2 nM (Invitrogen, PV5594) con concentraciones de compuesto variables. La detección del trazador se realizó de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

#### 4.3. Ensayo de inhibición de JAK3

##### 10 4.3.1. Ensayo JAK3 con péptido Ulight-JAK1

- El dominio catalítico JAK3 humano recombinante (aminoácidos 781-1124; número de catálogo PV3855) se adquirió de Invitrogen. Se incubaron 0,5 ng de proteína JAK3 con 2,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma P0275) en tampón de reacción de quinasa (Tris 25 mM, pH 7,5, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 2,5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,5 mM, b-glicerolfosfato 5 mM, 0,01% Triton X-100, ATP no radiactivo 1 µM, concentración final de 0,25 µCi <sup>33</sup>P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) con o sin 5µL que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final del 1%), en un volumen total de 25 µL, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, fondo en V). Después de 45 minutos a 30°C, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 25 µL/pocillo de ácido fosfórico de 150 mM. Toda la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) (número de catálogo Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µL por pocillo de una disolución de ácido fosfórico 75 mM y se cerró herméticamente el fondo de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se se cerró herméticamente la parte superior de las placas y se realizó la lectura usando Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) a partir de las cpm obtenidas en presencia de un vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{RFU Compuesto de ensayo} - \text{RFU control})}{(\text{RFU vehículo} - \text{RFU control})} * 100$$

RFU compuesto de ensayo = RFU determinado para muestra con compuesto de ensayo presente

RFU control = RFU determinado para muestra con inhibidor de control positivo

- 30 RFU vehículo = RFU determinado en presencia de vehículo

- Se prepararon diluciones en serie de dosificación para los compuestos que permitían el ensayo de efectos dosis-respuesta en el ensayo JAK3 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se sometió a ensayo de manera rutinaria a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/5 en serie, 10 puntos en una concentración final de DMSO al 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujeron las concentraciones superiores (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Los siguientes compuestos han sido sometidos a ensayo para determinar su actividad frente a JAK3 y los valores de IC<sub>50</sub>, como se determina usando los ensayos descritos en la presente memoria, se proporcionan a continuación en la Tabla IX.

Tabla IX. JAK3 IC<sub>50</sub> Valores de los compuestos ilustrativos de la invención

n.º de Cpd	JAK3 IC <sub>50</sub>
1	***
2	****
3	****
4	**
5	***
6	*
7	****
8	**
9	**
10	**
11	**
12	**
13	*
14	**
15	*
16	***
17	*
18	**
19	***
20	*
21	***
22	**
23	*
24	**
25	**

n.º de Cpd	JAK3 IC <sub>50</sub>
26	**
27	**
28	*
29	*
32	*
33	**
34	*
35	*
36	*
37	*
38	*
* > 500 nM ** > 100 - 500 nM *** > 50 - 100 nM **** 0,1 - 50 nM	

**Tabla X. Valores de JAK3 IC<sub>50</sub> de compuestos comparativos**

n.º de Cpd	JAK3 IC <sub>50</sub>
C	*
D	*

#### 4.3.2. Ensayo de determinación de K<sub>i</sub> de JAK3

- 5 Para la determinación de K<sub>i</sub>, se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima y se siguió la reacción enzimática en función de la concentración de ATP. El K<sub>i</sub> se determinó por medio de un trazado recíproco doble de Km versus concentración de compuesto (trazado Lineweaver-Burk). JAK3 (Carna Biosciences, 09CBS-0625B) se usó a una concentración final de 10 ng/ml. El sustrato fue poli(Glu,Tyr) sal sódica (4:1), MW 20.000 – 50.000 (Sigma, P0275). La reacción se llevó a cabo en Tris 25 mM pH 7,5, Triton X-100 al 0,01%, 0,5 mM de EGTA, 2,5 mM de DTT, 0,5 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM de fosfato de b-glicerol, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> con concentraciones variables de ATP y compuesto y se desactivó mediante la adición de 150 mM de ácido fosfórico. La medición del fosfato incorporado en el sustrato polyGT se realizó cargando las muestras en una placa de filtro (utilizando un recolector de células, Perkin Elmer) y posterior lavado. El <sup>33</sup>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).

#### 15 4.4. Ensayo de inhibición TYK2

##### 4.4.1. Ensayo TYK2 con péptido Ulight-JAK1

5 El dominio catalítico TYK2 humano recombinante (aminoácidos 871-1187; número de catálogo 08-147) se adquirió  
 Carna biosciences. Se incubaron 5 ng de proteína TYK2 con 12,5 µg de sustrato polyGT (número de catálogo Sigma  
 P0275) en tampón de reacción de quinasa (Hepes 25 mM, pH 7,2, NaCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 5  
 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Brij-35 al 0,1%, ATP no radioactivo 0,1 µM, concentración final de 0,125 µCi <sup>33</sup>P-gamma-ATP (GE  
 Healthcare, número de catálogo AH9968) con o sin 5µL que contenía compuesto de ensayo o vehículo (DMSO,  
 concentración final del 1%), en un volumen total de 25 µL, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, fondo  
 en V). Después de 90 minutos a 30°C, las reacciones se desactivaron mediante la adición de 25 µL/pocillo de ácido  
 10 fosfórico de 150 mM. Toda la reacción de quinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos prelavadas  
 (ácido fosfórico 75 mM) (número de catálogo Perkin Elmer 6005177) usando un recolector de células (Perkin Elmer).  
 Las placas se lavaron 6 veces con 300 µL por pocillo de una disolución de ácido fosfórico 75 mM y se cerró  
 herméticamente el fondo de las placas. Se añadieron 40 µl/pocillo de Microscint-20, se cerró herméticamente la parte  
 superior de las placas y se realizó la lectura usando el Topcount (Perkin Elmer). La actividad quinasa se calculó  
 restando las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10  
 µM) a partir de las cpm obtenidas en presencia de un vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir  
 15 esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = ((cpm determinado para muestra con compuesto de ensayo presente - cpm determinado  
 para muestra con inhibidor de control positivo) dividido entre (cpm determinado en presencia de vehículo - cpm  
 determinado para muestra con inhibidor de control positivo)) \* 100.

20 Se preparó una serie de diluciones de dosis para los compuestos que permitían el ensayo de los efectos de dosis-  
 respuesta en el ensayo de TYK2 y el cálculo del valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Cada compuesto se sometió a  
 ensayo de manera rutinaria a una concentración de 20 µM seguido de una dilución 1/3 en serie, 8 puntos (20 µM -  
 6,67 µM - 2,22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27nM - 9 nM) en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando la  
 potencia de una serie de compuestos aumentó, se prepararon más diluciones y/o se redujo la concentración superior  
 (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

25 Los siguientes compuestos se han sometido a ensayo para determinar su actividad frente a TYK2; y los valores de  
 Cl<sub>50</sub>, según se determinaron usando los ensayos descritos en la presente memoria, se proporciona a continuación en  
 la Tabla XI.

**Tabla XI. TYK2 IC<sub>50</sub> Valores de los compuestos ilustrativos de la invención**

n.º de Cpd	TYK2 IC <sub>50</sub>
1	****
2	****
3	****
4	****
5	****
6	****
7	****
8	****
9	****
10	****
11	****
12	****
13	****

## ES 2 693 019 T3

n.º de Cpd	TYK2 IC <sub>50</sub>
14	****
15	****
16	****
17	**
18	****
19	****
20	****
21	****
22	****
23	****
24	****
25	****
26	****
27	****
28	**
29	**
32	***
33	****
34	*
35	*
36	*
37	*
38	*
* > 500 nM ** >100 - 500 nM *** > 50 - 100 nM **** 0,1 - 50 nM	

Tabla XII. TYK2 IC<sub>50</sub> Valores de compuestos comparativos

n.º de Cpd	TYK2 IC <sub>50</sub>
C	*
D	*

#### 4.4.2. Ensayo de determinación de K<sub>d</sub> de TYK2

- 5 Se usó TYK2 (Carna Biosciences, 09CBS-0983D) a una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se realizó en Hepes 50 mM, pH 7,5, Brij-35 al 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 1 mM utilizando trazador de quinasa 50 nM 236 (Invitrogen, PV5592) y Eu-anti-GST 2 nM (Invitrogen, PV5594) con concentraciones de compuesto variables. La detección del trazador se realizó de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

#### Ejemplo 5. Ensayos celulares:

##### 10 5.1. Ensayos celulares de selectividad JAK1, JAK2 y TYK2

##### 5.1.1. Ensayo celular JAK1 selectivo, activación de STAT1 por IFN $\alpha$ en PBMC

- 15 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de las capas leucocíticas en condiciones estériles mediante centrifugación en gradiente de densidad usando un medio LymphoPrep™ (Axis-Shield) seguido de 3 etapas de lavado posteriores en PBS sin Ca ++ Mg ++. Las PBMC se suspendieron nuevamente en un medio puro de RPMI 1640 que contenía FBS inactivado por calor al 10% (v/v), Pen-Strep al 1% (100 U/ml de Penicilium y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin) y se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C 5% de CO<sub>2</sub>.

Las PBMC se sembraron en placas de 24 pocillos a 5,0 10<sup>06</sup> células/pocillo en un volumen de 200  $\mu$ l de RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10% (v/v), Pen-Strep al 1% (Invitrogen).

- 20 Las PBMC se trataron con el compuesto de ensayo durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se añadieron 25  $\mu$ L de dilución de compuesto concentrado 10x al medio. Después de 30 minutos de pretratamiento del compuesto/vehículo de ensayo, las CMSP se estimularon durante 30 min a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con IFN $\alpha$  humano recombinante (PeproTech) a una concentración final de 100 ng/ml mediante la adición de 25  $\mu$ L (concentrado 10x) de desencadenante de citoquina para obtener un volumen final de 250  $\mu$ L por pocillo.

- 25 Todos los compuestos se sometieron a ensayo en un único inicio a partir de 20  $\mu$ M seguido de una dilución en serie 1/3, 8 dosis en total (20  $\mu$ M, 6,6  $\mu$ M, 2,2  $\mu$ M, 0,74  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M, 0,082  $\mu$ M, 0,027  $\mu$ M y 0,009  $\mu$ M) en una concentración final de 0,2% DMSO.

- 30 Después de 30 minutos de estimulación con citoquina, se transfirieron 250  $\mu$ l de suspensión celular a una placa con fondo en V de 96 pocillos, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm para sedimentar las células, seguido de la eliminación del sobrenadante. El sedimento celular se reconstituyó en 100  $\mu$ l de tampón de Lysis 1x suplementado con cóctel inhibidor de proteasa exento de EDTA (Roche Applied Sciences, número de producto 11836170001) seguido de congelación y almacenamiento a -80°C. Se proporcionó tampón de Lysis 1x con el kit Phospho-STAT1 Elisa que contenía inhibidores de fosfatasa. Los niveles endógenos de STAT1 fosforilada se cuantificaron usando un kit Sandwich ELISA PathScan® Phospho-STAT1 (Tyr701) de 96 pocillos (señalización celular, número de producto 7234) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 35 La actividad de HRP (HRP se conjuga con el anticuerpo secundario) se midió mediante la adición de 100  $\mu$ L de sustrato de luminol recién preparado (BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD), Roche, Número de producto 11582950001), incubación durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió en un luminómetro de microplaca Ascent Luminoskan de Thermo Scientific (tiempo de integración de 200 mseg).

##### 5.1.2. Ensayo celular selectivo JAK2, activación de STAT5 por GM-CSF en PBMC

- 40 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de las capas leucocíticas en condiciones estériles mediante centrifugación en gradiente de densidad usando medio LymphoPrep™ (Axis-Shield) seguido de 3 etapas de lavado posteriores en PBS sin Ca ++ Mg ++. Las PBMC se suspendieron nuevamente en medio puro de RPMI 1640 que contenía FBS inactivado por calor al 10% (v/v), Pen-Strep al 1% (100 U/ml de Penicilium y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin) y se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C 5 % de CO<sub>2</sub>.



Las PBMC se sembraron en placas de 24 pocillos a  $5,0E06$  células/pocillo en un volumen de 200  $\mu$ l de RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10% (v/v), Pen-Strep al 1% (Invitrogen).

5 Las PBMC se trataron con el compuesto de ensayo añadiendo 25  $\mu$ l de dilución de compuesto concentrado 10x al medio y se incubaron durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las PBMC se estimularon con GM-CSF humano recombinante (PeproTech) a una concentración final de 0,5 ng/ml mediante la adición de 25  $\mu$ l (concentrado 10x) de desencadenante de citoquina por pocillo para obtener un volumen final de 250  $\mu$ l. Las células se desencadenaron durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

10 Todos los compuestos se sometieron a ensayo en un único inicio a partir de 20  $\mu$ M seguido de una dilución en serie 1/3, 8 dosis en total (20  $\mu$ M, 6,6  $\mu$ M, 2,2  $\mu$ M, 0,74  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M, 0,082  $\mu$ M, 0,027  $\mu$ M y 0,009  $\mu$ M) en una concentración final de 0,2% de DMSO.

15 Después de 30 minutos de estimulación con citoquina, se transfirieron 250  $\mu$ l de suspensión celular a una placa con fondo en V de 96 pocillos, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm para sedimentar las células. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se reconstituyó en 100  $\mu$ l de tampón de Lysis 1x suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa exento de EDTA (Roche Applied Sciences, número de producto 11836170001) seguido de congelación y almacenamiento de las muestras a -80°C. Se proporcionó tampón de Lysis 1x con el kit Phospho-STAT5 Elisa que contenía inhibidores de fosfatasa. Los niveles endógenos de STAT5 fosforilada se cuantificaron usando un kit Sandwich ELISA PathScan® Phospho-STAT5 (Tyr694) de 96 pocillos (señalización celular, número de producto 7113) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 La actividad de HRP (HRP se conjuga con el anticuerpo secundario) se midió mediante la adición de 100  $\mu$ l de sustrato de luminol recién preparado (BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD), Roche, Número de producto 11582950001), incubación durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió en un luminómetro de microplaca Ascent Luminoskan de Thermo Scientific (tiempo de integración de 200 mseg).

### 5.1.3. Ensayo celular selectivo TYK2, activación de STAT4 por IL-12 en células NK-92

25 Células NK-92 (linfoma no Hodgkin maligno humano, línea de células asesinas naturales dependiente de interleucina-2 (IL-2), ATCC n.º CRL-2407).

30 Las células NK-92 se mantuvieron en un medio esencial mínimo (MEM) medio alfa sin ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, 2 mM de L-glutamina, 2,2 g/l de bicarbonato de sodio (Invitrogen, número de producto 22561-021) que contenía 0,2 mM de mioinositol, 0,1 mM de 2-mercapto-EtOH, 0,1 mM de ácido fólico, 12,5% de suero de caballo inactivado por calor (Invitrogen, Número de producto 26050-088), FBS al 12,5% inactivado por calor, Pen-Strep al 1% (100 U/ml de Penicilium y 100  $\mu$ g/mL de estreptomycin) y 10 ng/mL de IL-2 humana recombinante (R & D Systems). Se añadió IL-2 de nueva aportación al medio con cada etapa de nueva aportación de medio. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

35 Una fracción subcultivada de células NK-92 se lavó una vez en un medio puro sin rhIL-2 y se sembró en placas de 24 pocillos a  $0,5E06$  células/pocillo en un volumen de 400  $\mu$ l de medio MEM Alpha puro sin rhIL-2 que contenía 0,2 mM mioinositol, 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, 0,1 mM de ácido fólico, 12,5% de suero de caballo inactivado por calor (Invitrogen, número de producto 26050-088), FBS al 12,5% inactivado por calor, Pen-Strep al 1% (Invitrogen).

40 Las células NK-92 se trataron con compuestos de ensayo durante 30 minutos antes de la estimulación con rhIL-12 añadiendo 50  $\mu$ l de dilución de compuesto concentrado 10x e incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 30 minutos de pretratamiento con compuesto/vehículo, las células se estimularon con IL-12 humana recombinante (R & D Systems, Número de producto 219-IL) a una concentración final de 25 ng/ml mediante la adición de 50  $\mu$ l (concentrado 10x) de desencadenante de citoquina para obtener un volumen final de 500  $\mu$ l por pocillo. Las células NK-92 se desencadenaron con rhIL-12 durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

45 Todos los compuestos se sometieron a ensayo en un único inicio a partir de 20  $\mu$ M seguido de una dilución en serie 1/3, 8 dosis en total (20  $\mu$ M, 6,6  $\mu$ M, 2,2  $\mu$ M, 0,74  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M, 0,082  $\mu$ M, 0,027  $\mu$ M y 0,009  $\mu$ M) en una concentración final de 0,2% de DMSO.

50 Los niveles de fosfo-STAT4 en células NK-92 estimuladas con rhIL-12 se cuantificaron usando un análisis de citometría de flujo en un citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter). Después de 30 minutos de estimulación con citoquina, las células se fijaron al agregar 500  $\mu$ l de BD Cytfix Fixation Buffer precalentado (BD Phosflow™, número de producto 554655) inmediatamente a los pocillos (las células se fijaron inmediatamente para mantener el estado de fosforilación, en lugar de que se giraran hacia abajo, se recomienda fijar las celdas agregando un volumen igual de BD Cytfix Buffer precalentado a la suspensión celular). Las células se incubaron durante 10 min a 37°C. La fracción celular fijada se suspendió nuevamente (1 ml) y se transfirió a tubos FACS seguido de una etapa de centrifugación (300xg, 10 min) y la eliminación del sobrenadante. El sedimento celular se mezcló (vortex) y las células se permeabilizaron añadiendo 1 ml de BD Phosflow Perm Buffer III (BD Phosflow™, número de producto 558050) seguido de incubación sobre hielo durante 30 minutos. Después de la etapa de permeabilización, las células se lavaron dos veces con BD Pharmingen™ Stain Buffer (BD Pharmingen, número de producto 554656) con centrifugación intermedia a 300xg durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento (células  $0,5E06$ ) se suspendió nuevamente en 100  $\mu$ l de BD Pharmingen™

5 Stain Buffer y se tiñó mezclando 20 µL de PE Mouse Anti-STAT4 (pY693) a las células (BD Phosflow™, PE Mouse Anti-STAT4 (pY693), número de producto 558249), luego se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células teñidas se lavaron una vez con 2 ml de tampón de tinción BD Pharmingen™ y se suspendieron nuevamente en 500 µl de tampón de tinción BD Pharmingen™ y se analizaron en un citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter).

Para todos los análisis, las células muertas y los restos se excluyeron mediante dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Los cambios en la fosforilación de las proteínas STAT4 después de la estimulación con citoquinas se calcularon mediante intensidad media (o mediana) de fluorescencia X (MFI) por célula en el 100% de la fracción cerrada para todos los compuestos de ensayo estimulados con citoquina y las muestras no estimuladas.

10 **5.1.4. Resultados de los ensayos JAK1, JAK2 y TYK2:**

Las muestras no estimuladas (sin desencadenante/vehículo (0,2% DMSO) se usan como control positivo (100% de inhibición). Como control negativo (0% de inhibición), se usan las muestras estimuladas (desencadenante/vehículo (0,2% DMSO)). Los controles positivo y negativo se usan para calcular los valores Z' y los valores de "porcentaje de inhibición (PIN)".

15 El porcentaje de inhibición se calculó a partir de

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{RCLU (desencadenante/vehículo)} - \text{RCLU compuesto de ensayo}}{\text{RCLU (desencadenante/vehículo)} - \text{RCLU (sin desencadenante/vehículo)}} * 100$$

en donde

RCLU (desencadenante/vehículo): señal quimioluminiscente relativa determinada en presencia del vehículo y desencadenante.

20 RCLU (compuesto de ensayo): señal quimioluminiscente relativa determinada en presencia de compuestos de ensayo)

RCLU (sin desencadenante/vehículo): señal quimioluminiscente relativa determinada en presencia de vehículo sin desencadenante.

En caso de que la señal de lectura se exprese como valores de media X (análisis de citometría de flujo de los niveles de pSTAT4 en células NK-92 estimuladas por citoquinas), la RCLU se reemplaza por el valor de la media X.

25 Los valores de PIN se trazan para los compuestos sometidos a ensayo en respuesta a la dosis y los valores de EC<sub>50</sub> se obtienen utilizando el software GraphPad Prism aplicando un ajuste de curva de regresión no lineal (sigmoideal).

**5.2. Ensayo de mutaciones de JAK1 en líneas celulares de cáncer de pulmón y carcinoma hepatocelular.**

**5.2.1. La señalización constitutiva inducida por mutación de JAK1**

30 Las líneas celulares cancerosas con y sin mutaciones de JAK1 (Tabla I - Líneas celulares de cáncer de pulmón) se cultivaron con o sin suero durante 4-6 h, estimuladas o no con un cóctel de citoquinas (INFγ, IL2, IL4 e IL6) durante 5, 10, 30 y 45 min. La fosforilación de JAK1, STAT1, STAT3 y STAT5 se evaluó mediante inmunotransferencia (anticuerpos de señalización celular).

**5.2.2. Identificación de mutantes de JAK1 usando inhibidores de JAK**

**5.2.2.1. Fosforilación de la ruta JAK-STAT:**

35 Las líneas celulares cancerosas con y sin mutaciones de JAK1 se cultivaron en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de inhibidores de JAK. Las células se analizaron a las 24 y 48 h para la inhibición eficaz de la ruta JAK-STAT mediante inmunotransferencia.

**Tabla XIII. Tabla I: líneas celulares ilustrativas de cáncer de pulmón**

Gen	Línea celular	Tejido	Cambio	Dominio de proteína	Presente en tejido primario
JAK1	NCIH1915	Pulmón	I62V	FERM	–
JAK1	SQ1	Pulmón	N226S	FERM	–
JAK1	HCC4006	Pulmón	S383G	FERM	–

Gen	Línea celular	Tejido	Cambio	Dominio de proteína	Presente en tejido primario
JAK1	NCIH2066	Pulmón	L423V	Interdominio (FERM y SH2)	–
JAK1	NCIH1793	Pulmón	H525Y	SH2	–
JAK1	HCC95	Pulmón	N833S	Proteína quinasa 1	Si
JAK1	VMRCLCD	Pulmón	E223 *	–	–
JAK1	NCIH1563	Pulmón	Q161*	–	–
WT JAK1	A549	Pulmón	–	–	–
JAK1 -/-	U4C	Fibrosarcoma	–	–	–

\*: truncamiento

5.2.2.2. Viabilidad celular

5 Ensayo 2D: se cultivaron líneas celulares cancerosas con y sin mutaciones JAK1 en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de inhibidores de JAK. Después de 48-72 h, la viabilidad celular se midió usando el ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminiscent (Promega) o ensayo de MTT. Alternativamente, se analizaron las líneas celulares cancerosas en diferentes momentos del cultivo con una concentración fija de inhibidor de JAK para determinar la viabilidad celular usando el ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminiscent (Promega) o ensayo de MTT.

10 Ensayo 3D: se sembraron líneas celulares cancerosas con y sin mutaciones JAK1 en un medio de agar semisólido. La formación de colonias multicelulares se midió al determinar la viabilidad celular usando un colorante fluorescente en diferentes momentos del cultivo. La adición de inhibidores potenciales después de la siembra celular permite el análisis de los efectos antitumorales.

5.2.3. Investigando mutaciones humanas de JAK1 en células murinas Ba/F3

(Como se ilustra en: Kan et al., 2013; Staerk et al., 2005; Zenatti et al., 2011)

15 Construcción de vectores de expresión de JAK1: las secuencias de JAK1 humano de tipo salvaje y mutante se clonan en vectores retrovirales y los clones se verifican mediante secuenciación.

Infección retroviral de células Ba/F3: las células Ba/F3 se infectan con sobrenadantes retrovirales producidos en células 293T.

20 Las células Ba/F3 que expresan WT humano o JAK1 mutado se cultivan con o sin IL-3 durante 4 h y la fosforilación de la ruta JAK-STAT evaluada por inmunotransferencia.

El potencial de transformación de las mutaciones de JAK1 se evalúa midiendo la capacidad de cada mutación para inducir el crecimiento autónomo cuando se expresa en células Ba/F3 dependientes de citoquinas. El crecimiento celular se evalúa en ausencia de la citoquina IL-3.

25 Las líneas celulares Ba/F3 transducidas con JAK1 mutante se evalúan para determinar su sensibilidad a los inhibidores de JAK cultivándolos en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de inhibidores de JAK. Después de 48-72 h, la viabilidad celular se midió usando el ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminiscent (Promega) o ensayo de MTT. Alternativamente, las líneas celulares cancerígenas en diferentes momentos del cultivo con una concentración fija de inhibidor de JAK se analizan para determinar la viabilidad celular usando ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminiscent (Promega) o ensayo de MTT.

30 5.2.4. Potencial oncogénico in vivo de las mutaciones de JAK1

5.2.4.1. Modelo de xenoinjertos:

Las células que expresan JAK1 mutante se inyectan por vía subcutánea en ratones CD1 nu/nu o ratones Rag1 -/- y se evalúa la progresión del tumor. Se establecen curvas de crecimiento de volumen tumoral subcutáneo. Se determina la trasplantabilidad de tumores primarios en animales receptores secundarios.

#### 5.2.4.2. modelo PDX.

- 5 Los xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) se basan en la transferencia de tumores primarios (que contienen mutaciones de JAK1) directamente del paciente a un ratón inmunodeficiente. Para lograr esto, los tumores del paciente deben obtenerse frescos de la cirugía, en dicho momento éstos se digieren mecánicamente o químicamente, con una pequeña porción guardada como material primario y se establece en un ratón NOD-SCID. Los modelos PDX se mantienen pasando las células directamente de ratón a ratón una vez que la carga del tumor llega a ser demasiado alta. Los tumores se pueden injertar heterotópicamente (implantar tumores en el flanco subcutáneo de un ratón) u ortotópicamente (implantación directa en el órgano de ratón de elección).

La fosforilación de JAK1, STAT1, STAT3 y STAT5 en tumores primarios y secundarios se evalúa mediante inmunotransferencia.

#### 5.3. Ensayo de proliferación de PBL

- 15 Los linfocitos de sangre periférica humana (PBL) se estimularon con IL-2 y la proliferación se midió usando un ensayo de incorporación de BrdU. Los PBL en primer lugar se estimularon durante 72 h con PHA para inducir el receptor IL-2, luego se aceleraron durante 24 h para detener la proliferación celular seguida de estimulación con IL-2 durante otras 72 h (incluido el marcaje BrdU 24h). Las células se preincubaron con los compuestos de ensayo 1 h antes de la adición de IL-2. Las células se cultivaron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10% (v/v).

#### 20 5.4. Ensayo de sangre humana completa (hWBA)

##### 5.4.1. Protocolo 1

##### 5.4.1.1. Protocolo de estimulación IL-6

- 25 Se realizó un análisis de citometría de flujo para establecer JAK1 sobre la selectividad del compuesto JAK2 ex vivo usando sangre humana completa. Por lo tanto, la sangre se tomó de voluntarios humanos que dieron su consentimiento informado. A continuación, la sangre se equilibró durante 30 minutos a 37°C bajo balanceo suave, luego se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf. El compuesto se agregó en diferentes concentraciones y se incubó a 37°C durante 30 min bajo balanceo suave y posteriormente se estimuló durante 20 min a 37°C bajo balanceo suave con interleuquina 6 (IL-6) para la estimulación de la ruta dependiente de JAK1 o GM-CSF para estimulación de la ruta dependiente de JAK2. A continuación, se evaluaron Phospho-STAT1 y phospho-STAT5 usando análisis FACS.

##### 30 5.4.1.2. Ensayos Phospho-STAT1

##### 5.4.1.2.1. Preparación de reactivos

El tampón Lyse/Fix 5X (BD PhosFlow, n.º de catálogo 558049) se diluyó 5 veces con agua destilada y se precalentó a 37°C. Se descartó el resto del tampón Lyse/Fix diluido.

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

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

##### 5.4.1.2.2. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con IL-6

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

##### 45 5.4.1.2.3. Preparación de glóbulos blancos

Al final del período de estimulación, se agregaron inmediatamente 3 ml de tampón Lyse/Fix 1X precalentado a las muestras de sangre, se agitaron brevemente en vórtice y se incubaron durante 15 minutos a 37°C en un baño de agua para lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

- 50 Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 400xg a 4°C. El sedimento celular se lavó con 3 ml de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el sedimento celular se suspendió nuevamente en 100 µl de PBS 1X enfriado en hielo y

se añadieron 900 µl de MeOH al 100% enfriado en hielo. 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 suspendió nuevamente en 80 µL de 1X PBX que contenía 3% de BSA.

5 **5.4.1.2.4. Marcaje celular con anticuerpos anti Phospho-STAT1 y anti-CD4**

Se añadieron y mezclaron 20 µL de anticuerpo anti-STAT1 de ratón PE (pY701) o anticuerpo de control de isotipo IgG2aK de ratón PE (BD Biosciences, n.º de catálogo 612564 y 559319, respectivamente) y anticuerpo anti-CD4 conjugado con FITC o anticuerpo de isotipo conjugado con FITC de control y, a continuación, se incubaron durante 30 min a 4°C, en la oscuridad.

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

**5.4.1.2.5. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II**

15 Se contaron 50.000 eventos totales, y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT1 luego de la entrada en células CD4+, en la entrada de linfocitos. Se analizó la información usando el programa informático FACSDiva, y se calculó el porcentaje de inhibición de la estimulación de IL-6 sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 en células CD4+.

**5.4.1.3. Ensayo de Fosfo-STAT5**

Preparación de reactivos

20 El tampón Lyse/Fix 5X (BD PhosFlow, n.º de catálogo 558049) se diluyó 5 veces con agua destilada y se precalentó a 37°C. Se descartó el resto del tampón Lyse/Fix diluido.

Se disolvieron 10 µg de rhGM-CSF (AbCys S. A., n.º de catálogo P300-03) en 100 µm de PBS al 0,1% de BSA para obtener una disolución madre de 100 µg/ml. La disolución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

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

**5.4.1.3.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con GM-CSF**

30 Se recogió sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 148,5µL. A continuación, se agregó 1,5 µL de la dilución del compuesto de ensayo a cada alícuota de sangre y las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37°C bajo balanceo suave. Se añadió a las muestras de sangre la disolución madre de GM-CSF (1,5 µL) diluida 5.000 veces (concentración final de 20 pg/mL) y las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos bajo balanceo suave.

**5.4.1.3.2. Preparación de glóbulos blancos**

35 Al final del período de estimulación, se agregaron inmediatamente 3 ml de tampón Lyse/Fix 1X precalentado a las muestras de sangre, se agitaron brevemente en vórtice y se incubaron durante 15 minutos a 37°C en un baño de agua para lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 400xg a 4°C. El sedimento celular se lavó con 3 ml de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el sedimento celular se suspendió nuevamente en 100 µl de PBS 1X enfriado en hielo y se añadieron 900 µl de MeOH al 100% enfriado en hielo. Las células se incubaron a 4°C durante 30 min para la permeabilización.

40 **5.4.1.3.3. Marcaje celular con anticuerpos anti fosfo-STAT5 y anti-CD33**

Se añadieron y mezclaron 20 µL de anticuerpo anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o anticuerpo de control de isotipo IgG1k de ratón PE (BD Biosciences, n.º de catálogo 612567 y 554680, respectivamente) y anticuerpo CD33 de ratón APC (BD Biosciences, n.º de catálogo 345800) o anticuerpo de isotipo IgG1 de ratón APC de control (BD Biosciences, n.º de catálogo 345818) y, a continuación, se incubaron durante 30 min a 4°C, en la oscuridad.

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

**5.4.1.3.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II**

Se contaron 50.000 eventos totales, y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT5 luego de la entrada en células CD33+. Se analizó la información usando el programa informático FACSDiva, y correspondía con el porcentaje

de inhibición de la estimulación de GM-CSF calculado a partir del porcentaje de células positivas para fosfo-STAT5 en células CD33+.

## 5.5. Protocolo 2

### 5.5.1. Protocolo de estimulación

5 Se realizó un análisis de citometría de flujo para establecer JAK1 sobre la selectividad del compuesto JAK2 ex vivo usando sangre humana completa. Por lo tanto, la sangre se tomó de voluntarios humanos que dieron su consentimiento informado. A continuación, la sangre se equilibró durante 30 minutos a 37°C bajo balanceo suave, luego se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf. El compuesto se agregó en diferentes concentraciones y se incubó a 37°C durante 30 min bajo balanceo suave y posteriormente se estimuló durante 20 min a 37°C bajo balanceo suave con interleuquina 6 (IL-6) para la estimulación de la ruta dependiente de JAK1, con interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) para la estimulación de la ruta JAK1/TYK2, con interleuquina 2 (IL-2) para la estimulación de la ruta JAK1/JAK3 o con GM-CSF para la estimulación de la ruta dependiente de JAK2. A continuación, se evaluaron los niveles de fosfo-STAT1 (para células estimuladas con IL-6- e IFN $\alpha$ ) y fosfo-STAT5 (para células estimuladas con IL-2 y GM-CSF) usando análisis FACS.

15

### 5.5.2. Ensayos fosfo-STAT

#### 5.5.2.1. Preparación de reactivos

20 El tampón Lyse/Fix 5X (BD PhosFlow, n.º de catálogo 558049) se diluyó 5 veces con agua destilada y se precalentó a 37°C. Se descartó el resto del tampón Lyse/Fix diluido.

Se disolvieron 10  $\mu$ g de rhIL-6 (R & D Systems, n.º de catálogo 206-IL) en 1 ml de PBS al 0,1% de BSA para obtener una disolución madre de 10  $\mu$ g/ml. La disolución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

Se disolvieron 10  $\mu$ g de rhIL-2 (R & D Systems, n.º de catálogo 202-IL) en 1 ml de PBS al 0,1% de BSA para obtener una disolución madre de 10  $\mu$ g/ml. La disolución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

25 Se disolvieron 5  $\mu$ g de rhGM-CSF (AbCys S.A., Cat no P300-03) en 12,5 ml de PBS al 0,1% de BSA para obtener una disolución madre de 400 ng/ml. La disolución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

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

#### 30 5.5.2.2. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con desencadenantes

Se recogió sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se dividió en alícuotas de 148,5  $\mu$ L. A continuación, se agregó 1,5  $\mu$ L de la dilución del compuesto de ensayo a cada alícuota de sangre y las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37°C bajo balanceo suave. Se añadió a las muestras de sangre 1 microlitro y medio de disolución madre de IL-6 diluida 10 veces, 1,5  $\mu$ L de disolución madre de uIFN $\alpha$  (PBL Biomedical, n.º de catálogo 11200-1), 1,5  $\mu$ L de disolución madre de IL-2 diluida 25 veces o 1,5  $\mu$ L de dilución madre de GM-CSF diluida 200 veces y las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos bajo balanceo suave.

#### 35 5.5.2.3. Preparación de glóbulos blancos

Al final del período de estimulación, se agregaron inmediatamente 3 ml de tampón Lyse/Fix 1X precalentado a las muestras de sangre, se agitaron brevemente en vórtice y se incubaron durante 15 minutos a 37°C en un baño de agua para lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 400xg a 4°C. El sedimento celular se lavó con 3 ml de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el sedimento celular se suspendió nuevamente en 100  $\mu$ L de PBS 1X enfriado en hielo y se añadieron 900  $\mu$ L de MeOH al 100% enfriado en hielo. Las células se incubaron a 4°C durante 30 min para la permeabilización.

45 A continuación, las células permeabilizadas se lavaron con 1X PBS que contenía 3% de BSA y finalmente se suspendió nuevamente en 80  $\mu$ L de 1X PBX que contenía 3% de BSA.

#### 5.5.2.4. Marcaje celular

50 20  $\mu$ L de anticuerpo anti-STAT1 de ratón PE (pY701) o anticuerpo de control de isotipo IgG2ak de ratón PE (BD Biosciences, n.º de catálogo 612564 y 559319, respectivamente) y anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC o anticuerpo de isotipo conjugado con APC de control (BD Biosciences, n.º de catálogo 555349 y 555751,

respectivamente) se añadieron a tubos estimulados con IL-6 e IFN- $\alpha$  y, a continuación, se incubaron durante 20 min a 4°C, en la oscuridad.

5 20  $\mu$ L de anticuerpo anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o anticuerpo de control de isotipo IgG1k de ratón PE (BD Biosciences, n.º de catálogo 612567 y 554680, respectivamente) y anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC o anticuerpo de isotipo conjugado con APC de control (BD Biosciences, n.º de catálogo 555349 y 555751, respectivamente) se añadieron a tubos estimulados con IL-2 y, a continuación, se incubaron durante 20 min a 4°C, en la oscuridad.

10 20  $\mu$ L de anticuerpo anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o anticuerpo de control de isotipo IgG1k de ratón PE (BD Biosciences, n.º de catálogo 612567 y 554680, respectivamente) y anticuerpo CD33 de ratón APC (BD Biosciences, n.º de catálogo 345800) o anticuerpo de isotipo IgG1k de ratón APC de control (BD Biosciences, n.º de catálogo 345818) se añadieron a tubos estimulados con GM-CSF y, a continuación, se incubaron durante 20 min a 4°C, en la oscuridad.

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

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

20 Se contaron 50.000 eventos totales, y se midieron las células positivas para Fosfo-STAT1 luego de la entrada en células CD4+, en la entrada de linfocitos para células estimuladas con IL-6- e IFN $\alpha$ . Las células positivas para Fosfo-STAT5 se midieron después de la entrada en células CD4 +, en la puerta de linfocitos para células estimuladas con IL-2. Las células positivas para Fosfo-STAT5 se midieron después de la entrada en células CD33 +. Se analizó la información usando el programa informático FACSDiva, y se calculó el porcentaje de inhibición de células estimuladas con IL-6- e IFN $\alpha$  a partir del porcentaje de células positivas para Fosfo-STAT1 en células CD4+. Para las células estimuladas con IL-2, los resultados se analizaron usando el software FACSDiva y el porcentaje de inhibición de la estimulación con IL-2 se calculó a partir del porcentaje de células positivas para Fosfo-STAT1 en 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 el Fosfo-STAT5 en las células CD33 +.

### **Ejemplo 6. Modelos in vivo**

#### 6.1. Modelo de CIA

##### 30 6.1.1. Materiales

35 Se adquirieron coadyuvante de Freund completo (CFA) y coadyuvante de Freund incompleto (IFA) de Difco. Se adquirieron colágeno bovino tipo II (CII), lipopolisacárido (LPS), y Enbrel de Chondrex (Isle d'Abeau, Francia); Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, Francia), Whyett (jeringa inyectable de 25 mg, Francia) Acros Organics (Palo Alto, CA), respectivamente. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado reactivo, y todos los disolventes fueron de grado analítico.

##### 6.1.2. Animales

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

##### 40 6.1.3. Artritis inducida por colágeno (CIA)

45 Un día antes del experimento, se preparó una disolución de CII (2 mg/ml) con ácido acético, 0.05 M, y se almacenó a 4°C. Justo antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes equivalentes de coadyuvante (IFA) y CII con un homogeneizador, en una botella de vidrio previamente enfriada en un baño de agua helada. Pudieran ser necesarias una cantidad adicional de coadyuvante y una homogeneización prolongada, en caso de no formarse una emulsión. Se inyectaron 0,2 ml de la emulsión por vía intradérmica en la base de la cola de cada rata el día 1; se realizó una segunda inyección intradérmica de refuerzo (disolución de CII a una concentración de 2 mg/ml en CFA, 0,1 ml disolución salina), el día 9. Este método de inmunización se modificó a partir de los métodos publicados (Jou et al., 2005; Sims et al, 2004;).

##### 6.1.4. Diseño del estudio

Los efectos terapéuticos de los compuestos se sometieron a ensayo en el modelo de rata CIA. Las ratas se dividieron en forma aleatoria en grupos iguales, y cada grupo contenía 10 ratas. Todas las ratas se inmunizaron el día 1 y se reforzaron el día 9. La dosificación terapéutica duró desde el día 16 hasta el día 30. Se trató el grupo de control negativo con vehículo (MC 0,5%), y el grupo de control positivo, con Enbrel (10 mg/kg, 3 x semana, s. c.). Un compuesto de interés típicamente se sometió a ensayo en tres dosis, por ejemplo, 3, 10, 30 mg/kg, p. o.

#### 6.1.5. Evaluación clínica de la artritis

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

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

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

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

#### 6.1.6. Cambio en el peso corporal (%) después del inicio de la artritis

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

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

$$\text{Ratas: } \frac{\text{Peso corporal } t_{(\text{semana}4)} - \text{peso corporal } t_{(\text{semana}3)}}{\text{peso corporal } t_{(\text{semana}3)}} \times 100\%$$

#### 6.1.7. Radiología

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

#### 6.1.8. Histología

Tras el análisis radiológico, las garras traseras de los ratones se fijaron en formalina regulada con fosfato al 10% (pH 7,4), se descalcificaron con descalcificante óseo rápido para la histología fina (Laboratories Eurobio) y se embutieron en parafina. Con el fin de garantizar la evaluación extensa de las articulaciones artríticas, se cortaron por lo menos cuatro secciones seriales (5 µm de espesor), y cada serie de secciones tenía 100 µm, entre una y otra. Las secciones



se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las examinaciones histológicas para establecer la inflamación sinovial y el daño óseo y de cartílago se efectuaron a doble ciego. En cada garra, se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron la infiltración celular; la gravedad del pano sinovial; la erosión del cartílago; y la erosión ósea. La clasificación se efectuó de la siguiente manera: 1: normal; 2: leve; 3: moderado; 4: notable. Estos cuatro puntajes se sumaron, y se representaron como un puntaje adicional, es decir, el "puntaje total de AR".

#### 6.1.9. Análisis por tomografía computarizada ( $\mu$ CT) del calcáneo (hueso del talón):

La degradación ósea observada en AR se produjo especialmente en el hueso cortical, y pudo ser revelada por el análisis de  $\mu$ CT (Oste et al., 2007; Sims et al., 2004). Luego de la toma de imágenes y de la reconstrucción de volumen tridimensional del hueso calcáneo, se midió la degradación ósea como la cantidad de objetos separados presentes por diapositiva, aislados in silico perpendiculares al eje longitudinal del hueso. Cuanto mayor es la cantidad de hueso degradada, se miden más objetos separados. Se analizaron 1.000 cortes, distribuidos de forma pareja a lo largo del calcáneo (espaciadas por aproximadamente 10,8  $\mu$ m).

#### 6.1.10. PK de equilibrio

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

#### 6.2. Modelos oncológicos

Se describen modelos *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas frente a enfermedades mieloproliferativas impulsadas por JAK2 (Geron et al., 2008; Wernig et al., 2008).

#### 6.3. Modelo de ratón IBD

Se describen modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de las moléculas pequeñas frente a IBD (Wirtz y Neurath, 2007).

#### 6.4. Modelo de asma de ratón

Se describen modelos *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de moléculas pequeñas frente al asma (Ip et al., 2006; Kudlacz et al., 2008; Nials y Uddin, 2008; Pernis y Rothman, 2002).

#### 6.5. Modelo murino de hiperplasia epidérmica de tipo psoriásico inducida por inyecciones intradérmicas de IL22 o IL23

##### 6.5.1. Materiales

R&D Systems, proporcionó IL22 recombinante de ratón (582-ML-CF) libre de portador. La e-Bioscience proporcionó IL23 recombinante de ratón, libre de portador (14-8231, CF).

##### 6.5.2. Animales

Ratones de la línea Balb/C (hembras, 18-20 g de peso corporal) se obtuvieron de CERJ (Francia). Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (07:00 - 19:00). La temperatura se mantuvo a  $22^{\circ}\text{C}$ , los alimentos y el agua se proporcionaron ad libitum.

##### 6.5.3. Diseño del estudio

El diseño del estudio está adaptado de Rizzo et al, 2011.

El primer día (D1), los ratones se afeitaron alrededor de las dos orejas.

Durante 4 días consecutivos (D1 a D4), los ratones recibieron una dosis intradérmica diaria de IL22 o IL23 recombinante de ratón (1  $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$  en PBS/BSA al 0,1%) en el pabellón auricular derecho y 20  $\mu\text{L}$  de PBS/BSA al 0,1% en el pabellón auricular izquierdo bajo anestesia inducida por inhalación de isoflurano.

Desde el D1 hasta D5, a los ratones se les dosificó el compuesto de ensayo (10, 30 o 100 mg/kg, po, qd en MC 0,5%), 1 h antes de la inyección de IL23/IL22 o con vehículo.

##### 6.5.4. Evaluación de la enfermedad

El grosor de ambas orejas se midió diariamente con un calibrador automático. El peso corporal se evaluó en la iniciación y en el sacrificio. El quinto día, 2 horas después de la última dosificación, los ratones se sacrificaron. Se cortaron los pabellones de la oreja, excluyendo el cartílago. Los pabellones se pesaron y luego se colocaron en un vial que contenía 1 ml de disolución de RNAlater o en formaldehído.

- 5 En D4, también se tomaron muestras de sangre del seno retroorbital para el perfil PK inmediatamente antes de la dosificación (T0) y 1 h, 3 h, 6 h después de la dosificación.

Hubo 8 ratones por grupo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  sem y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Anova de un factor seguido por el ensayo post-hoc de Dunnett frente a grupos de vehículos IL22 o IL23,

#### 6.5.5. Histología

- 10 Después del sacrificio, las orejas se recogieron y se fijaron en formaldehído al 3,7% antes de meterlas en parafina. Se realizaron cortes de dos  $\mu$ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El grosor de la epidermis de la oreja se midió mediante el análisis de imágenes (software Sis'Ncom) con 6 imágenes por oreja capturadas con un aumento de x20. Los resultados se expresan como media  $\pm$  sem y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Anova de un factor, seguido del ensayo post hoc de Dunnett frente a los grupos de vehículos IL22 o IL23.

- 15 6.5.6. Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real

Los niveles de transcripción de IL-17a, IL-22, IL-1 $\beta$ , LCN2 y S100A9 en el tejido de la oreja se determinaron usando PCR cuantitativa en tiempo real.

### Ejemplo 7. Ensayos de farmacocinética, ADME y toxicidad

#### 7.1. Solubilidad termodinámica

- 20 Se preparó una disolución de 1 mg/ml del compuesto de ensayo en un regulador de fosfato, 0,2 M, pH 7,4, o un regulador de citrato, 0.1 M, pH 3,0, a temperatura ambiente en un vial de vidrio.

Las muestras se hicieron rotar en un instrumento Rotator drive STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) a una velocidad de 3,0, a temperatura ambiente durante 24 h.

- 25 Después de 24 h, se transfirieron 800  $\mu$ l de la muestra a un tubo Eppendorf y se centrifugaron 5 min a 14 000 r.p.m. Luego se transfirieron 200  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra a una placa de solubilidad MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50), y se filtró el sobrenadante (10-12" Hg) con la ayuda de un colector al vacío, hacia una placa limpia Greiner de polipropileno con fondo en V, de 96 pocillos (n.º de catálogo 651201). Se diluyeron 5  $\mu$ l del producto filtrado en 95  $\mu$ l (F20) del mismo tampón utilizado para la incubación en la placa que contenía la curva estándar (Greiner, n.º de catálogo 651201).

- 30 Se preparó la curva estándar nuevamente para el compuesto en DMSO, iniciando a partir de una disolución de carga de DMSO, 10 mM, diluida, factor 2, en DMSO (5000  $\mu$ M), y luego diluida adicionalmente en DMSO hasta 19,5  $\mu$ M. A continuación, se transfirieron 3  $\mu$ l de la serie de dilución a partir de 5.000  $\mu$ M, a una mezcla de 97  $\mu$ l de acetonitrilo-tampón (50/50). El intervalo de concentración final fue de 2,5 a 150  $\mu$ M.

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

- 40 Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A consistía en amoniaco, 15 mM, y el solvente B es acetonitrilo. La muestra se ejecutó en pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, de 3,5  $\mu$ m (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tuvo un tiempo de ejecución total de 2 minutos, y osciló de 5% B a 95% B.

Se analizaron las áreas pico con la ayuda del paquete de programas informáticos Masslynx, y se trazaron las áreas pico de las muestras frente a la curva estándar, con el fin de obtener la solubilidad del compuesto.

Los valores de solubilidad se proporcionan en  $\mu$ M o  $\mu$ g/ml.

#### 7.2. Solubilidad acuosa

Iniciando a partir de una carga de 10 mM en DMSO, se preparó una dilución serial del compuesto en DMSO. La serie de dilución se transfirió a una placa 96 NUNC Maxisorb de fondo F (n.º de catálogo 442404), y se agregó regulador de fosfato, 0,1 M, pH 7,4, o regulador de citrato, 0,1 M, pH 3,0, a temperatura ambiente.

5 La concentración final varió de 300 µM a 18,75 µM en 5 etapas de dilución iguales. La concentración final de DMSO no excedió el 3%. Se agregó pireno, 200 µM, a los rincones de cada placa de 96 pocillos, que sirvió como un punto de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

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

Los valores de solubilidad se expresan en µg/ml.

15

### 7.3. Unión de proteína plasmática (diálisis de equilibrio).

20 Una disolución de carga, 10 mM, del compuesto en DMSO se diluyó con un factor 5 en DMSO. Esta disolución se diluyó adicionalmente en plasma de perro, ratón, rata o humano recién descongelado, (BioReclamation INC), con una concentración final de 5 µM y una concentración final de DMSO de 0,5% (5,5 µl en 1094,5 µl de plasma en una placa de 96 pocillos PP-Masterblock (Greiner, n.º de catálogo 780285)).

25 Se preparó una placa Pierce Red Device con inserciones (ThermoScientific, n.º de catálogo 89809) y se llenó con 750 µl de PBS en la cámara de tampón y 500 µl del plasma espigado, en la cámara de plasma. La placa se incubó durante 4 h a 37°C, mientras se agitaba a 230 rpm. Tras la incubación, se transfirieron 120 µl de ambas cámaras a 360 µl de acetonitrilo en una placa de 96 pocillos de base redonda, de pocillos profundos PP (Nunc, n.º de catálogo 278743), que se cerró herméticamente con una tapa de papel aluminio. Las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 min. Esta placa luego se centrifugó 30 min a 1.200 rcf a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo en V PP (Greiner, 651201), para el análisis en LCMS.

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

Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 ml/min. El disolvente A fue amoniaco, 15 mM, y el disolvente B fue acetonitrilo. La muestra se ejecutó en pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3,5 µM (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tuvo un tiempo de ejecución total de 2 minutos, y osciló de 5% B a 95% B.

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

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

### 7.4. Estabilidad de aldehído oxidasa

40 Una disolución de carga 10 mM del compuesto de ensayo en DMSO se diluyó primero con agua (5 veces) para obtener una disolución de trabajo 50 µM. Se preparó un inhibidor selectivo de aldehído oxidasa (hidralazina) en agua como disolución 5 mM.

45 Las mezclas de incubación se prepararon añadiendo 10 µm de suspensión de S9 de hígado (humano y rata, BD Bioscience Gentest, 20 mg/ml) a 86 µm de tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4 a 37°C. Se añadieron 2 µL de hidralazina 5 mM (para la incubación con la adición de un inhibidor selectivo) o 2 µL de agua (para la incubación sin la adición del inhibidor).

Después de 5 minutos de precalentamiento, la reacción se inició mediante la adición de 2 µL de compuesto de ensayo 50 µM a las mezclas de incubación. Después de 0, 3, 6, 12, 18 y 30 minutos de incubación, la reacción (100 µL) finalizó con 300 µL de MeCN : MeOH (2:1) con una mezcla de ácido acético al 1% que contenía 10 ng/mL de warfarina como estándar interno analítico.

5 Las muestras se mezclaron, se centrifugaron y el sobrenadante se analizó por LC-MS.

Los compuestos de ensayo se consideraron como un sustrato de aldehído oxidasa si el aclaramiento por S9 es inhibido por la hidralazina. El aclaramiento específico de la especie del compuesto de ensayo también puede indicar metabolismo por aldehído oxidasa.

La ftalazina se incluye como control positivo.

10 Las respuestas del instrumento (relación de área de pico del compuesto de ensayo y el estándar interno) se referencian a las muestras de punto de tiempo cero (consideradas como 100%) con el fin de determinar el porcentaje de compuesto restante. Los diagramas del porcentaje de compuestos de ensayo restantes se usan para determinar la vida media ( $T_{1/2}$ ) y el aclaramiento intrínseco en las incubaciones S9 usando el programa informático Graph Pad Prism.

Para calcular el aclaramiento intrínseco *in vitro* ( $CL_{int}$  (µL/min/mg), se usa la siguiente fórmula:

$$CL_{int} = \frac{0.693 \cdot \text{volumen de incubación} \cdot 1.000}{T_{1/2} \cdot \text{cantidad de proteína}}$$

15

#### 7.5. Estabilidad microsomal hepática

Una solución de carga de 10 mM de compuesto en DMSO se diluyó a 6 µM en un tampón de fosfato a 105 mM, pH 7,4 en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, n.º de catálogo 780285) y se precalentó a 37°C.

20 Se diluyó una disolución patrón de trabajo de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH, Roche, 10127671001) de 700 U/ml con un factor 1:700 en un tampón fosfato a 105 mM, pH 7,4. Una mezcla de co-factor que contenía 0,528M de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Sigma, M2670), 0,528M de glucosa-6-fosfato (Sigma, G-7879) y 0,208M de NADP+ (Sigma, N-0505) se diluyó con un factor 1:8 en un tampón de fosfato a 105 mM, pH 7,4.

25 Se preparó una disolución de trabajo que contenía 1 mg/ml de microsomas hepáticos (Xenotech) de las especies de interés (humano, ratón, rata, perro ...), 0,8 U/ml de G6PDH y mezcla del co-factor (6,6 mM de  $MgCl_2$ , 6,6 mM glucosa-6-fosfato, 2,6 mM de NADP+). Esta mezcla se preincubó durante 15 minutos, pero nunca más de 20 minutos, a temperatura ambiente.

30 Después de la preincubación, la dilución del compuesto y la mezcla que contenía microsomas se agregaron juntos en la misma cantidad y se incubaron durante 30 minutos a 300 rpm. Para el punto de tiempo de 0 min, se añadieron dos volúmenes de MeOH a la dilución del compuesto antes de que se agregue la mezcla de microsomas. La concentración final durante la incubación fue: compuesto de ensayo 3 µM o compuesto de control, microsomas de 0,5 mg/ml, G6PDH 0,4 U/ml,  $MgCl_2$  3,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM y  $NaDP^+$  1,3 mM.

Después de 30 minutos de incubación, la reacción se desactivó con 2 volúmenes de MeOH.

35 De ambos puntos de tiempo, las muestras se mezclaron, se centrifugaron y el sobrenadante se recogió para el análisis en LC-MS/MS. Las respuestas del instrumento (es decir, las alturas de los picos) se referencian a las muestras de punto de tiempo cero (como 100%) con el fin de determinar el porcentaje de compuesto restante. Los compuestos estándar Propranolol y Verapamil se incluyen en el diseño del ensayo.

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

#### 7.6. Estabilidad de los hepatocitos

40 Los modelos para evaluar el aclaramiento metabólico en hepatocitos son descritos por McGinnity et al. Drug Metabolism and Disposition 2008, 32, 11, 1247.

#### 7.7. Permeabilidad de Caco2

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

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

Se prepararon compuestos de ensayo y de referencia (propranolol y rodamina 123, o vinblastina, todos obtenidos de Sigma) en disolución salina balanceada de Hanks que contenía HEPES, 25 mM (pH 7,4), y se agregaron o bien a las cámaras apicales (125 µl) o bien a basolaterales (600 µl) del montaje de la placa Transwell a una concentración de 10 µM, con una concentración final de DMSO de 0,25%.

- 5 Se agregaron 50 µM de amarillo Lucifer Yellow (Sigma) al tampón donante, en todos los pocillos, con el fin de evaluar la integridad de los estratos celulares mediante el control de la penetración de amarillo Lucifer Yellow. Debido a que Lucifer Yellow (LY) no pudo penetrar libremente las barreras lipófilas, un alto grado de transporte LY indicó mala integridad del estrato celular.

- 10 Después de 1 h de incubación a 37°C con agitación en una agitadora orbital a 150 rpm, se tomaron alícuotas de 70 µl tanto de las cámaras apicales (A) como de las basales (B), y se agregaron a 100 µL de disolución 50:50 de acetonitrilo:agua que contenía estándar interno analítico (carbamazepina, 0,5 µM), en una placa de 96 pocillos.

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

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

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

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

cm/s

V = volumen de cámara.

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

superficie específica = 0,33 cm<sup>2</sup>.

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

Se usaron los siguientes criterios de aceptación del ensayo:

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

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

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

### 7.8. Permeabilidad MDCKII-MDR1

- 30 Las células MDCKII-MDR1 fueron células epiteliales de riñón canino Madin-Darby, que sobreexpresan el gen de resistencia a múltiples fármacos humanos (MDR1), que codifica la glicoproteína P (P-gp). Las células se obtuvieron del Netherlands Cancer Institute y se usaron después de un cultivo celular de 3-4 días en placas de inserción de cultivo de células Millicell de 24 pocillos (Millipore, PSRP010R5). El ensayo de permeabilidad MDCKII-MDR1 bidireccional se realizó como se describe a continuación.

- 35 Se sembraron  $3 \times 10^5$  células/ml ( $1,2 \times 10^5$  células/pocillo) en un medio de cultivo constituido por DMEM + 1% de Glutamax-100 + 1% de Antibiótico/Antimicótico + 10% de FBS (Biowest, S1810). Las células se dejaron en incubadora de CO<sub>2</sub> durante 3-4 días. El medio se cambió 24 h después de la siembra y el día del experimento.

- 40 Los compuestos de ensayo y de referencia (amprenavir y propranolol) se prepararon en disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS, pH 7,4) y se añadieron a las cámaras apical (400 µL) o basolateral (800 µL) del conjunto de placas de inserción de cultivo celular Millicell a concentración final de 10 µM (0,5 µM en el caso de amprenavir) con una concentración final de DMSO del 1%.

Se agregó 100  $\mu\text{M}$  de amarillo Lucifer (Sigma) a las disoluciones de tampón de todos los donantes, con el fin de evaluar la integridad de las monocapas celulares mediante el control de la permeación del amarillo Lucifer. El amarillo Lucifer es un marcador fluorescente para la ruta paracelular y se usa como control interno en cada monocapa para verificar la integridad de la unión durante el ensayo.

5 Después de una incubación de 1 h a 37°C mientras se agitó en un agitador orbital a 150 rpm, se tomaron alícuotas de 75  $\mu\text{L}$  de ambas cámaras apical (A) y basal (B) y se agregaron a 225  $\mu\text{L}$  de disolución de acetonitrilo: agua (2:1) estándar (warfarina 10 ng/ml) en una placa de 96 pocillos. Las alícuotas también se realizaron al comienzo del experimento a partir de disoluciones de donantes para obtener la concentración inicial ( $C_0$ ).

10 La concentración del compuesto en las muestras se midió mediante cromatografía líquida/espectroscopia de masas de alto rendimiento (LC-MS/MS).

El amarillo Lucifer se midió con un Fluoroscan Ascent FL Thermo Scientific (Ex 485nm y Em 530nm) en una placa de 96 pocillos que contenía 150  $\mu\text{L}$  de líquido de todos los pocillos receptores (lado basolateral o apical).

### 7.9. Estudio farmacocinético en roedores

#### 7.9.1. Animales

15 Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley (macho, 5-6 semanas de edad) de Janvier (Francia). Las ratas se aclimataron durante al menos 7 días antes del tratamiento, y se mantuvieron con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (07:00 - 19:00). La temperatura se mantuvo a aproximadamente 22°C, y se proporcionaron alimentos y agua ad libitum. Dos días antes de la administración de los compuestos de ensayo, las ratas se sometieron a la cirugía con el fin de colocar un catéter en la vena yugular, bajo anestesia de isoflurano. Después de la cirugía, las ratas se albergaron en forma individual.

20 Las ratas fueron privadas de alimentos durante al menos 16 horas antes de la dosificación oral, y 6 horas después. Se proporciono agua ad libitum.

#### 7.9.2. Estudio farmacocinético

25 Se formularon los compuestos en PEG200/disolución salina fisiológica (60/40) para la vía intravenosa y en metilcelulosa al 0,5% e hidroxilpropil-p-ciclodextrina al 10%, pH 3 para la vía oral. Los compuestos de ensayo se dosificaron por vía oral como una sola sonda esofágica, en una concentración de 5 mg/kg, con un volumen de dosificación de 5 ml/kg, y se dosificaron por vía intravenosa como un bolo por medio de la vena cava en una concentración de 1 mg/kg, con un volumen de dosificación de 5 ml/kg. Cada grupo consistió en tres ratas. Se recogieron muestras de sangre por medio de la vena yugular con heparina de litio como anticoagulante, en los siguientes tiempos: 0,05; 0,25; 0,5; 1; 3; 5 y 8 horas (vía intravenosa), y 0,25; 0,5; 1; 3; 5; 8 y 24 horas (vía oral).

30 Alternativamente, se recogieron muestras de sangre en el seno retroorbital con heparina de litio como anticoagulante, en los siguientes tiempos: 0,25; 1; 3 y 6 horas (vía oral). Se centrifugaron muestras de sangre completa a 5000 rpm durante 10 min, y las muestras de plasma resultantes se almacenaron a -20°C para el análisis posterior pendiente.

#### 7.9.3. Cuantificación de niveles compuestos en plasma

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

#### 7.9.4. Determinación de parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando Winnonlin® (Pharsight®, Estados Unidos).

### 7.10. Estudio de toxicidad de rata de 7 días

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

45 Los compuestos de ensayo se formularon en HP $\beta$ CD al 30% (v/v) en agua purificada. Cada grupo incluía 5 ratas macho principales, al igual que 3 animales satélite, para la toxicocinética. Se suministró a un cuarto grupo HP $\beta$ CD al 30% (v/v) en agua únicamente, a la misma frecuencia, volumen de dosificación y por la misma vía de administración, que funcionaba como el grupo de control de vehículo.

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

### 7.11. Sensibilidad de la prolongación QT

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

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

La disolución de baño externo contenía: NaCl, 135 mM; KCl, 5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM; glucosa, 5 mM; HEPES, 10 mM; pH 7,4.

La disolución de pipeta de parche interno contenía: Kgluconato, 100 mM; KCl, 20 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; Na<sub>2</sub>ATP, 5 mM; glutathiona, 2 mM; EGTA, 11 mM; HEPES, 10 mM; pH 7,2.

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

Todos los registros se efectuaron en células HEK293 que expresaron en forma estable canales hERG. Las células se cultivaron en cubiertas de portaobjetos redondas de 12 mm (German glass, Bellco) ancladas en la cámara de registro usando dos varillas de platino (Goodfellow). Se provocaron corrientes de hERG usando un pulso de activación a +40 mV durante 1.000 ms, seguido de un pulso de corriente de cola a -50 mV durante 2.000 ms, donde el potencial de mantenimiento fue de -80 mV. Los pulsos se aplicaron cada 20 s, y todos los experimentos se efectuaron a temperatura ambiente.

#### Observaciones finales

Los expertos en la técnica apreciarán que las descripciones precedentes son de naturaleza ilustrativa y explicativa, y están destinadas a ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas. A través de la experimentación rutinaria, un experto en la técnica reconocerá modificaciones aparentes y variaciones que se pueden realizar sin apartarse del espíritu de la invención.

Debe entenderse que 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*.

Al menos algunos de las denominaciones químicas de compuestos de la invención según se proporcionan y se exponen en esta solicitud, pueden haberse generado de forma automatizada mediante el uso de un programa informático de denominación química comercialmente disponible, y no se han verificado independientemente. Los programas representativos que realizan esta función incluyen la herramienta de denominación Lexichem comercializada por Open Eye Software, Inc. y la herramienta de programa informático Autonom comercializada por MDL, Inc. En el caso en que la denominación química indicada y la estructura representada difieran, regirá la estructura representada.

#### Referencias

Bundgaard, H., 1985, Design of prodrugs. Elsevier.

Bush, K.A., Farmer, K.M., Walker, J.S., Kirkham, B.W., 2002, Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 46, 802-805, doi:10.1002/art.10173

Choy, E.H.S., Panayi, G.S., 2001, Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 344, 907-916, doi:10.1056/NEJM200103223441207

Clegg, D.O., Reda, D.J., Harris, C.L., Klein, M.A., O'Dell, J.R., Hooper, M.M., Bradley, J.D., Bingham, C.O., Weisman, M.H., Jackson, C.G., Lane, N.E., Cush, J.J., Moreland, L.W., Schumacher, H.R., Oddis, C.V., Wolfe, F., Molitor, J.A., Yocum, D.E., Schnitzer, T.J., Furst, D.E., Sawitzke, A.D., Shi, H., Brandt, K.D., Moskowitz, R.W., Williams, H.J., 2006, Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.* 354, 795-808, doi:10.1056/NEJMoa052771

Constantinescu, S.N., Girardot, M., Pecquet, C., 2008, Mining for JAK-STAT mutations in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 33, 122-131, doi:10.1016/j.tibs.2007.12.002 not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. *Clin. Exp. Immunol.* 145, 162-172, doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03085.x

Jou, I.-M., Shiau, A.-L., Chen, S.-Y., Wang, C.-R., Shieh, D.-B., Tsai, C.-S., Wu, C.-L., 2005, Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 339-344, doi:10.1002/art.20746

- Kan, Z., Zheng, H., Liu, X., Li, S., Barber, T.D., Gong, Z., Gao, H., Hao, K., Willard, M.D., Xu, J., Hauptschein, R., Rejto, P.A., Fernandez, J., Wang, G., Zhang, Q., Wang, B., Chen, R., Wang, J., Lee, N.P., Zhou, W., Lin, Z., Peng, Z., Yi, K., Chen, S., Li, L., Fan, X., Yang, J., Ye, R., Ju, J., Wang, K., Estrella, H., Deng, S., Wei, P., Qiu, M., Wulur, I.H., Liu, J., Ehsani, M.E., Zhang, C., Loboda, A., Sung, W.K., Aggarwal, A., Poon, R.T., Fan, S.T., Wang, J., Hardwick, J., Reinhard, C., Dai, H., Li, Y., Luk, J.M., Mao, M., 2013, Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res.* 23, 1422-1433, doi:10.1101/gr.154492.113
- 5 Khachigian, L.M., 2006, Collagen antibody-induced arthritis. *Nat. Protoc.* 1, 2512-2516, doi:10.1038/nprot.2006.393
- Kopf, M., Bachmann, M.F., Marsland, B.J., 2010, Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 703-718, doi:10.1038/nrd2805
- 10 Kudlacz, E., Conklyn, M., Andresen, C., Whitney-Pickett, C., Changelian, P., 2008, The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia. *Eur. J. Pharmacol.* 582, 154-161, doi:10.1016/j.ejphar.2007.12.024
- Lee, D.M., Weinblatt, M.E., 2001, Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 358, 903-911, doi:10.1016/S0140-6736(01)06075-5
- 15 Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J.-P., Bogdanowicz, P., 2003, JAK/STAT but Not ERK1/ERK2 Pathway Mediates Interleukin (IL)-6/Soluble IL-6R Down-regulation of Type II Collagen, Aggrecan Core, and Link Protein Transcription in Articular Chondrocytes ASSOCIATION WITH A DOWN-REGULATION OF SOX9 EXPRESSION. *J. Biol. Chem.* 278, 2903-2912, doi:10.1074/jbc.M110773200
- 20 Levy, D.E., Loomis, C.A., 2007, STAT3 Signaling and the Hyper-IgE Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357, 1655-1658, doi:10.1056/NEJMe078197
- Lin, H.-S., Hu, C.-Y., Chan, H.-Y., Liew, Y.-Y., Huang, H.-P., Lepescheux, L., Bastianelli, E., Baron, R., Rawadi, G., Clément-Lacroix, P., 2007, Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 150, 862-872, doi:10.1038/sj.bjp.0707165
- 25 Li, W.Q., Dehnade, F., Zafarullah, M., 2001, Oncostatin M-Induced Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Genes Expression in Chondrocytes Requires Janus Kinase/STAT Signaling Pathway. *J. Immunol.* 166, 3491-3498,
- Menet, C.J.M., Schmitt, B.A., Geney, R.J.J., Doyle, K.J., Peach, J., Palmer, N.J., Jones, G.P., Hardy, D., Duffy, J.E.S., 2013, Imidazo [4, 5-C] Pyridine Derivatives Useful for the Treatment of Degenerative and Inflammatory Diseases. WO2013117645 (A1).
- 30 Mullighan, C.G., Zhang, J., Harvey, R.C., Collins-Underwood, J.R., Schulman, B.A., Phillips, L.A., Tasian, S.K., Loh, M.L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S.R., Chen, I.-M., Clifford, R.J., Gerhard, D.S., Carroll, W.L., Reaman, G.H., Smith, M., Downing, J.R., Hunger, S.P., Willman, C.L., 2009, JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9414-9418, doi:10.1073/pnas.0811761106
- 35 Naka, T., Nishimoto, N., Kishimoto, T., 2002, The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 4, S233-S242, doi:10.1186/ar565
- Nials, A.T., Uddin, S., 2008, Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis. Model. Mech.* 1, 213-220, doi:10.1242/dmm.000323
- 40 Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S., Shen, Z.-N., Furumatsu, T., Doi, H., Yoshida, A., Yamana, J., Yamamura, M., Ninomiya, Y., Inoue, H., Asahara, H., 2004, Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21WAF1/Cip1 expression. *Arthritis Rheum.* 50, 3365-3376, doi:10.1002/art.20709
- O'Dell, J.R., 2004, Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350, 2591-2602, doi:10.1056/NEJMra040226
- 45 Osaki, M., Tan, L., Choy, B.K., Yoshida, Y., Cheah, K.S.E., Auron, P.E., Goldring, M.B., 2003, The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for Stat1 alpha, Jak1 and Jak2, *Biochem. J.* 369, 103-115, doi:10.1042/BJ20020928
- O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., 2004, A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 555-564, doi:10.1038/nrd1441
- 50 Oste, L., Salmon, P., Dixon, G., van Rompaey, L., 2007, A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry.

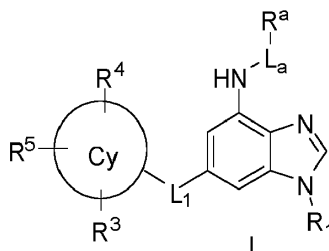


- O'Sullivan, L.A., Liongue, C., Lewis, R.S., Stephenson, S.E.M., Ward, A.C., 2007, Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol. Immunol.* 44, 2497-2506, doi:10.1016/j.molimm.2006.11.025
- Otero, M., Lago, R., Lago, F., Reino, J.J.G., Gualillo, O., 2005, Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1, *Arthritis Res. Ther.* 7, R581-R591, doi:10.1186/ar1708
- Pernis, A.B., Rothman, P.B., 2002, JAK-STAT signaling in asthma. *J. Clin. Invest.* 109, 1279-1283, doi:10.1172/JCI15786
- Rall, L.C., Roubenoff, R., 2004, Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology* 43, 1219-1223, doi:10.1093/rheumatology/keh321
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C.F., Yin, L., Pennica, D., Johnson Jr., E.M., Schreiber, R.D., 1998, Disruption of the Jak1 Gene Demonstrates Obligatory and Nonredundant Roles of the Jaks in Cytokine-Induced Biologic Responses. *Cell* 93, 373-383, doi:10.1016/S0092-8674(00)81166-6
- Salvemini, D., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., De Sarro, A., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S., 2001, Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 44, 2909-2921,
- Shelton, D.L., Zeller, J., Ho, W.-H., Pons, J., Rosenthal, A., 2005, Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain* 116, 8-16, doi:10.1016/j.pain.2005.03.039
- Sims, N.A., Green, J.R., Glatt, M., Schlicht, S., Martin, T.J., Gillespie, M.T., Romas, E., 2004, Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 2338-2346, doi:10.1002/art.20382
- Smolen, J.S., Steiner, G., 2003, Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 473-488, doi:10.1038/nrd1109
- Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.-B., Vainchenker, W., Constantinescu, S.N., 2005, JAK1 and Tyk2 Activation by the Homologous Polycythemia Vera JAK2 V617F Mutation CROSS-TALK WITH IGF1 RECEPTOR. *J. Biol. Chem.* 280, 41893-41899, doi:10.1074/jbc.C500358200
- Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J., 2007, Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* 97, 378-383, doi:10.1038/sj.bjc.6603871
- Vainchenker, W., Dusa, A., Constantinescu, S.N., 2008, JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 385-393, doi:10.1016/j.semdb.2008.07.002
- Vandeghinste, N., Tomme, P., Michiels, F., Ma, L., Mille-Baker, B., Van, E., 2005, Methods and Means for Treatment of Osteoarthritis. WO2005124342 (A2).
- Walsmith, J., Abad, L., Kehayias, J., Roubenoff, R., 2004, Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31, 23-29,
- Wernig, G., Kharas, M.G., Okabe, R., Moore, S.A., Leeman, D.S., Cullen, D.E., Gozo, M., McDowell, E.P., Levine, R.L., Doukas, J., Mak, C.C., Noronha, G., Martin, M., Ko, Y.D., Lee, B.H., Soll, R.M., Tefferi, A., Hood, J.D., Gilliland, D.G., 2008, Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 13, 311-320, doi:10.1016/j.ccr.2008.02.009
- Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J., Rudolph, K.A., 2005, Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 331-344, doi:10.1038/nrd1693
- Wirtz, S., Neurath, M.F., 2007, Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1073-1083, doi:10.1016/j.addr.2007.07.003
- Xiang, Z., Zhao, Y., Mitaksov, V., Fremont, D.H., Kasai, Y., Molitoris, A., Ries, R.E., Miner, T.L., McLellan, M.D., DiPersio, J.F., Link, D.C., Payton, J.E., Graubert, T.A., Watson, M., Shannon, W., Heath, S.E., Nagarajan, R., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J., Tomasson, M.H., 2008, Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 4809-4812, doi:10.1182/blood-2007-05-090308
- Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., Sarmiento, L.M., Correia, N., Toribio, M.L., Kobarg, J., Horstmann, M., Pieters, R., Brandalise, S.R., Ferrando, A.A., Meijerink, J.P., Durum, S.K., Yunes, J.A., Barata, J.T., 2011, Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 43, 932-939, doi:10.1038/ng.924



## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:

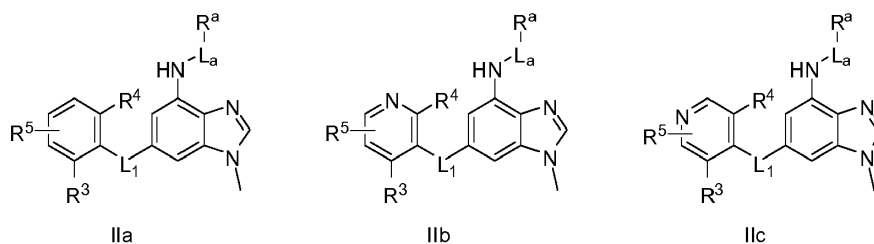


en la que,

- 5 R<sup>1</sup> es H, o Me;  
 L<sub>1</sub> es -NR<sup>2</sup>-; -O-, o -CH<sub>2</sub>-;  
 Cy es fenilo, o heteroarilo monocíclico o bicíclico fusionado de 5-9 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, O, y S;  
 R<sup>2</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;  
 10 R<sup>3</sup> es H, halo, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más halo;  
 R<sup>4</sup> es H o halo;  
 R<sup>5</sup> es -CN, halo o es -L<sub>2</sub>-R<sup>6</sup>  
 -L<sub>2</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)NR<sup>7</sup>, -NR<sup>7</sup>C(=O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR<sup>7</sup>, o -NR<sup>7</sup>SO<sub>2</sub>-;  
 15 R<sup>6</sup> es H, o alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más grupos R<sup>8</sup> independientemente seleccionados;  
 R<sup>7</sup> es H, o alquilo C<sub>1-4</sub>;  
 R<sup>8</sup> es OH, CN, halo, o alcoxi C<sub>1-4</sub>,  
 L<sub>a</sub> está ausente, o es -C(=O)-, -C(=O)O- o -C(=O)NH-;  
 R<sub>a</sub> es:  
 20 • H,  
 • alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>b</sup> independientemente seleccionados,  
 • cicloalquilo C<sub>3-7</sub> monocíclico opcionalmente sustituido con uno o más R<sup>c</sup> independientemente seleccionados, o  
 • heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, N, y S, o  
 25 • heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S;  
 R<sup>b</sup> es  
 • halo,  
 • CN,  
 30 • OH,  
 • alcoxi C<sub>1-4</sub>,  
 • cicloalquilo C<sub>3-7</sub>,  
 • heterocicloalquilo monocíclico de 4-7 miembros que comprende uno o más heteroátomos independientemente seleccionados entre O, N, y S (heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido con uno o más independientemente seleccionados entre halo, u oxo),  
 35 • -SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, o  
 • -C(=O)NR<sup>b1</sup>R<sup>b2</sup>  
 R<sup>c</sup> es  
 • halo,  
 40 • CN,  
 • OH,  
 • alquilo C<sub>1-4</sub>,  
 • -C(=O)OH, o  
 • -C(=O)NR<sup>c1</sup>R<sup>c2</sup>; y  
 45 cada R<sup>b1</sup>, R<sup>b2</sup>, R<sup>c1</sup> y R<sup>c2</sup> se selecciona independientemente entre H, y alquilo C<sub>1-4</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable, o un solvato, o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable.

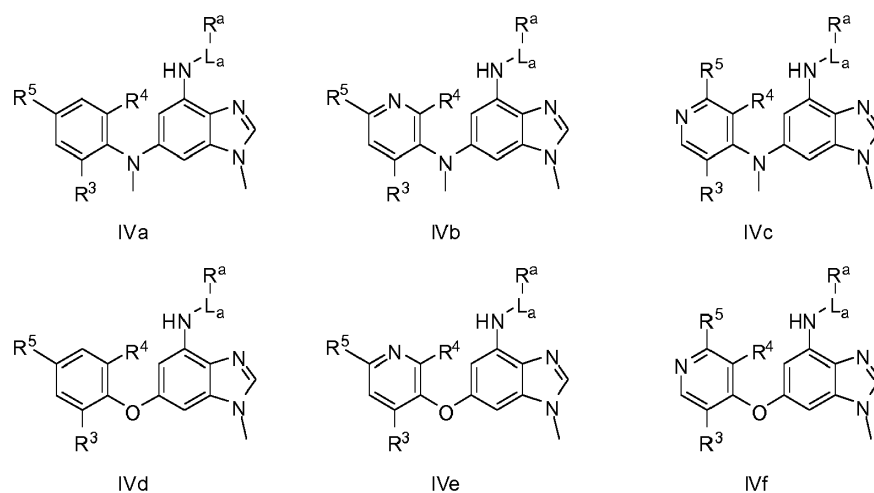
2. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R<sup>1</sup> es Me.

3. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas IIa, IIb, o IIc:



en donde L<sub>1</sub>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, L<sub>a</sub>, R<sup>a</sup> y R<sup>5</sup> son de acuerdo como se describen en la reivindicación 1.

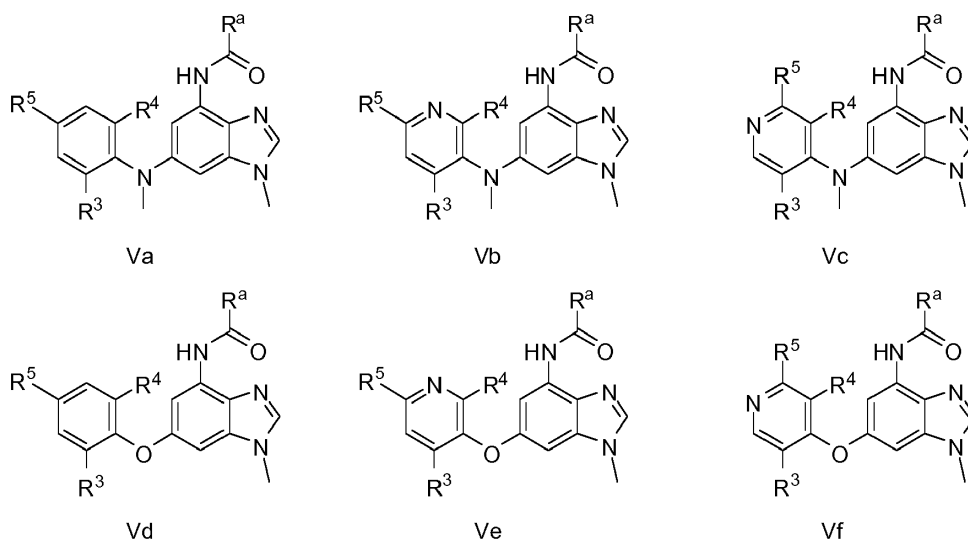
4. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, o IVf:



5

en donde R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, L<sub>a</sub>, y R<sup>a</sup> son de acuerdo como se describen en la reivindicación 1.

5. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de acuerdo con las Fórmulas Va, Vb, Vc, Vd, Ve, o Vf:



10

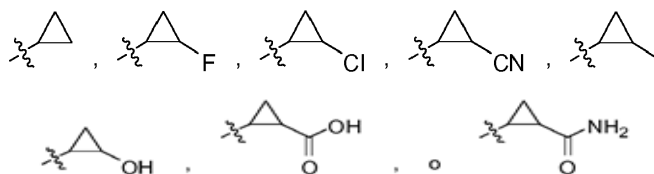
en donde R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, L<sub>a</sub>, y R<sup>a</sup> son de acuerdo como se describen en la reivindicación 1.

6. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R<sup>4</sup> es H, F, o Cl.

15 7. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde R<sup>3</sup> es H, Me, o Et.

8. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde R<sup>5</sup> es CN, F, Cl, -SO<sub>2</sub>Me o -SO<sub>2</sub>Et.

9. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde R<sup>a</sup> es:



- 5 **10.** Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.
- 10 **11.** Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 12.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende un agente terapéutico adicional.
- 13.** El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, para su uso en medicina.
- 15 **14.** Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, para su uso en el tratamiento, o prevención de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio del cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.
- 20 **15.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.