

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 499**

51 Int. Cl.:

**C07D 403/12** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2016 PCT/US2016/044410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17023672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2016 E 16750326 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3331873**

54 Título: **Un derivado de 4-(3-pirazolilamino)-bencimidazol como inhibidor de la JAK1 para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**04.08.2015 US 201562200684 P**

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

**19.02.2020**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**CLAYTON, JOSHUA RYAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 743 499 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).

## DESCRIPCION

Un derivado de 4-(3-pirazolilamino)-bencimidazol como inhibidor de la JAK1 para el tratamiento del cáncer

La presente invención se refiere a ciertos compuestos de bencimidazol, o sales aceptables farmacéuticamente de los mismos, que inhiben la Janus quinasa 1 (JAK1), composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y los compuestos para uso en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

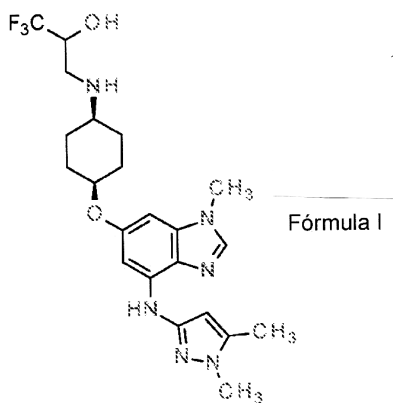
Las JAK quinasas son una familia tirosina quinasa que regula la fosforilación de la tirosina de varios efectores e inicia la activación de las vías de señal secuencia abajo. La JAK1 es un miembro de esta familia que media la activación del transductor de señal y activador de señal de transcripción 3, STAT3. La activación de STAT3 persistente es tumorigena y promueve la supervivencia y proliferación de células cancerosas. Igualmente, se ha mostrado que las aberraciones en la activación de STAT3 interrumpen la vigilancia inmune del tumor en el microentorno del tumor. Por ello, la inhibición de la JAK1 puede bloquear la activación de STAT3, dando como resultado la inhibición del crecimiento del tumor y vigilancia inmune del tumor. Además, se ha identificado la activación de mutaciones de la JAK1 tanto en el linaje T de la leucemia linfoblástica aguda como en carcinoma hepatocelular Asiático y han sido demostradas como oncogénicas. Estos resultados sugieren que la JAK1 es una diana oncológica viable.

Es sabido que la JAK2 forma homodímeros que median en el receptor-sígnal de EPO y TPO a la vía STAT5, la cual regula los glóbulos rojos y la producción de plaquetas. La inhibición de la JAK2 puede dar como resultado anemia y trombocitopenia. Sin embargo, la JAK1 no muestra estas actividades y, en consecuencia, sugiere que los compuestos que inhiben de manera selectiva la JAK1 puede tener un mejor perfil de hematotoxicidad y/o inmunogenicidad que los compuestos que inhiben de manera selectiva la JAK2 o los inhibidores duales JAK1/2.

Los compuestos inhibidores de la JAK quinasa son conocidos en la literatura. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 2015/0203455 divulga ciertos compuestos de bencimidazol que son inhibidores de la JAK.

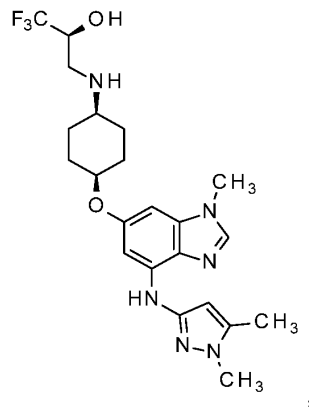
Sigue existiendo una necesidad de proporcionar inhibidores de la JAK1 alternativos para el tratamiento del cáncer. Igualmente, sigue existiendo una necesidad de proporcionar inhibidores de la JAK1 selectivos que reduzcan o eviten la inhibición de la JAK2. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona ciertos inhibidores de la JAK1 que pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, la presente invención proporciona ciertos inhibidores de la JAK1 selectivos que pueden reducir la inhibición de la JAK2.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



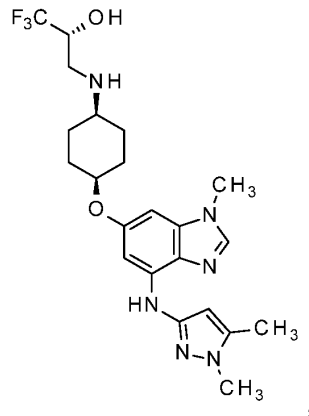
o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto que está seleccionado entre el grupo que consiste en (2S)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol:



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, y

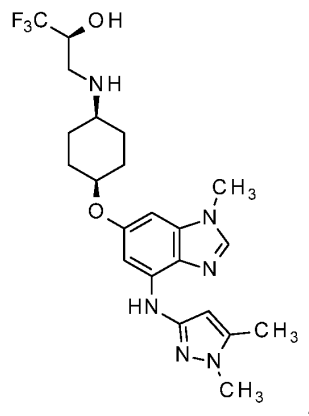
(2R)-3-[[*cis*-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol:



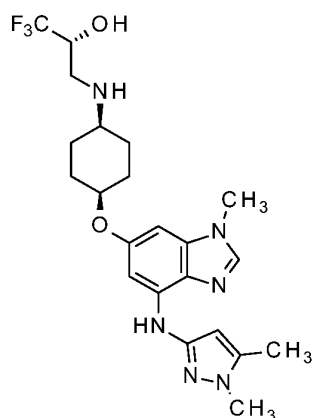
5

o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto que es (2S)-3-[[*cis*-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol:



10 o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo. Más preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto que es (2R)-3-[[*cis*-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol:



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

Como una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto que es (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol.

- 5 Como una realización particular, la presente invención proporciona también un compuesto que es (2S)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma, y un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, y un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente.

La presente invención divulga un procedimiento para el tratamiento del cáncer, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo. La presente invención divulga un procedimiento para el tratamiento del cáncer, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo. La presente invención divulga un procedimiento para el tratamiento del cáncer, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia. La presente invención proporciona (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia. La presente invención proporciona (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I para uso en terapia. La presente invención proporciona igualmente (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol para uso en terapia. La presente invención proporciona (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol para uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona el uso de (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona igualmente el uso de (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona la base libre de (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol en una forma cristalina. La presente invención proporciona igualmente la base libre de (2R)-3-[[cis-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol en una forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción de polvos por rayos X que tiene picos característicos, en  $2\theta \pm 0,2$ , que se producen a  $19,5^\circ$  en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en  $11,9^\circ$ ,  $15,4^\circ$ , y  $17,6^\circ$ .

La presente invención proporciona la sal del ácido dimetano sulfónico de (2R)-3-[[*cis*-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol en una forma cristalina. La presente invención proporciona igualmente la sal del ácido dimetano sulfónico de (2R)-3-[[*cis*-4-[[4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol en una forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción de polvos por rayos X que tiene picos característicos, en  $2\theta \pm 0,2$ , que se producen a  $21,7^\circ$  en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en  $21,2^\circ$ ,  $18,0^\circ$ , y  $15,7^\circ$ .

Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de los usos como se describen en la misma, en la cual el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de célula no pequeña y adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma, carcinoma hepatocelular, incluyendo carcinoma hepatocelular Asiático, cáncer colorectal, cáncer de mama, y leucemia, incluyendo leucemia linfocítica aguda. Los cánceres preferidos son cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de mama, y carcinoma hepatocelular Asiático.

Como se usa anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, los términos siguientes, salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que tienen los significados siguientes:

Un "vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente" es un medio generalmente aceptado en la técnica para el suministro de agentes activos biológicamente a mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

"Sales aceptables farmacéuticamente" o "una sal aceptable farmacéuticamente" se refiere a la sal o sales inorgánica u orgánica, relativamente no tóxica, de un compuesto de la presente invención.

"Cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de la presente invención o composición farmacéutica que contiene un compuesto, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de la presente invención que provoca la respuesta biológica o médica, o el efecto terapéutico deseado, sobre un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor médico u otro clínico.

Los términos "tratamiento", "tratar", "trato", y similares, se entiende que incluyen el retraso o reversión de la progresión de un trastorno. Estos términos incluyen también el alivio, mejora, atenuación, eliminación o reducción de uno o más síntomas de un trastorno o estado, incluso si el trastorno o estado no está realmente eliminado e incluso si la progresión del trastorno o estado no está el mismo retrasado o revertido.

Un compuesto de la presente invención es capaz de reacción, por ejemplo, con un cierto número de ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar sales aceptables farmacéuticamente. Dichas sales aceptables farmacéuticamente y la metodología común para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, y otros, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, y otros, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 66, No. 1, Enero 1977.

Un compuesto de la presente invención está preferiblemente formulado como una composición farmacéutica que usa un vehículo, diluyente, o excipiente aceptables farmacéuticamente y administrado mediante una diversidad de vías. Preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones y procedimientos farmacéuticos para la preparación de los mismos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro y otros, eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).

La cantidad de un compuesto de la presente invención realmente administrada estará determinada por un médico bajo las circunstancias relevantes, incluyendo el estado a tratar, la vía elegida de administración, el compuesto real de la presente invención administrado, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones por día normalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente 50 a 1000 mg por día, preferiblemente 80 a 600 mg por día, lo más preferiblemente 300 mg por día. En algunos casos, niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado pueden ser más que adecuados, en tanto que en otros casos pueden usarse dosis aún mayores. Los niveles de dosificación pueden ser fácilmente determinados por un experto en la técnica.

Un compuesto de la presente invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, puede prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, así como también los descritos en las Preparaciones y Ejemplos más adelante. Las etapas de síntesis específicas de cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes formas para preparar un compuesto de la invención, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

Los reactivos y materiales de partida están generalmente fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica. Otros pueden hacerse mediante técnicas convencionales de química orgánica y heterocíclica, técnicas las cuales son conocidas para un experto normal en la técnica, y los procedimientos descritos en los Ejemplos que siguen a continuación que incluyen cualquier nuevo procedimiento. Las Preparaciones y Ejemplos que siguen ilustran adicio-

nalmente la invención. Salvo que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente invención se han denominado y numerado usando la IUPACNAME ACDLABS.

Los isómeros, enantiómeros, o diastereómeros individuales pueden separarse o resolverse por un técnico normal en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos, mediante procedimientos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions* (J. Jacques, y otros, John Wiley and Sons, Inc., 1981)).

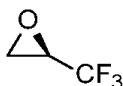
El técnico experto comprenderá que un compuesto de la presente invención contiene al menos un centro quiral. La presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como las mezclas de enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos, incluyendo racematos. Se prefiere que un compuesto de la presente invención exista como un enantiómero o diastereómero individual. El enantiómero o diastereómero individual puede prepararse empezando con reactivos quirales o mediante estereoselectividad o técnicas de síntesis estereoespecíficas. Como alternativa, el enantiómero o diastereómero individual puede aislarse a partir de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatográficas quirales convencionales.

Un compuesto de la presente invención puede prepararse de acuerdo con procedimientos de síntesis bien conocidos y apreciados en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estas reacciones son bien conocidas en la técnica y las sustituciones apropiadas de disolventes y co-reactivos entran dentro de la experiencia de la técnica. Igualmente, los expertos en la técnica comprenderán que pueden aislarse y/o purificarse compuestos intermedios de síntesis mediante diversas técnicas bien conocidas, según sea lo necesario o deseado, y que frecuentemente, será posible usar diversos compuestos intermedios directamente en etapas de síntesis posteriores, con poca o nula purificación. Además, el técnico experto comprenderá que, en algunas circunstancias, no es crítico el orden en el cual se introducen los restos. El orden particular de etapas requerido para producir un compuesto de la presente invención depende del compuesto particular a sintetizar, del compuesto de partida, y del riesgo relativo de los restos substituidos, como comprenderá el químico experto. Todos los substituyentes, salvo que se indique lo contrario, son como previamente se han definido, y todos los reactivos son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

Como se usa en la presente invención, los términos siguientes tienen los significados indicados: "ATP" se refiere 5'-trifosfato de adenosina; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "DMSO" se refiere a dimetil sulfóxido; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "EGTA" se refiere a ácido etileno glicol tetraacético; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "GFP" se refiere a proteína fluorescente verde; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperacino-1-etanosulfónico; "HWB" se refiere a sangre entera humana; "IC<sub>50</sub>" se refiere a la concentración del compuesto que reduce una respuesta dada (unión de ligando o respuesta de enzima) al 50%; "IC<sub>50</sub> relativo" se refiere a la concentración relativa que da la mitad de la respuesta máxima de los compuestos; "IVTI" se refiere a la inhibición diana *in vivo*; "JAK" se refiere a la Janus quinasa; "MS" se refiere a espectroscopía de masa; "RMN" se refiere a resonancia magnética nuclear; "NSCLC" se refiere a cáncer de pulmón de célula no pequeña; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "RNasa" se refiere a ribonucleasa; "TA" se refiere a temperatura ambiente; "SCLC" se refiere a cáncer de pulmón de célula pequeña; "STAT" se refiere a transductores de señal y activadores de transcripción; "TED" se refiere a dosis eficaz umbral; "TR-FRET" se refiere a transferencia de energía de resonancia por fluorescencia de resolución tardía.

### Preparación 1

(2R)-2-(trifluorometil)oxirano

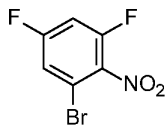


Agregar ácido acético (0,89 ml, 0,052 equiv.) a una solución de (1S,2S)-(+)-1,2-ciclohexanodiamino-N,N'-bis(3,5-di-*t*-butilsalicilideno)cobalto(II) (0,90 g, 0,0050 equiv.) en tolueno (16,65 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Eliminar el disolvente en vacío. Agregar tolueno (20 ml) y concentrar en vacío. Enfriar a 0°C y agregar 2-(trifluorometil)oxirano (37,00 g, 330 mmol, 80,0% ee, (2R) es el enantiómero principal). Agitar durante cinco minutos y agregar agua (0,80 ml, 0,15 equiv.) gota a gota. Dejar calentar lentamente a temperatura ambiente y agitar durante una noche. Destilar en vacío a temperatura ambiente, recoger el compuesto del epígrafe en un matraz enfriado en forma de un aceite de color amarillo (28,10 g, 76%; 99,8% ee). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,92-2,94 (m, 1H), 2,98-3,01 (m, 1H), 3,41-3,46 (m, 1H).

Combinar el compuesto del epígrafe (0,13 g, 1,16 mmol) y metanol (1,3 ml). Enfriar a 0°C y agregar trietilamina 0,17 ml, 1,10 equiv.) y tiofenol (0,12 ml, 1,05 equiv.). Agitar durante 30 minutos. La GCMS de una parte alícuota muestra formación de 1,1,1-trifluoro-3-fenilsulfanil-propan-2-ol (procedente de la apertura de anillo del compuesto del epígrafe), *m/z* = 222. La LC-MS quiral muestra 99,8% ee, (2S)-1,1,1-trifluoro-3-fenilsulfanil-propan-2-ol es el enantiómero principal.

**Preparación 2**

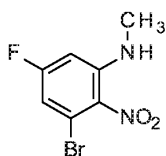
1-bromo-3,5-difluoro-2-nitrobenzeno



- 5 Agregar ácido nítrico (fumante, 20 ml) gota a gota a una solución de 1-bromo-3,5-difluorobenceno (35,00 ml, 304 mmol) en ácido sulfúrico (50 ml) a 0°C. Dejar calentar lentamente a temperatura ambiente y agitar durante una noche. Verter la mezcla de reacción dentro de una mezcla de hielo y agua (600 ml). Dejar calentar a temperatura ambiente. Agregar acetato de etilo (200 ml) y hexanos (100 ml). Agitar hasta que los sólidos se disuelvan. Separar las capas. Lavar los compuestos orgánicos con cloruro sódico acuoso saturado, secar sobre sulfato sódico anhidro, filtrar, y concentrar en vacío, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color amarillo (57,37, 79%). GCMS  $m/z = 237,239$  (Br).

10 **Preparación 3**

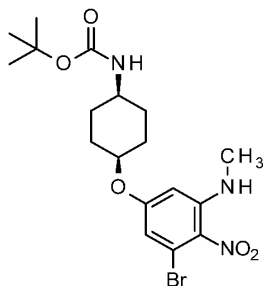
3-bromo-5-fluoro-N-metil-2-nitroanilina



- 15 Agregar monometilamina 2 M en tetrahidrofurano (92 ml, 2,00 equiv.) a una solución de 1-bromo-3,5-difluoro-2-nitrobenzeno (21,90 g, 92 mmol) en 1,4-dioxano (92 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Agregar agua y extraer con acetato de etilo. Lavar los compuestos orgánicos con cloruro sódico acuoso saturado, secar sobre sulfato sódico anhidro, filtrar, y concentrar en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente de cloruro de metileno al 2040% en hexanos, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color naranja (16,95 g, 74%). MS (ES)  $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 249/251$  (M+H).

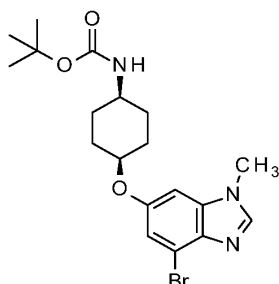
**Preparación 4**

- 20 {*cis*-4-[3-bromo-5-(metilamino)-4-nitrofenoxi]ciclohexil}carbamato de *terc*-butilo



- 25 Combinar 3-bromo-5-fluoro-N-metil-2-nitroanilina (75,04 g, 301 mmol), (*cis*-4-hidroxiciclohexil)carbamato de *terc*-butilo (89,52 g, 1,38 equiv.), y bisulfato de tetra(n-butil)amonio (15,58 g, 0,15 equiv.) en diclorometano (975 ml) e hidróxido sódico acuoso 5 M (241 ml). Agitar rápidamente a 37°C bajo nitrógeno durante cinco días. Enfriar a temperatura ambiente. Diluir con diclorometano (200 ml) y agua (400 ml). Separar las capas. Extraer con diclorometano (3 x 100 ml). Lavar los compuestos orgánicos combinados con cloruro sódico acuoso saturado, secar sobre sulfato sódico anhidro, filtrar, y concentrar en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-40% en hexanos, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color naranja (68,57 g, 51%). MS (ES)  $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 442/444$  (M-H).

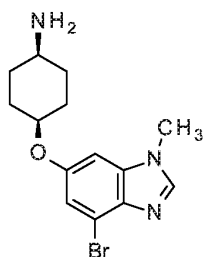
30 **Preparación 5**{*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}carbamato de *terc*-butilo



- Combinar {*cis*-4-[3-bromo-5-(metilamino)-4-nitrofenoxi]ciclohexil}carbamato de *terc*-butilo (76,92 g, 173 mmol) y platino al 5% sobre carbono (sulfurado, 3,85 g) en tetrahidrofurano (932 ml) en un reactor Parr. Agitar a temperatura ambiente bajo 414 kPa de hidrógeno durante tres días. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Lavar con tetrahidrofurano. Agregar ortoformiato de trimetilo (165 ml, 8,70 equiv.) a los filtrados de tetrahidrofurano combinados. Agitar durante 22 horas a 63°C. Concentrar la mayor parte de la mezcla de reacción en vacío. Diluir con agua (400 ml) y acetato de etilo (400 ml). Basificar con carbonato sódico acuoso para ajustar el pH a 9. Separar las capas. Extraer la capa acuosa con acetato de etilo (2 X 200 ML). Secar los compuestos orgánicos combinados sobre sulfato sódico anhidro, filtrar, y concentrar en vacío. Diluir con metil *terc*-butil éter (400 ml) y tratar con ultrasonidos durante 30 minutos. Filtrar, lavar con metil *terc*-butil éter, y secar bajo vacío para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color pardo claro (52,02 g, 71%). MS (ES)  $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 424/426 (M+H)$ .

### Preparación 6

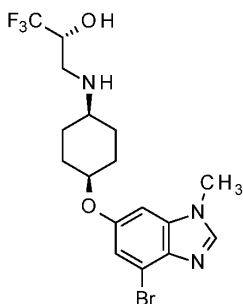
{*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexanamina



- Agregar ácido trifluoroacético (666 ml) lentamente mediante embudo de adición a una solución de {*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}carbamato de *terc*-butilo (222 g, 497 mmol) en diclorometano (1110 ml) a 0°C. Dejar calentar lentamente a temperatura ambiente y agitar durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción en vacío. Agregar agua (250 ml) y basificar con hidróxido sódico acuoso al 50% para ajustar a pH 10. Agregar agua (250 ml). Extraer con metanol al 20% en diclorometano (1500 ml, a continuación 500 ml, a continuación 250 ml). Lavar los compuestos orgánicos combinados con hidróxido sódico acuoso 2 M, secar sobre sulfato magnésico anhidro, filtrar, y concentrar, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color pardo (155 g, 91%). MS (ES)  $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 324/326 (M+H)$ .

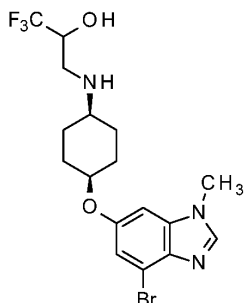
### Preparación 7

(2R)-3-({*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol



- Agregar (2R)-2-(trifluorometil)oxirano (73,29 g, 1,50 equiv.) a una solución de *cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexanamina (150,4 g, 436 mmol) en metanol (1053 ml). Agitar a temperatura ambiente durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con gradiente de etanol al 0-10% en diclorometano, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido blanquecino (98,10 g, 52%). MS (ES)  $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 436/438 (M+H)$ .

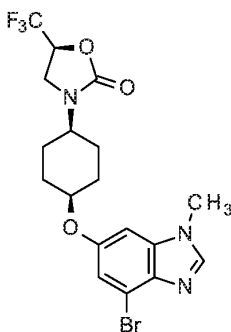


**Preparación 8**3-({*cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol

- 5 Agregar 2-(trifluorometil)oxirano (2,13 ml, 1,02 equiv.; 80,0% ee, (2R) es el enantiómero principal) a una solución de *cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexanamina (7,90 g, 24,37 mmol) en isopropanol (130 ml). Calentar a 70°C durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente por etapas desde 100% de acetato de etilo a 2,5% a 5% a 7,5% a 10% de metanol en acetato de etilo, para proporcionar el compuesto del epígrafe (7,86 g, 74%). MS (ES)  $m/z$  = ( $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ) 436/438 (M+H).

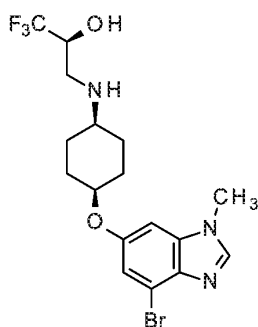
**Preparación 9**

- 10 (5S)-3-({*cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona



- 15 Combinar 3-({*cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (3,34 g, 7,66 mmol, 80% ee, (2R) es el enantiómero principal), 1,1'-carbonildiimidazol (2,48 g, 2,00 equiv.), y 4-dimetilaminopiridina (0,094 g, 0,10 equiv.) en diclorometano (38,3 ml). Agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal con un gradiente de 0-5% de metanol en diclorometano, para proporcionar 3-({*cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona (3,28 g, 80% ee, (5R) es el enantiómero principal).

- 20 Separar lo anterior con las condiciones de cromatografía quiral siguientes para proporcionar el compuesto del epígrafe (0,32 g, 9%). MS (ES)  $m/z$  = ( $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ) 462/464 (M+H). Enantiómero 1, >99% ee, 75%/25% CO<sub>2</sub>/MeOH, 5 ml/min, 4,6 x 150 mm, Chiralpak, AD-H.

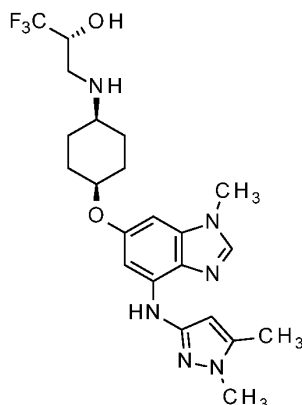
**Preparación 10**(2S)-3-({*cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol

- 25 Combinar (5S)-3-({*cis*-4[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona (0,32 g, 0,69 mmol) trimetilsilanolato potásico (0,36 g, 4,00 equiv.) en tetrahidrofurano (7 ml). Agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante seis días. Diluir con agua. Filtrar, lavar con agua, y secar bajo vacío para propor-

cionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco (0,22 g, 73%). MS (ES)  $m/z$  = ( $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ) 436/438 (M+H).

### Ejemplo 1

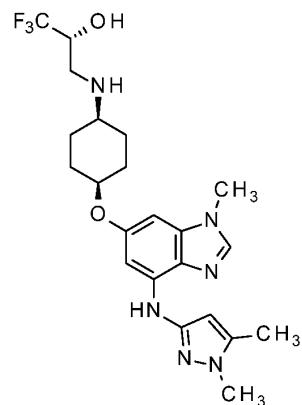
5 (2R)-3-[[*cis*-4-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino)-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil]amino}-1,1,1-trifluoropropan-2-ol



10 Combinar (2R)-3-((*cis*-4-(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (0,20 g, 0,46 mmol), 1,5-dimetilpirazol-3-amina (0,056 g, 1,1 equiv.), carbonato potásico (0,158 g, 2,5 equiv.), 2-(di-*tert*-butilfosfino)-2',4',6'-trisisopropil-3,6-dimetoxi-1,1'-bifenilo (0,046 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (0,042 g, 0,10 equiv.), y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *tert*-butílico (5 ml). Sellar con una tapa rebordeada. Calentar en un reactor de microondas a 120°C durante 45 minutos. Concentrar la mezcla de reacción en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente por etapas desde acetato de etilo al 100% a 1% a 2,5% a 5% de metanol en acetato de etilo, para proporcionar el compuesto del epígrafe (0,071 g, 33%). MS  $m/z$  = 467 (M+H).

### 15 Ejemplo Alternativo 1

(2R)-3-[[*cis*-4-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino)-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi]ciclohexil]amino}-1,1,1-trifluoropropan-2-ol



20 Combinar (2R)-3-[[*cis*-4-((4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (50 g, 115 mmol), 1,5-dimetilpirazol-3-amina (18,25 g, 1,43 equiv.), y carbonato potásico (50 g, 3,16 equiv.) en 2-metilbutan-2-ol (400 ml). Agitar y desgasificar con una instalación de nitrógeno burbujeante durante 15 minutos. Agregar 2-(diciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenilo (2,20 g, 0,034 equiv.) y tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (1,60 g, 0,015 equiv.). Agitar y desgasificar con una instalación de nitrógeno burbujeante durante 5 minutos. Agregar ácido acético (3 ml). Calentar a reflujo bajo nitrógeno durante veinte horas. Agregar 2-(diciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenilo (1,10 g, 0,017 equiv.) y tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (0,80 g, 0,0075 equiv.). Calentar a reflujo bajo nitrógeno durante tres horas. Concentrar la mezcla de reacción en vacío. Diluir con agua (500 ml). Acidificar con ácido clorhídrico acuoso al 35% hasta ajustar a pH 1. Agregar acetato de etilo (100 ml) y agitar durante cinco minutos. Tratar la mezcla de reacción con carbón activado (5 g) y filtrar a través de tierra de diatomeas. Separar las capas y descartar los compuestos orgánicos. Basificar la capa acuosa con hidróxido amónico acuoso al 30% p/p hasta ajustar a pH 10. Filtrar para obtener un sólido. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con amoníaco 2 M/metanol al 10% en diclorometano, para obtener el compuesto del epígrafe (52 g, 95%). MS  $m/z$  = 487 (M+H).

25

30

**Segundo Ejemplo Alternativo 1**

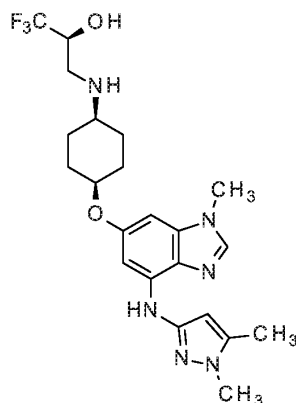
(2R)-3-[[*cis*-4-({4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol, Forma Cristalina I

5 A. Disolver una porción del producto de cromatografía de fase normal del Ejemplo Alternativo 1 (1,60 g) en acetona:agua 9:1 (45 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos y agregar SiliaBond® DMT (0,42 g). Filtrar después de cinco horas a temperatura ambiente. Concentrar el filtrado para eliminar toda la acetona y, a continuación, diluir con agua (10 ml). Filtrar y secar bajo vacío para proporcionar material cristalino (1,37 g). MS (ES)  $m/z = 467$  (M+H).

10 B. Formar una suspensión del producto de cromatografía de fase normal del Ejemplo Alternativo 1 (47,0 g) en isopropanol (1,15 litros). Calentar la mezcla a reflujo para obtener una solución. Agregar carbono cristalino (6 g). Después de una hora a reflujo, filtrar a través de tierra de diatomeas. Lavar con isopropanol (50 ml) y sembrar el filtrado con material cristalino procedente de la Subsección A como se ha suministrado anteriormente (0,20 g, en porciones). Agitar y dejar enfriar a temperatura ambiente durante dos horas. Filtrar y secar bajo vacío para proporcionar material cristalino (37,8 g). MS (ES)  $m/z = 467$  (M+H).

**Ejemplo 2**

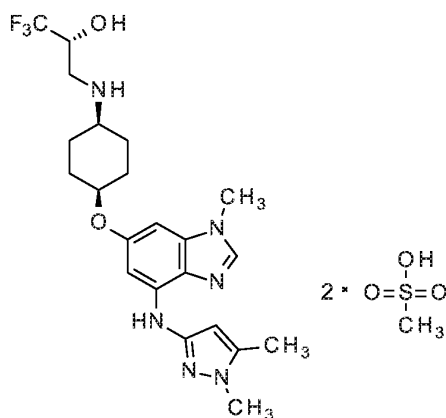
(2S)-3-[[*cis*-4-({4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol



20 Combinar (2S)-3-[[*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoro-propan-2-ol (0,077 g, 0,18 mmol), 1,5-dimetilpirazol-3-amina (0,030 g, 1,45 equiv.), carbonato potásico (0,060 g, 2,46 equiv.), 2-(di-*tert*-butilfosfina)-2',4',6'-triisopropil-3,6-dimetoxi-1,1'-bifenilo (0,022 g, 0,25 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)-dipaladio(0) (0,0080 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *tert*-butílico (2,5 ml). Sellar con una tapa rebordeada. Calentar a 95°C durante una noche. Diluir con acetato de etilo y filtrar a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado en vacío. Purificar mediante cromatografía de fase normal, eluyendo con gradiente B al 5-100% (A: diclorometano; B: metanol amoniacado 0,75M al 15% en diclorometano). Purificar adicionalmente mediante cromatografía de fase inversa, eluyendo con gradiente B al 5-100% (A: bicarbonato amónico acuoso 10 nM con metanol al 10%; B: acetonitrilo). Concentrar las fracciones limpias a partir de etanol y, a continuación, nuevamente a partir de diclorometano, para obtener el compuesto del epigrafe (0,054 g, 65%). MS (ES)  $m/z = 467$  (M+H).

**Ejemplo 3**

30 (2R)-3-[[*cis*-4-({4-[(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-bencimidazol-6-il)oxi)ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol; ácido dimetano sulfónico



5 Combinar (2R)-3-[(1S)-4-((1S)-1-(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)amino)-1-metil-1H-bencimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (1,00 g, 2,15 mmol) y acetona (35 ml). Calentar a 51 °C y agregar una solución de ácido metanosulfónico (0,30 ml, 2,10 equiv.) en acetona (5 ml) gota gota. Agitar a 51°C durante una hora y, a continuación, enfriar a temperatura ambiente. Filtrar el sólido resultante y secar en estufa de vacío a 70°C durante una noche para obtener el compuesto del epígrafe (1,25 g, 88%).

### Difracción de polvo por rayos X

10 Obtener los patrones de XRD de sólidos cristalinos sobre un difractor de polvo por rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ ) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. Escanear la muestra entre 4° y 40° en 2 $\theta$ , con un tamaño de etapa de 0,009° en 2 $\theta$  y una velocidad de escaneado de 0,5 segundos/etapa, y con 0,6 mm de divergencia, 5,28 anti-dispersor fijo, y 9,5 mm de rendija del detector. Empaquetar el polvo seco sobre un soporte de muestras de cuarzo y obtener una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Recoger los patrones de difracción a temperatura y humedad relativa ambiente. Es bien sabido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación resultante de factores tales como morfología del cristal y hábito. En los casos en que los efectos de la orientación preferida están presentes, las intensidades de los picos está alteradas, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo están sin cambiar. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, págs. 1843-1844, (1995). Además, es bien sabido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma de cristal dada las posiciones del pico angular pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones del pico pueden modificarse debido a una variación en la temperatura o la humedad a la cual la muestra se está analizando, a desplazamiento de la muestra, o a la presencia o ausencia de un patrón interno. En el caso presente, una variabilidad de la posición del pico de  $\pm 0,2^\circ$  en 2 $\theta$  explicaría estas variaciones potenciales sin impedimentos de la identificación inequívoca de la forma del cristal indicado. La confirmación de una forma de cristal puede hacerse en base a cualquier combinación singular de picos distintivos (en unidades de ° 2 $\theta$ ), típicamente los picos más prominentes. Ajustar los patrones de difracción de formas del cristal, recogidos a temperatura y humedad relativa ambiente, en base a los picos patrón NIST 675 a 8,853° y 26,774° 2 $\theta$ .

30 Caracterizar una muestra preparada del compuesto del Segundo Ejemplo Alternativo 1 mediante un patrón de XRD usando radiación CuK $\alpha$  que tiene los picos de difracción (valores 2 $\theta$ ) descritos en la Tabla 1 a continuación, y en particular que tienen picos a 19,5° en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 11,9°, 15,4°, y 17,6°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2°.

**Tabla 1:** Picos de difracción de polvo por rayos X del Segundo Ejemplo Alternativo 1

Pico	Angulo (°2-Teta) $\pm 0,2^\circ$	Intensidad relativa (% del pico el más intenso)
1	6,4	17,0%
2	11,9	46,6%
3	14,7	11,7%
4	15,4	41,9%
5	16,2	27,5%
6	16,9	24,9%
7	17,6	40,1%

**Tabla 1 (Cont.)**

Pico	Angulo ( $^{\circ}$ 2-Teta) $\pm 0,2^{\circ}$	Intensidad relativa (% del pico el más intenso)
8	19,5	100,0%
9	20,8	32,1%
10	21,5	19,6%

5 Caracterizar una muestra preparada del compuesto del Ejemplo 3 mediante un patrón de XRD usando radiación CuK $\alpha$  que tengan picos de difracción (valores  $2\theta$ ) como se describe en la Tabla 2 a continuación, y en particular que tengan picos a  $21,7^{\circ}$  en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en  $21,2^{\circ}$ ,  $18,0^{\circ}$ , y  $15,7^{\circ}$ ; con una tolerancia para los ángulos de difracción de  $0,2^{\circ}$ .

**Tabla 2:** Picos de difracción de polvo por rayos X del Ejemplo 3

Pico	Angulo ( $^{\circ}$ 2-Teta) $\pm 0,2^{\circ}$	Intensidad relativa (% del pico el más intenso)
1	5,6	26,2%
2	10,0	25,7%
3	13,1	28,7%
4	15,7	70,0%
5	18,0	90,5%
6	19,6	64,5%
7	20,6	41,8%
8	21,2	99,3%
9	21,7	100,0%
10	22,3	59,9%

### **Ensayos de enzima *in vitro* de las JAK1, JAK2 y JAK3**

10 Se usó el ensayo quinasa JAK LanthaScreen™ (Invitrogen) para determinar la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la actividad de las JAK1, JAK2 y JAK3 quinastas. Estos son formatos de ensayos TR-FRET que usan anticuerpo marcado con terbio de efecto prolongado como las especies donantes y GFP-STAT1 como las especiesceptoras. Usar la relación TR-FRET para monitorizar la actividad JAK quinasa cuando un incremento en la fosforilación de la GFP-STAT1 da como resultado un incremento en la relación TR-FRET. Realizar la reacción

15 quinasa usando un volumen de reacción de 12,5  $\mu$ l en una Proxiplate de 384 pocillos negra poco profunda. Agregar reactivos para obtener las condiciones de reacción finales de 50 ml de HEPES pH, Triton X-100 1,76 mM, ensayos de enzima ATP (20,0  $\mu$ M para JAK1 y JAK3 o 5  $\mu$ M para JAK2), MgCl<sub>2</sub> 10,0 mM, EGTA 1 mM y 0,01% de Brij-35, GFP-STAT1 0,05 mM, enzima JAK1 14 nM para JAK1, 1,0 nM para JAK2 o 2,5 nM para ensayos de enzima JAK3, y 4% de DMSO en diluciones en serie del compuesto de ensayo (diluido 1:3 desde 20.000 hasta 1 nM). Después de la

20 adición de ATP/GFP-STAT1, centrifugar las placas de ensayo durante 1 minuto a 1000 revoluciones por minuto (RPM). Dejar las placas incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos y, a continuación, agregar 12,5  $\mu$ l de un Tampón de parada conteniendo EDTA 20 mM, Transductores de Señal y Activadores de Transcripción de terbio-anti-fosforilado [fosforilación de aminoácido Tyrosine 701] (Tb-anti-pSTAT1[pTyr701]) 2 nM, hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminoetano (Trizma®) pH 7,5 0,67 mM, 0,02% de NaN<sub>3</sub> y 0,01% de nonilfenilpolietileno glicol (Nonidet® P40). Incubar a temperatura ambiente durante 90 minutos y leer en un lector de placa EnVision con filtro de

25 excitación a 340 nm de longitud de onda y filtros de emisión de 520 nm y 495 nm de longitudes de onda. Deducir la relación de la longitud de onda de emisión para la GFP-STAT1 medida a 520 nm frente a la emisión a 405 nm para la (Tb-anti-pSTAT1[pTyr701]). Deducir el valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto usando datos del porcentaje de inhibición calculados a partir de los datos de reacción referentes a controles en placa (enzima activa frente enzima inhibida a 2,0 mM con tofacitinib). Usar ACTIVITYBASE 4.0 para ajustar el porcentaje de inhibición y los datos de diez puntos de

30 concentración de compuesto a una ecuación logística de cuatro parámetros.

En este ensayo, se ensayó un compuesto dentro del ámbito de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC<sub>50</sub> de la JAK1 de  $4,0 \pm 0,8$  nM (n=6), un IC<sub>50</sub> de la JAK2 de

557 ± 337 nM (n=6), y un IC<sub>50</sub> de la JAK3 de 1910 ± 786 nM (n=6). Los resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la enzima de la JAK1 *in vitro*. Igualmente, estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 es un inhibidor más potente de la enzima de la JAK1 y selectivo sobre la JAK2 y JAK3 *in vitro*.

#### Ensayo de proliferación del clon 12 del mutante BaF3 de la JAK1 (S729C)

- 5 El propósito de este ensayo es determinar la actividad inhibidora de inhibidores específicos de la JAK1 usando el ensayo de proliferación del clon 12 del mutante BaF3 de la JAK1 (S729C).

Se creó la línea de células que expresan el mtJAK1 (S729C) mediante transducción de células Ba/F3 (células pro-B müridas) con un retrovirus que expresa el ADN vector mJAK1 (S729C)-pQCXIN humano. La clonación unicelular se realizó para seleccionar las células Ba/F3 que expresan los más altos niveles de mtJAK1 (S729C) mediante dilución en serie. Las células de suspensión del mutante BaF3 de la JAK-1 (S729C) se cultivaron y mantuvieron en Gibco RPMI 1640 (cat# A10491-01) conteniendo 10% de Hi-FBS (Hyclone cat# 10082-047), 1 µg/ml de dihidrocloruro de puromicina (Sigma cat# 9620), 1,0 mg/ml de sulfato de G418 (Corning ref# 30-234-CI), referido como R10+ de aquí en adelante.

Los ensayos de proliferación se realizaron en medio de cultivo sin selección y, de aquí en adelante, se referirán como (R10-). En resumen, las células cultivadas se decantaron, centrifugaron y reconstituyeron en 10 ml de R10- y se contaron usando un Beckman Coulter Vi-Cell. Las células se diluyeron posteriormente a 2e4/ml en R10- y se sembraron en unas placas de ensayo opacas blancas de 96 pocillos (Costar cat# 3610) a 1x10<sup>3</sup> células (50 µl) por pocillo. En las placas de polipropileno de 96 pocillos correspondientes, los compuestos de ensayo se diluyeron en 100% de DMSO seguido de una dilución adicional en R10- para proporcionar un molde de compuesto de ensayo 2X. Los compuestos de ensayo diluidos se agregaron a la placa de células correspondiente para proporcionar un CRC de desde 20 µM hasta 0,001 µM. Los controles de máximo y mínimo se incluyeron sobre cada placa. Se usó staurosporina (1 µM final) para el control de mínimo y R10- conteniendo niveles de DMSO equivalentes como el CRC se usó como el control de máximo. Las placas se recubrieron con tapas de evaporación Microcline llenas de agua (car# LLS-0310) y se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 días. Después de incubación durante 3 días, las placas se retiraron de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez enfriadas, las placas se revelaron mediante la adición de 100 µl de Cell Titer Glo (Promega cat# G7571), mezclando 2 minutos sobre un mezclador de placas e incubación durante un tiempo adicional de 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez enfriadas, las placas se revelaron mediante la adición de 100 µl de Cell Titer Glo (Promega cat# G7571), mezclando 2 minutos sobre un mezclador de placa e incubación durante un tiempo adicional de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la lectura se leyó sobre un Perkin Elmer Victor2 usando un programa preestablecido para luminiscencia a 0,1 segundos. Las curvas de IC<sub>50</sub> se generaron usando un programa STATS TMAG interno y GraphPad Prisma versión 4.03.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC<sub>50</sub> de 956 nM ± 217 nM (n=4). El resultado muestra que el compuesto del Ejemplo 1 es un agente activo contra la expresión de mtJAK1 (S729C) en células Ba/F3.

#### Protocolo AlphaScreen SureFire para ensayo de células p-STAT3-(p-Tyr705)-IL6-TF-1-JAK1

Se usó el ensayo a base de células JAK1 descrito a continuación para determinar la potencia celular de la JAK1 de los compuestos de ensayo.

Preparación de células:

40 Dejar de alimentar células TF-1 en medio DMEM con 0,5% de 26400 (FBS) y 1X Pen/Strep a 37°C. Sembrar 100K de células por pocillo en placas negras de 96 pocillos BD con fondos transparentes. Mantener las placas a temperatura ambiente durante 30-60 minutos antes de incubación durante una noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Contar las células usando un contador Vi-Cell, usando una suspensión de células a 100 células/ml y sembrar 100 µl/pocillo en placas Beckman Dickinson Biocoat (catálogo # 354640).

45 Preparación y tratamiento del compuesto de ensayo:

Preparar compuestos en diluciones en serie 1:3 en DMSO y además diluir en el medio. Ensayar compuestos en un intervalo de concentraciones de 10 puntos desde 20.000 a 1 nM. Agregar compuesto diluido a las placas de células correspondientes. Incubar las placas a 37°C durante 20 minutos. Agregar solución IL6 a la concentración final de 30 ng/ml a las placas de células correspondientes y continuar incubando a 37°C durante 30 minutos. Retirar el medio y agregar 50 µl de 1X tampón de lisis a cada pocillo.

Detección de pSTAT3:

Realizar las etapas siguientes secuencialmente: formar la mezcla aceptora (tampón de activación/tampón de reacción/esférulas aceptoras); transferir 4 µl de lisato procedente de placas de 96 pocillos a Proxiplates de 384 pocillos; agregar 5 µl de mezcla aceptora a la placa(s) Proxiplate de 384 pocillos y sellar las placas con cierre de aluminio; 55 agitar durante 1-2 minutos sobre agitador de placas; incubar la placa a temperatura ambiente durante 2 horas con

agitaciones suaves; formar la mezcla donante (esférulas donantes en tampón de dilución); agregar 2 µl de mezcla donante a las placas de ensayo; sellar las placas con cierre de aluminio; sacudir durante 1-2 minutos sobre el agitador de placas; incubar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitaciones suaves; leer la placa con Envision; protocolo AlphaScreen Surefire 384.

- 5 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC<sub>50</sub> de 87 nM ± 75 nM (n=10). Este resultado muestra que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la enzima de JAK1 en un ensayo a base de células.

#### **Protocolo ACUMEN para ensayo de células phospho-STAT3 (Tyr705)-H1975-JAK1**

- 10 Se usó un ensayo celular H1975-JAK1 para confirmar la potencia de los compuestos de ensayo en células NSCLC en las cuales la vía STAT3 está activada por el ciclo IL-6 autocrino.

Preparación de células:

- 15 Realizar las etapas siguientes secuencialmente: examinar las células bajo el microscopio; retirar por aspiración el medio de las células con una pipeta aspiradora estéril; lavar las células con aproximadamente 5 ml de PBS; retirar por aspiración la PBS con una pipeta aspiradora estéril; agregar 5 ml de Tripsina-EDTA al 0,25% a un matraz de 150 cm<sup>2</sup>; mover suavemente el matraz para cubrir las células con tripsina y dejar reposar en la cabina durante 3 minutos o colocar el matraz en una incubadora durante 3 minutos para desprender las células del matraz; agitar el matraz unos pocos minutos para asegurar que las células se han desprendido; agregar 10 ml de medio de crecimiento al matraz, dispensar suavemente la suspensión sobre el lado del matraz con el medio de crecimiento y separar mediante pipeteado arriba y abajo para triturar las células; centrifugar (1300 rpm, 5 minutos), resuspender en 10 ml de medio de crecimiento; filtrar a través de un filtrador de células (BD Falcon 352350, filtrador de células de 70 µm); recoger las células en un tubo cónico estéril de 50 ml; contar las células usando un contador Vi-Cell (0,5 ml de células).

- 25 Día 1: Sembrar 30.000 células por pocillo en placas negras de 96 pocillos BD con fondos transparentes. Contar las células usando un contador Vi-Cell, usar una suspensión de células a una concentración de 30.000 células/ml y sembrar 100 µl/pocillo en placas Beckman Dickinson Biocoat Catálogo # 354640. Mantener las placas a temperatura ambiente durante 30-60 minutos antes de introducir las dentro de la incubadora. A continuación, incubar durante una noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Preparación y tratamiento del compuesto:

- 30 Preparar una placa de pocillos profundos conteniendo 1 ml de medio sin FBS con 0,6% de DMSO, a continuación, agregar 2 µl de compuesto (solución DMSO 10 mM), formando una placa madre de 20 µM. Realizar diluciones en serie 1:3 de los compuestos en medio sin FBS con 0,6% de DMSO en las placas de dilución. Ensayar los compuestos en un intervalo de concentraciones de 10 puntos desde 20 µM a 1 nM. Retirar el medio procedente de las placas de ensayo con células. Transferir 100 µl de compuestos de la placa de dilución a las placas de ensayo (placas Beckman Dickinson Biocoat Catálogo # 354640) conteniendo la célula unida con 100 µl de medio, y usar el programa TEMO: SAMPLE TRANSFER CELL BASES ASSAY from 3797 slow dispense.gem. A continuación, incubar las células durante 4 horas a 37°C.

Detección de pSTAT3:

- 40 Día 1: realizar las etapas siguientes secuencialmente: separar el medio; agregar 100 µl de para-formaldehído al 3,7%; incubar durante 30 minutos en la oscuridad; lavar con 100 µl de PBS; agregar 100 µl de metanol frío; incubar 15 minutos en la oscuridad; lavar 2 veces con 100 µl de PBS; agregar 100 µl de solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS); incubar durante 30 minutos en la oscuridad; agregar 50 µl de anticuerpo primario pSTAT3 1:500 (en solución de bloqueo: BSA al 1%; Anti-phospho-STAT3(Tyr705 de ratón)); sellar las placas con lámina de aluminio e incubar a 4°C con agitación suave durante una noche.

- 45 Día 2: realizar las etapas siguientes secuencialmente: lavar 2 veces con 100 µl de PBS; agregar 50 µl de anticuerpo secundario (1:1000; IgG anti-ratón de cabra Ab2°); incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad; lavar 2 veces con 100 µl de PBS; agregar 100 µl de yoduro de propidio (1:1000 en PBS a partir de solución comercial) conteniendo ARNasa (50 µg/ml en PBS); sellar las placas con película transparente e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas antes de la lectura; leer sobre Acumen Explorer (fijar parámetro en base a pocillo positivo y negativo). Laser (Scan 1) 488 nm.

- 50 Procesamiento de datos:

Procesamiento de datos mediante Activity Base y análisis usando una ecuación logística no lineal de 4 parámetros (curva concentración-respuesta logística de 4 parámetros):

$$Y = \text{inf} + [(\text{sup} - \text{inf}) / (1 + (x / \text{IC}_{50})^{\text{pendiente}})]$$

en donde Y = % de inhibición, X = rendimiento de concentración a y% de inhibición, Inferior = valor mínimo de y alcanzado por la curva, Superior = valor máximo de y alcanzado por la curva y Pendiente = inclinación de la curva a IC<sub>50</sub>.

$$\% \text{ Inhib} = [(Max \text{ mediana} - x/Max \text{ mediana} - Min \text{ mediana}) \cdot 100]$$

- 5 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC<sub>50</sub> de 297 nM (n=1). El resultado muestra que el compuesto del Ejemplo 1 es activo contra la JAK1 en células NSCLC en las cuales la vía STAT3 está activada mediante un ciclo IL-6 autocrino.

**Protocolo AlphaScreen SureFire para ensayo de células p-STAT5 (p-Tyr694/699)-EPO-JAK2**

- 10 Se determinó la selectividad del plegado de los compuestos de ensayo para la JAK1 sobre la JAK2 mediante un ensayo de células, en el cual se usó EPO para activar la vía JAK2-STAT5, y como lectura se usó pSTAT5.

Preparación de células:

- 15 Dejar de alimentar células UT-7 durante una noche en medio DMEM con 0,5% de 1600 (FBS) y 1X Pen/Strep a 37°C (sin GM-CSF). Sembrar 50.000 células por pocillo en placas negras de 96 pocillos BD con fondos transparentes (en medio sin FBS y GM-CSF). Mantener las placas a temperatura ambiente durante 30-60 minutos antes de incubación durante una noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Contar las células usando un contador Vi-Cell, usar una suspensión de células a 500.000 células/ml y sembrar 100 µl/pocillo en placas Beckman Dickinson Biocoat Catálogo # 354640.

Dilución y tratamiento del compuesto

- 20 Ensayar compuestos en un intervalo de concentraciones de 10 puntos desde 20.000 hasta 1 nM. Preparar compuestos a diluciones en serie de 1:3 en DMSO y además diluir en el medio. Agregar compuesto diluido a las placas de células correspondientes e incubar a 37°C durante 20 minutos, a continuación, agregar 20 µl de EPO (295 ng/ml. Concentración final 45 ng/ml) a las placas de células correspondientes, continuar incubando a 37°C durante 30 minutos.

Lisado de células:

- 25 Verter los medios (cuidadosamente) y agregar 50 µl de tampón de lisis 1X a cada pocillo (congelar lisato ON). (tampón de lisis: 5X; diluido en agua a una concentración final de 1X).

Detección de p-STAT5:

- 30 Seguir la etapas siguientes secuencialmente: formar la mezcla aceptora (tampón de activación/tapón de reacción/esférulas aceptoras); transferir 4 µl de lisato desde placas de 96 pocillos a Proxiplate de 384 pocillos; agregar 5 µl de mezcla aceptora a las placa(s) Proxiplate de 384 pocillos con un dispositivo combi multi-gotas; sellar las placas con cierre de aluminio; agitar durante 1-2 minutos sobre agitador de placas; incubar la placa a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave; formar mezcla donante (esférulas donantes en tampón de dilución); agregar 2 µl de mezcla donante con dispositivo combi multi-gotas; sellar las placas con cierre de aluminio; agitar durante 1-2 minutos sobre un agitador de placas; incubar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave; leer la placa con Envision; protocolo AlphaScreen Surefire 384.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 mostró un IC<sub>50</sub> de 11,8 µM ± 5,4 (n=5). El resultado muestra que el compuesto del Ejemplo 1 es selectivo para la JAK1 sobre la JAK2 en un ensayo celular, en el cual se usó EPO para activar la vía JAK2-STAT5.

- 40 **Ensayos de sangre entera humana: Determinación de pSTAT3 (JAK1) y pSTAT5 (JAK5) en linfocitos y monocitos**

Se desarrollaron y validaron ensayos de sangre entera humana (HWB) para determinar la selectividad de la JAK1 y JAK2 de los compuestos de ensayo.

- 45 Diluir los compuestos de ensayo, 10 puntos, (1:3) en DMSO al 100% y una etapa de disminución en PBS + 0,1% de BSA. Usar tofacitinib como un compuesto de referencia en capa placa, así como una señal máxima (pocillos estimulados y una señal mínima (pocillos no estimulados) con el fin de normalizar los datos. Obtener un grupo de HWB procedente de 4 donantes sanos diferentes. Sembrar la sangre en una placa de 96 pocillos usando un Tecan Evo 95w e incubar con compuestos de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo de incubación, estimular los HWB tanto con IL-6 (206-IL, R&D System) como con GM-CSF (PHC2015, Life Technologies) durante más de 15 minutos. Agregar un colorante de viabilidad (65-0865, eBioscience) (1:1000) usando un Tecan Evo 96w (mezcla 5x).



Las concentraciones finales en el ensayo fueron las siguientes: 100  $\mu\text{M}$  para compuestos, 50  $\mu\text{M}$  para tofacitinib, 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para IL-6, 0,038  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para GM-CSF y 1% de DMSO. Lisar y fijar los HWB usando un tampón Lyse/fix (558049, Becton Dickinson) mediante la adición de 900  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis usando Tecan Eco 96w (mezcla 10x alta velocidad). Incubar los HWB en baño a 37°C durante 10 minutos. Centrifugar los HWB a 500G, 8 minutos y descartar el sobrenadante. Agregar metanol frío usando un Tecan Exo 96w con el fin de permeabilizar las células. Incubar las células sanguíneas en hielo durante 30 minutos. Después de esto, lavar las células 2x usando tampón de teñido (554656, Becton Dickinson), centrifugar a 3000 rpm, 2 minutos, descartar el sobrenadante, y agregar los anticuerpos siguientes. Anti-Human CD4 PE, 1:100 (12-0048, eBioscience), Anti-Human CD33 eFluor® 450, 1:50 (48-0337, eBioscience), Phospho-STAT5 (Tyr694) (C71E5) Rabbit mAb, 1:100 (Alexa Fluor® 488 Conjugate)(3939, Cell Signaling) y Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP™ Rabbit mAb, 1:200 (Alexa Fluor® 647 Conjugate)(4324, Cell Signaling). Incubar los anticuerpos durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente, a continuación lavar las células 2x y leer sobre Cyometer Macsquant (Miltenyi Biotec). Valorar los datos sobre CD4+ (linfocitos) y CD4Low CD33Hi (monocitos) para medir la fluorescencia de las células que expresan pSTAT3 y pSTAT5 respectivamente. Analizar los datos usando FlowJo v\_10 y normalizar la mediana de la fluorescencia frente a la señal máxima y mínima para determinar las IC<sub>50</sub>. Usar el Graph Pad prism 5 para representar las curvas de dosis-respuesta.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC<sub>50</sub> de 2,40  $\mu\text{M}$   $\pm$  0,64  $\mu\text{M}$  (n=3) para la JAK1 y un IC<sub>50</sub> de 13,0  $\pm$  3,2  $\mu\text{M}$  (n=3) para la JAK2. Los resultados demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 muestra aproximadamente 5X más potencia para la JAK1 que sobre la JAK2 en un ensayo de sangre entera humana.

### 20 **Ensayo pSTAT3 de ratón IVTI (JAK1)**

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la fosforilación de STAT3 (activación de STAT3) en el modelo de ratón de xenoinjerto H1975. Desarrollar las células H1975 de acuerdo con las especificaciones de la ATCC en el número de pases lo más bajo posible disponible. Cultivar y mantener las células en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10% e incubar a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Recolectar las células mediante técnicas normalizadas y mezclar con la matriz de membrana basal BD Biosciences (MATRIGEL®) a la suspensión de células para lograr una relación de célula/matriz de 1:1 que proporcione un volumen de inoculación de 0,2 ml de célula/suspensión de matriz conteniendo 5e6 células. Mantener la suspensión de células sobre hielo durante todo el procedimiento de inoculación y comenzar las implantaciones dentro de una hora después de la recolección del cultivo de células. Administrar todas las implantaciones subcutáneamente en el trasero derecho de ratones Athymic Nude hembras obtenidas de Harlan. Alimentar todos los ratones Harlan con Teklad # 2920X *ad libitum* y proporcionar agua mediante envases de gel. Dejar que las células del tumor implantado se desarrollen en forma de un tumor sólido y medirlo dos veces a la semana conjuntamente con el peso corporal, comenzando a los 5-9 días posteriores al implante. Determinar los volúmenes del tumor usando el cálculo:  $0,536 * L * W^2$ . Después que el volumen del tumor alcance aproximadamente 200-250 mm<sup>3</sup>, distribuir aleatoriamente los animales usando la herramienta de distribución aleatoria de bloque multitarrea y colocarlos dentro de un grupo de vehículo conteniendo 6-10 animales y grupos de tratamiento múltiples conteniendo 6 animales cada uno. Formular los compuestos de ensayo en vehículo HEC al 1% conteniendo Tween 80 al 0,25% y antiespuma al 0,05% con un equivalente 1,1 molar de ácido metanosulfónico para formar una sal *in situ*. No agregar ácido al grupo de control de vehículo. Calcular las dosis en base al peso corporal medio del grupo más reciente. Administrar los compuestos mediante sobrealimentación por sonda oral tanto para los estudios de respuesta a la dosis como para en el transcurso del tiempo. Los estudios de respuesta a la dosis son una dosis única administrada 2 horas antes de la separación, procesamiento y congelación del tumor. Los estudios en el transcurso del tiempo son una dosis única administrada a la TED<sub>70</sub> determinada a partir del estudio de respuesta a la dosis.

Procesamiento del tejido del tumor:

45 Recolectar y cortar tumores que proporcionen fragmentos de aproximadamente un tamaño de 150-250 mm<sup>3</sup> e inmediatamente introducirlos en tubo de 12x75 mm conteniendo 1 ml de tampón de lisis MSD Tris enfriado en hielo (Meso Scale Discovery cat# R60TX-2) y 1X HALT (Thermo Scientific product # 1861281). Homogeneizar las muestras durante aproximadamente 15 segundos usando una sonda homogeneizadora de punta Omni de tejido duro desechable (Omni International cat#3\_750H) y dejarlas reposar sobre hielo húmedo durante un tiempo adicional de 15-25 minutos antes de transferirlas a un congelador a -60°C durante una noche. Retirar las muestras del congelador y dejarlas reposar a temperatura ambiente para iniciar la descongelación. Una vez que las muestras comienzan a descongelarse, transferir a hielo húmedo y continuar la descongelación. Después de completada la descongelación, batir las muestras y transferirlas a un tubo de microcentrífuga de 1,8 ml. Centrifugar las lisados a 14.000Xg durante 30-60 minutos a 4°C. Transferir los lisados (200  $\mu\text{l}$ ) a una placa de polipropileno de 96 pocillos (Costar cat# 3879). Determinar las concentraciones proteína usando el kit de ensayo de proteína Pierce BCA (cat# 23225), como se indica más adelante. En resumen, se generó una curva patrón usando un patrón de BSA diluido en tampón de lisis RIPA conteniendo 1X HALT para proporcionar un intervalo de trabajo de 2.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hasta 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Todos los lisados se diluyeron a 1:10 en tampón de lisis RIPA conteniendo 1X HALT. Pipetear 25  $\mu\text{l}$  de los patrones y las muestras a una placa de 96 pocillos (Falcon cat#353072) y agregar 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de trabajo a cada pocillo y mezclar intensamente la placa sobre un agitador de placas durante 30 segundos. Tapar la placa e incubar a 37°C durante 30 minutos. Enfriar la placa a temperatura ambiente y medir la absorbancia a o cerca de los 562 nm sobre un Molecular Devices Spectra Max. Las concentraciones de proteína para cada muestra se determinaron usando el

programa de software SoftMax Pro 6.3. Después de cuantificadas las muestras de tumores, congelar los lisados a -80°C en la placa de polipropileno de 96 pocillos y ensayar a una fecha posterior.

Medición de pSTAT3:

5 Realizar el ensayo pSTAT3 (Tyr705) como sigue. El kit de ensayo MSD pSTAT3 es de Meso Scales Discovery (cat# K150DID-2). El inhibidor de proteasa y fosfatasa 100X HALT puede substituirse por el kit de inhibidores de fosfatasa y proteasa en base a su facilidad de uso y características. Preparar el tampón de lisis MSD Tris mediante la adición del inhibidor de proteasa y fosfatasa 100X HALT a una concentración final 1X, referida a un tampón de lisis MSD completo. Retirar las muestras del tumor del congelador a -80°C y dejar reposar a temperatura ambiente para iniciar la descongelación. Durante la descongelación de la muestra, bloquear la placa de captura de pSTAT3 Tyr705 (cat# K150DID-2) con 150 µl de una solución de bloqueo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador de placa con agitación vigorosa (300-1000 rpm). Sellar las placas con un sellado de placa adhesivo antes de la agitación. La solución de bloqueo contiene la relación de 600 mg de Blocker A (cat# R93BA-4): 20 ml de tampón de lavado 1X MSD Tris (cat# R61TX-2). Una vez que las muestras empiezan a descongelarse, transferir a hielo húmedo para continuar la descongelación. Después de que se ha completado la descongelación, mezclar cuidadosamente mediante pipeteado arriba y abajo varias veces usando una pipeta multicanal. Normalizar las muestras en tampón de lisis MSD completo frío hasta una concentración de proteína de 0,4 µg/µl x 100 µl. Mantener todas las muestras de tumor normalizadas sobre hielo en una placa de polipropileno de 96 pocillos hasta que se agreguen a la placa de captura pSTAT3. Después que la placa de captura pSTAT3 está bloqueada, lavar 4X con 250-300 µl de tampón de lavado 1X MSD Tris usando un lavador de placas Thermo Labsystems Multidrop 384. Después del lavado final, golpear ligeramente la placa para eliminar todo el tampón de lavado remanente. Agregar un volumen total de 25 µl (10 µg) de lisado de tumor normalizado por pocillo e incubar durante un tiempo adicional de 2-3 horas a temperatura ambiente sobre un agitador de placa con agitación vigorosa (300-1000 rpm). Durante esta incubación, diluir el anticuerpo de detección Sulfo-TAG anti Phospho-STAT3, suministrado en el kit, en el tampón de dilución de anticuerpo (1 ml de solución de bloqueo combinada con 2 ml de tampón de lavado 1X MSD Tris), mediante la adición de 60 µl del anticuerpo de detección Sulfo-TAG anti Phospho-STAT3 a 2,94 ml de tampón de dilución de anticuerpo. Mantener esta solución de anticuerpo sobre hielo húmedo hasta que sea necesario. Después de la incubación del lisado de tumor, lavar la placa 4X con 250-300 µl de tampón de lavado 1X MSD Tris. Después del último lavado, golpear la placa para eliminar todo el tampón de lavado remanente y agregar 25 µl/pocillo del anticuerpo de detección Sulfo-TAG anti Phospho-STAT3. Incubar durante un tiempo adicional de 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador de placa con agitación vigorosa (300-1000 rpm). Durante esta incubación, diluir el 4X MSD Read Buffer T con tensioactivo (cat# R92TC-3) hasta 1X con agua desionizada y mantener a temperatura ambiente. Después de completarse la incubación del anticuerpo de detección, lavar la placa 4X con 250-300 µl de tampón de lavado 1X MSD Tris. Después del lavado final, golpear la placa ligeramente para eliminar todo el tampón de lavado remanente y agregar un volumen total de 150 µl/pocillo de 1X MSD Read Buffer T con tensioactivo. Leer la placa sobre el Meso Quick Plex SQ 120. Analizar los datos como se indica más adelante.

Cálculo del porcentaje de inhibición de pSTAT3:

Copiar y procesar los datos brutos de la placa procedentes del Meso Quick Plex SQ 120 directamente en una hoja Microsoft Excel versión 2010. Organizar los datos en el formato apropiado (Respuesta a la dosis o Transcurso en el tiempo), copiados y procesados directamente en la JMP versión 11 para los cálculos de porcentaje de inhibición de pSTAT3 (véase fórmula más adelante).

$$[1 - (\text{Señal de la muestra de tratamiento} / \text{Señal media de control de vehículo})] * 100.$$

Determinar una Oneway Anova con la media del grupo de tratamiento comparada con la media de control del vehículo usando Dunnett's.

Cálculos de TED:

45 Determinar los valores de TED<sub>50</sub> y TEC<sub>50</sub> a partir de un estudio de respuesta a la dosis. La TED<sub>50</sub> es la dosis necesaria para lograr el 50% de inhibición de pSTAT3 y la TEC<sub>50</sub> es la concentración de plasma para lograr el 50% de inhibición de pSTAT3, respectivamente, a las dos horas.

50 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra una TED<sub>50</sub> de 35 mg/kg y una TEC<sub>50</sub> de 11,1 µM (n=1). Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe de manera eficaz la señal JAK1-STAT3 (usando pSTAT3 como una lectura), *in vivo* a las 2 horas después de la dosificación oral. Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 demuestra igualmente actividad correlacionada PK/PD con la TEC<sub>50</sub>.

### **Ensayo pSTAT3 de rata IVTI (JAK1)**

55 El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la expresión de STAT3 en el modelo de rata de xenoinjerto H1975. Desarrollar células H1975 de acuerdo con las especificaciones de la ATCC en el número de pases lo más bajo posible disponible. Cultivar y mantener las células en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10% e incubar a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Recolectar las células mediante técnicas normalizadas y

mezclar con la matriz de membrana basal BD Biosciences (MATRIGEL®) para lograr una relación de célula/matriz de 1:1 que proporcione un volumen de inoculación de suspensión de célula/matriz de 0,2 ml conteniendo 2e6 células. Mantener la suspensión de células sobre hielo durante todo el procedimiento de inoculación y comenzar las implantaciones dentro de una hora después de la recolección del cultivo de células. Administrar todas las implantaciones subcutáneamente en el trasero derecho de rata NIH Nude hembra obtenidas de Taconic. Alimentar todas las ratas con Harlan Teklad Global Diets # 2920X *ad libitum* y proporcionar botellas con agua. Dejar que las células del tumor implantado se desarrollen en forma de un tumor sólido y medirlo dos veces a la semana conjuntamente con el peso corporal. Comenzar midiendo el peso corporal y los volúmenes de los tumores a los 5-9 días posteriores al implante. Determinar los volúmenes del tumor usando el cálculo:  $0,536 * L * W^2$ . Después que el volumen del tumor alcance aproximadamente 350-400 mm<sup>3</sup>, distribuir aleatoriamente los animales usando la herramienta de distribución aleatoria de bloque multitarea y colocarlos dentro de un grupo de vehículo conteniendo 6 animales y grupos de tratamiento múltiples conteniendo 6 animales cada uno. Formular los compuestos en vehículo HEC al 1% conteniendo Tween 80 al 0,25% y antiespuma al 0,05% con un equivalente 1,1 molar de ácido metanosulfónico para formar una sal *in situ* (1,1 ml de ácido metanosulfónico 1 N por mg de compuesto) No agregar ácido al grupo de control del vehículo. Calcular las dosis en base al peso corporal medio del grupo más reciente. Administrar todos los compuestos mediante sobrealimentación por sonda oral tanto para los estudios de respuesta a la dosis como para en el transcurso del tiempo. Los estudios de respuesta a la dosis son una dosis única administrada 2 horas antes de la separación, procesamiento y congelación del tumor. Los estudios en el transcurso del tiempo son una dosis única administrada a la TED<sub>70</sub> determinada a partir del estudio de respuesta a la dosis. La realización de la separación, procesamiento y congelación del tumor se lleva a cabo en puntos de tiempo múltiples señalados más adelante.

#### Procesamiento del tejido del tumor:

Recolectar y cortar tumores que proporcionen fragmentos de aproximadamente un tamaño de 200-250 mm<sup>3</sup> e inmediatamente introducirlos en tubo de 12x75 mm conteniendo 1 ml de tampón de lisis MSD Tris enfriado en hielo (Meso Scale Discovery cat# R60TX-2) y 1X HALT (Thermo Scientific product # 1861281). Homogeneizar las muestras durante aproximadamente 15 segundos usando una sonda homogeneizadora de punta Omni de tejido duro desechable (Omni International cat# 3\_750H) y dejarlas reposar sobre hielo húmedo durante un tiempo adicional de 15-25 minutos antes de transferirlas a un congelador a -60°C durante una noche. Retirar las muestras del congelador y dejarlas reposar a temperatura ambiente para iniciar la descongelación. Una vez que las muestras comienzan a descongelarse, transferir a hielo húmedo y continuar la descongelación. Después de completada la descongelación, batir las muestras y transferirlas a un tubo de microcentrífuga de 1,8 ml. Centrifugar los lisados a 14.000Xg durante 30-60 minutos a 4°C. Transferir los lisados (200 µl) a una placa de polipropileno de 96 pocillos (Costar cat# 3879) que corresponde al diseño de molde de muestra de 96 pocillos. Determinar las concentraciones de proteína usando el kit de ensayo de proteína Pierce BCA (cat# 23225), como se indica más adelante. En resumen, se generó una curva patrón usando un patrón de BSA diluido en tampón de lisis RIPA conteniendo 1X HALT para proporcionar un intervalo de trabajo de 2.000 µg/ml hasta 25 µg/ml. Todos los lisados se diluyeron a 1:10 en tampón de lisis RIPA conteniendo 1X HALT. Pipetear 25 µl de los patrones y las muestras a una placa de 96 pocillos (Falcon cat# 353072) y agregar 200 µl del reactivo de trabajo a cada pocillo y mezclar intensamente la placa sobre un agitador de placas durante 30 segundos. Tapar la placa e incubar a 37°C durante 30 minutos. Enfriar la placa a temperatura ambiente y medir la absorbancia a o cerca de los 562 nm sobre un Molecular Devices Spectra Max. Las concentraciones de proteína para cada muestra se determinaron usando el programa de software SoftMax Pro 6.3. Después de cuantificadas las muestras de tumores, congelar a -80°C en la placa de polipropileno de 96 pocillos y ensayar a una fecha posterior.

#### Medición de pSTAT3:

El ensayo pSTAT3 (Tyr705) se realiza como sigue. El kit de ensayo MSD pSTAT3 es de Meso Scales Discovery (cat# K150DID-2). El inhibidor de proteasa y fosfatasa 100X HALT puede substituirse por el kit de inhibidores de fosfatasa y proteasa en base a su facilidad de uso y características. Utilizar todos los otros reactivos procedentes del kit. Preparar el tampón de lisis MSD Tris mediante la adición del inhibidor de proteasa y fosfatasa 100X HALT a una concentración final 1X (referida al tampón de lisis MSD completo). Retirar las muestras del tumor del congelador a -80°C y dejar reposar a temperatura ambiente para iniciar la descongelación. Durante la descongelación de la muestra, bloquear la placa de captura de pSTAT3 Tyr705 (cat# K150DID-2) con 150 µl de una solución de bloqueo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador de placa con agitación vigorosa (300-1000 rpm). Sellar las placas con un sellado de placa adhesivo antes de la agitación. La solución de bloqueo debería contener la relación de 600 mg de Blocker A (cat# R93BA-4): 20 ml de tampón de lavado 1X MSD Tris (cat# R61TX-2). Una vez que las muestras empiezan a descongelarse, transferir a hielo húmedo para continuar la descongelación. Después de que se ha completado la descongelación, mezclar cuidadosamente mediante pipeteado arriba y abajo varias veces usando una pipeta multicanal. Normalizar las muestras en tampón de lisis MSD completo frío a una concentración de proteína de 0,4 µg/µl x 100 µl. Mantener todas las muestras de tumor normalizadas sobre hielo en una placa de polipropileno de 96 pocillos hasta que se agreguen a la placa de captura pSTAT3. Después que la placa de captura pSTAT3 está bloqueada, lavar 4X con 250-300 µl de tampón de lavado 1X MSD Tris usando un lavador de placas Thermo Labsystems Multidrop 384. Después del lavado final, golpear ligeramente para eliminar todo el tampón de lavado remanente. Agregar un volumen total de 25 µl (10 µg) de lisado de tumor normalizado por pocillo e incubar durante un tiempo adicional de 2-3 horas a temperatura ambiente sobre un agitador de placa con agitación vigorosa (300-1000 rpm). Durante esta incubación, diluir el anticuerpo de detección Sulfo-TAG anti Phospho-STAT3,

5 suministrado en el kit, en el tampón de dilución de anticuerpo (1 ml de solución de bloqueo combinada con 2 ml de tampón de lavado 1X MSD Tris), mediante la adición de 60 µl del anticuerpo de detección Sulfo-TAG anti Phospho-STAT3 a 2,94 ml de tampón de dilución de anticuerpo. Mantener esta solución de anticuerpo sobre hielo húmedo hasta que sea necesario. Después de las incubaciones del lisado de tumor, lavar la placa 4X con 250-300 µl de  
 10 tampón de lavado 1X MSD Tris. Después del último lavado, golpear ligeramente para eliminar todo el tampón de lavado remanente y agregar 25 µl/pocillo del anticuerpo de detección Sulfo-TAG anti Phospho-STAT3. Incubar la placa un tiempo adicional de 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador de placa con agitación vigorosa (300-1000 rpm). Durante esta incubación, diluir el 4X MSD Read Buffer T con tensioactivo (cat# R92TC-3) hasta 1X con agua desionizada y mantener a temperatura ambiente. Después de completarse la incubación del anticuerpo de  
 15 detección, lavar la placa 4X con 250-300 µl de tampón de lavado 1X MSD Tris. Después del lavado final, golpear ligeramente para eliminar todo el tampón de lavado remanente y agregar un volumen total de 150 µl/pocillo de 1X MSD Read Buffer T con tensioactivo. Leer la placa sobre el Meso Quick Plex SQ 120. Analizar los datos como se indica más adelante.

Cálculo del porcentaje de inhibición de pSTAT3:

15 Copiar y procesar los datos brutos de la placa procedentes del Meso Quick Plex SQ 120 directamente en una hoja Microsoft Excel versión 2010. Organizar los datos en el formato apropiado (Respuesta a la dosis o Transcurso en el tiempo). Copiar y procesar directamente en la JMP versión 11 para los cálculos de porcentaje de inhibición de pSTAT3 (véase fórmula más adelante).

$$[1 - (\text{Señal de la muestra de tratamiento} / \text{Señal media de control de vehículo})] * 100.$$

20 Determinar una Oneway Anova con la media del grupo de tratamiento comparada con la media de control del vehículo usando Dunnett's.

Cálculos de TED:

25 Los valores de TED<sub>50</sub> y TEC<sub>50</sub> son determinados a partir de un estudio de respuesta a la dosis. La TED<sub>50</sub> es la dosis necesaria para lograr el 50% de inhibición de pSTAT3 y la TEC<sub>50</sub> es la concentración de plasma requerida para lograr el 50% de inhibición de pSTAT3, respectivamente, a las dos horas.

En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del ámbito de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra una TED<sub>50</sub> de 9 mg/kg y una TEC<sub>50</sub> de 3,9 µM (n=1). Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 demuestra participación diana en el modelo de rata H1975 IVTI.

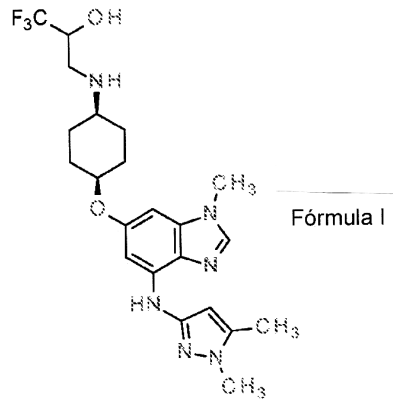
### 30 **Estudio de eficacia en el modelo de tumor de xenoinjerto HCC827**

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos para inhibir el crecimiento de tumor en el modelo de ratón de xenoinjerto HCC827. Desarrollar células HCC827 (ATCC# CRL-2868, Lote#59392891) de acuerdo con las especificaciones de la ATCC en el número de pases lo más bajo posible disponible. Cultivar células y mantener en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10% e incubar a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Recolectar las células procedentes de matraces usando TryPLE, lavar dos veces en DPBS, resuspender en HBSS, y mezclar con la matriz de membrana basal BD Biosciences (MATRIGEL®) a la suspensión de células para lograr una relación de célula/matriz de 1:1 que proporcione un volumen de inoculación de suspensión de célula/matriz de 0,2 ml conteniendo 5e<sup>6</sup> células.  
 35 Mantener las suspensiones de células sobre hielo durante todo el procedimiento de inoculación y comenzar las implantaciones dentro de una hora después de la recolección del cultivo de células. Administrar las implantaciones subcutáneamente en el trasero derecho de ratón CB17 SCID hembra obtenidos de Harlan (18-20 g). Alimentar los ratones Harlan con Teklad Protein Extruded 2920X *ad libitum* y proporcionar agua con el sistema de riego de bastidores. Dejar que las células del tumor implantado se desarrollen en forma de un tumor sólido y medirlo dos veces a la semana conjuntamente con el peso corporal, comenzando el séptimo día después de la implantación. Determinar los volúmenes del tumor usando el cálculo: 0,536\*L\*W<sup>2</sup>. Después que el volumen del tumor alcance aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup>, distribuir aleatoriamente los animales y colocarlos en grupos conteniendo 5-8 animales cada uno. Formular los compuestos en vehículo HEC al 1% conteniendo Tween 80 al 0,25% y antiespuma al 0,05% con un equivalente 1,1 molar de ácido metanosulfónico para formar una sal *in situ* (1,1 ml de ácido metanosulfónico 1 N por (peso molecular del inserto) mg de compuesto) Almacenar el compuesto de ensayo a temperatura ambiente.  
 45 Formular los compuestos una vez a la semana, y almacenar a temperatura ambiente. No agregar ácido al grupo de control de vehículo. Calcular las dosis en base al peso corporal medio del grupo más reciente. Administrar los compuestos mediante sobrealimentación por sonda oral durante 28 días tanto BID como QD dependiendo de la dosificación.

55 En este ensayo se ensayó un compuesto dentro del alcance de la invención substancialmente como se ha descrito anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 muestra un 31% inhibición del crecimiento del tumor a 30 mg/kg de BID, un 22% de regresión del tumor a 60 mg/kg de BID, y 22% de regresión del tumor a 120 mg/kg de QD. Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 demuestra regresión del tumor en el modelo de tumor de xenoinjerto HCC827.

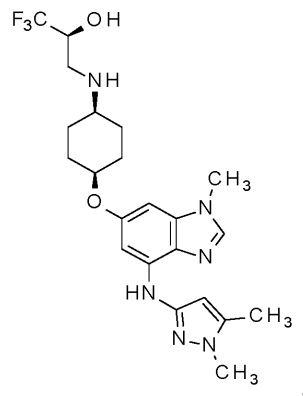
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:

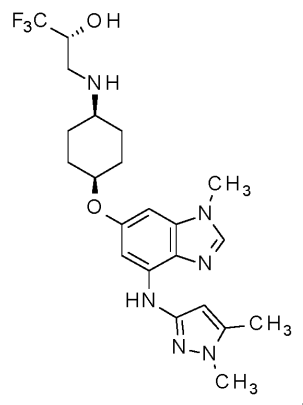


o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es seleccionado entre el grupo que consiste en:

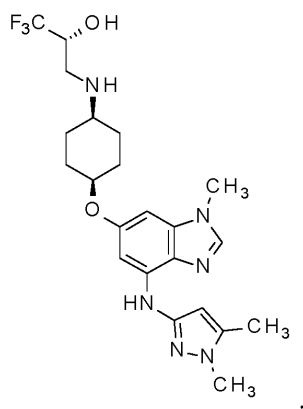


o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, y



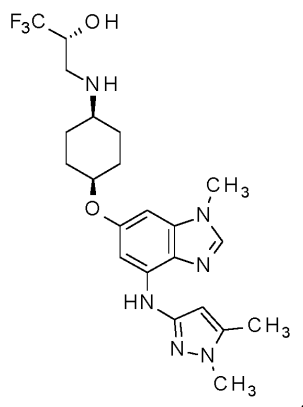
10 o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, el cual es



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, el cual es



- 5 5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente.
6. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en terapia.
7. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 8. El compuesto o sal para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de célula no pequeña y adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma, carcinoma hepatocelular, incluyendo carcinoma hepatocelular Asiático, cáncer colorectal, cáncer de mama, y leucemia, incluyendo leucemia linfocítica aguda.
- 15 9. El compuesto o sal para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de célula no pequeña.
10. El compuesto o sal para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es adenocarcinoma de pulmón.
11. El compuesto o sal para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 20 12. El compuesto o sal para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es carcinoma hepatocelular Asiático.