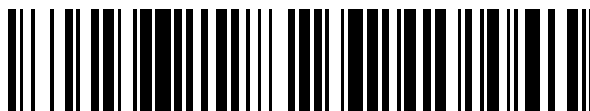


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 573**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/541 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010** **E 17152084 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019** **EP 3178819**

54 Título: **5-Fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il carboxamidas como inhibores de JAK**

30 Prioridad:

26.06.2009 US 220688 P

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

12.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MENET, CHRISTEL JEANNE MARIE y
SMITS, KOEN KURT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 766 573 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

5-Fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il carboxamidas como inhibidores de JAK

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto que es un inhibidor de JAK, una familia de tirosina-quinazas que participan en afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6. En particular, el compuesto de la invención inhibe JAK1 y JAK2. La presente invención además proporciona métodos para la producción del compuesto de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención, métodos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades que implican afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, congénitas malformaciones del cartílago, y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6, por e la administración del compuesto de la invención.

Las quinazas Janus (JAK, por sus siglas en inglés) son tirosina-quinazas citoplásmicas que transducen la señalización de citoquinas desde receptores de membrana hasta factores de transcripción de tipo STAT (siglas en inglés de: transductores de señal y activadores de la transcripción). Se han descrito cuatro miembros de la familia JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Por la unión de la citoquina a su receptor, los miembros de la familia JAK se autofosforilan y/o se transfosforilan entre sí, seguido por la fosforilación de los STAT, que luego migran al núcleo para modular la transcripción. La transducción de señales intracelulares de JAK-STAT es apropiada para los interferones, la mayoría de las interleuquinas, así como una variedad de citoquinas y factores endocrinos tales como EPO (eritropoyetina), TPO (trombopoyetina), GH (siglas en inglés de: hormona del crecimiento), OSM (oncostatina M), LIF (siglas en inglés de: factor inhibidor leucémico), CNTF (siglas en inglés de: factor neurotrófico ciliar), GM-CSF (siglas en inglés de: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) y PRL (prolactina) (Vainchenker W. *et al.* (2008)).

La combinación de modelos genéticos y la investigación de inhibidores de JAK de pequeño tamaño molecular revelaron el potencial terapéutico de varias JAK. La JAK3 está validada por genética humana y de ratón, como una diana de inmunosupresión (O'Shea J. *et al.* (2004)). Los inhibidores de JAK3 fueron trasladados con éxito al desarrollo clínico, inicialmente para el rechazo de trasplante de órganos, aunque también, más adelante, para otras indicaciones inmunoinflamatorias, tales como artritis reumatoide (AR), psoriasis y enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

La TYK2 es una diana potencial para las enfermedades inmunoinflamatorias, y estando validada por genética humana y por estudios de desactivación en ratones (Levy D. and Loomis C. (2007)).

La JAK1 es una nueva diana 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, se espera que la inhibición de la JAK1 y/o otras JAK sean de beneficio terapéutico para una gama de afecciones inflamatorias, al igual que para otras enfermedades impulsadas por la transducción de señales mediada por JAK.

Antecedentes de la invención

La degeneración de cartílago es el sello distintivo de diversas enfermedades, entre las cuales, la artritis reumatoide y la artrosis son las más predominantes. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad degenerativa crónica de las articulaciones, caracterizada por la inflamación y la destrucción de las estructuras articulares. Cuando la enfermedad no se controla, conduce a discapacidad sustancial y dolor debido a la pérdida de funcionalidad articular, e incluso, a la muerte prematura. Por lo tanto, la meta de un tratamiento para la AR es no solo retardar la enfermedad, sino, además, lograr la remisión a fin de detener la destrucción de las articulaciones. Además de la gravedad de las consecuencias de la enfermedad, la alta incidencia de la AR (~ 0,8% de los adultos están afectados en todo el mundo) significa un alto impacto socioeconómico (para revisiones sobre AR, se hace referencia a los trabajos de Smolen and Steiner (2003); Lee y Weinblatt (2001); Choy and Panayi (2001); O'Dell (2004) and Firestein (2003)).

La artritis (también denominada AT, o artritis de desgaste y rotura) es la forma más común de la artritis, y se caracteriza por la pérdida de cartílago articular, frecuentemente asociada a la hipertrofia del hueso y dolor. Para una amplia revisión sobre la artrosis, se hace referencia al trabajo de Wieland *et al.* (2005).

La artrosis es difícil de tratar. Actualmente no existe curación, y el tratamiento se centra en el alivio del dolor y en la prevención de la deformación de la articulación afectada. Los tratamientos comunes incluyen el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Si bien los suplementos dietéticos, tales como condroitina y sulfato de glucosamina han sido preconizados como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la artrosis, un ensayo clínico reciente reveló que ambos tratamientos no reducían el dolor asociado a la artrosis (Clegg *et al.*, 2006).

La estimulación de los procesos anabólicos, el bloqueo de los procesos catabólicos, o una combinación de estos dos, puede lograr la estabilización del cartílago, y tal vez, incluso la reversión del daño, para, de ese modo, prevenir el avance posterior de la enfermedad. Se han desarrollado métodos terapéuticos para la corrección de las lesiones del cartílago articular que aparecen durante la enfermedad artrósica, si bien, hasta la fecha, ninguno de ellos ha podido

mediar la regeneración del cartilago articular *in situ* e *in vivo*. En conjunto, no se encuentra disponible ningún fármaco contra la artrosis que modifique la enfermedad.

Vandeghinste *et al.* (WO 2005/124342) descubrieron JAK1 como una diana, cuya inhibición podría tener importancia terapéutica para varias enfermedades, entre ellas, la AT. La desactivación del gen JAK1 en ratones demostró que JAK1 cumple funciones esenciales y necesarias durante el desarrollo: los ratones JAK1^{-/-} murieron dentro de las 24 horas después del nacimiento, y el desarrollo de linfocitos fue gravemente dañado. Además, las células JAK1^{-/-} fueron no reactivas o menos reactivas para las citoquinas que utilizan receptores de citoquinas la clase II, receptores de citoquinas que utilizan la subunidad gamma-c para la señalización y la familia de receptores de citoquinas que utilizan la subunidad gp130 para la señalización (Rodig *et al.*, 1998).

- 10 Diversos grupos han implicado la señalización de JAK-STAT en la biología de los condrocitos. Li *et al.* (2001) mostraron 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 (sigla en inglés de "proteína-quinasa activada por mitógeno"). Osaki *et al.* (2003) mostraron que la inhibición del colágeno II mediada por interferón-gamma en condrocitos implica la señalización de JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo del cartilago mediante la reducción de la expresión de componentes de matriz, y mediante la inducción de la expresión de collagenasas y óxido nítrico-sintasa inducible (NOS2), que media la producción de óxido nítrico (NO). Otero *et al.*, (2005) mostraron que leptina y la IL1-beta indujeron sinérgicamente la producción de NO o la expresión de ARNm de NOS2 en condrocitos, y que esta fue bloqueada por un inhibidor de JAK. Legendre *et al.* (2003) mostraron que IL6/receptor de IL6 indujeron la sub-regulación de genes de la matriz específica del cartilago del colágeno II, del núcleo de agregano y de la proteína de unión en los condrocitos articulares bovinos, y que esto era mediado por la señalización de JAK/STAT. Por lo tanto, estas observaciones sugieren una función para la actividad de la quinasa JAK en la homeostasis del cartilago, y oportunidades terapéuticas para los inhibidores de la quinasa JAK.

- 25 Los miembros de la familia JAK han sido implicados en otras afecciones, que incluyen trastornos mieloproliferantes (O'Sullivan *et al.*, 2007, *Mol. Immunol.*, 44 (10): 2497-506), donde se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular, JAK2, también pueden ser de utilidad en el tratamiento de trastornos mieloproliferantes. Además, la familia JAK, en particular, JAK1, JAK2 y JAK3, ha sido asociada a cánceres, en especial, a leucemias, tales como leucemia mieloide aguda (O'Sullivan *et al.*, 2007, *Mol. Immunol.* 44 (10): 2497-506; Xiang *et al.*, 2008, "Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia", *Blood First Edition Paper*, prepublicada en Internet el 26 de diciembre de 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) y leucemia linfoblástica aguda (Mullighan *et al.*, 2009), o a tumores sólidos, por ejemplo, liomiosarcoma uterino (Constantinescu *et al.*, 2007, *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (3): 122-131), cáncer de próstata (Tam *et al.*, 2007, *British Journal of Cancer*, 97, 378 - 383). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular, de JAK1 y/o JAK2, pueden también tener utilidad en el tratamiento de cánceres (leucemias y tumores sólidos, por ejemplo, liomiosarcoma uterino, cáncer de próstata).

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

- 40 El documento WO 2009/047514 describe compuestos de [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina y [1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidina que, entre otras, inhiben la función tirosina-quinasa del receptor AXL.

El documento WO 2009/017954 describe inhibidores [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina de la quinasa JAK2.

El documento WO 2010/010190 describe compuestos de [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina que inhiben las quinasas JAK.

- 45 El documento WO 03/010167 describe derivados de 8-metoxi-(1,2,4)triazolo(1,5-a)piridina y su uso como ligandos del receptor de adenosina.

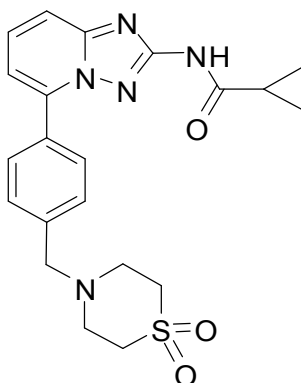
Las terapias actuales no son satisfactorias, y por lo tanto, continúa la necesidad de identificar otros compuestos que puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades articulares degenerativas, por ejemplo, artrosis, artritis reumatoide y osteoporosis, en particular, la artrosis. La presente invención, por lo tanto, proporciona un compuesto, métodos para su fabricación y composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención junto con un vehículo farmacéutico adecuado. La presente invención además proporciona el uso del compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades articulares degenerativas. Específicamente, la presente invención proporciona un nuevo inhibidor de JAK que exhibe una potencia *in vivo* drásticamente mejor.

Sumario de la invención

- 55 La presente invención se sustenta en el descubrimiento de que el compuesto de la invención es capaz de actuar como inhibidor de JAK, y de que es útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartilago,

malformaciones congénitas del cartílago, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6. En un aspecto específico, el compuesto es un inhibidor de JAK1 y JAK2. La presente invención además proporciona métodos para la producción de este compuesto, una composición farmacéutica que comprende este compuesto y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6 mediante la administración del compuesto de la invención.

De aquí en adelante, cuando se refiere a "el compuesto de fórmula (I)" se entiende que siempre se refiere a la sal de ácido maleico de un compuesto de fórmula I como se define en la reivindicación 1. Por lo tanto, cuando en un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de la invención que tiene la fórmula (I), entonces se entiende que esto siempre significa: la sal del ácido maleico del siguiente compuesto:



El compuesto de la invención es un nuevo inhibidor de JAK que parece exhibir una potencia *in vivo* drásticamente mejor, en comparación con compuestos estructuralmente similares. En una modalidad particular, el compuesto de la invención es un inhibidor de JAK1 y JAK2. En particular, parece exhibir este aumento de la potencia con menores niveles de exposición *in vivo* en comparación con compuestos estructuralmente similares. Se espera que el uso de un compuesto con estas mejoras logre menores requerimientos de dosificación (y por lo tanto, mejor programa de dosificación).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico. Además, el compuesto de la invención, útil en las composiciones farmacéuticas y en los métodos de tratamiento descritos en esta solicitud, es farmacéuticamente aceptable en términos de su preparación y uso. En este aspecto de la invención, la composición farmacéutica además puede comprender otros ingredientes activos adecuados para uso en combinación con el compuesto de la invención.

En otro aspecto de la invención, esta invención proporciona el compuesto de fórmula I (en forma de la sal del ácido maleico) para usar en un método de tratamiento de un mamífero sensible a una afección, o afectado con una afección de las citadas en esta solicitud, y en particular, donde dicha afección puede estar asociada a la actividad anormal de JAK, por ejemplo, afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o del compuesto de la invención como se describe en esta solicitud. En una modalidad específica, la afección está asociada a la actividad anormal de JAK1 y JAK2.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de las citadas en esta solicitud, en particular, donde dichas afecciones pueden estar asociadas a la actividad anormal de JAK, por ejemplo, afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6.

También se describe en la presente solicitud un método de tratamiento de un mamífero sensible a una afección, o afectado a una afección que está relacionada causalmente con la actividad anormal de JAK como se describe en esta solicitud, y comprende la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección o para la prevención de la afección, de la composición farmacéutica o del compuesto de la invención descrito en esta solicitud. En un aspecto específico, la afección está causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK1 y JAK2.

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

También se describen en la presente solicitud métodos para la síntesis del compuesto de la invención, donde los

protocolos y las vías de síntesis representativos se describen más adelante en la presente solicitud.

En consecuencia, un objeto principal de esta invención consiste en proporcionar un nuevo compuesto que puede modificar la actividad de JAK y, en consecuencia, prevenir o tratar cualquier enfermedad que pueda estar causalmente relacionada con dicha actividad. En un aspecto específico, el compuesto de la invención modula la actividad de JAK1 y JAK2.

Además, es un objeto de esta invención proporcionar un compuesto que puede tratar o aliviar enfermedades o sus síntomas, tales como afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, que pueden estar causalmente relacionadas con la actividad de JAK, en particular, JAK1 y JAK2.

Aun otro objeto de esta invención consiste en proporcionar una composición farmacéutica que puede usarse en el tratamiento o la prevención de una diversidad de estados morbosos, que incluyen las enfermedades asociadas con la actividad de JAK, tales como afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6. En una modalidad específica, la enfermedad está asociada con la actividad de JAK1 y JAK2.

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

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los siguientes términos tienen el propósito de tener los significados que se presentan a continuación, y son útiles en la comprensión de la descripción y el alcance propuesto de la presente invención.

En la descripción de la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos, y métodos de uso de dichos compuestos y composiciones, cuando se presentan los siguientes términos, estos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse además que cuando se describen en esta solicitud, cualquiera de los restos definidos a continuación puede estar sustituido con una diversidad de sustituyentes, y que las respectivas definiciones tienen el propósito de incluir dichos restos sustituidos, dentro de su alcance, como se expone a continuación. A menos que se establezca lo contrario, el término "sustituido" debe definirse conforme a lo expuesto a continuación. Asimismo, debe entenderse que los términos "grupos" y "radicales" pueden considerarse intercambiables, cuando se emplean en la presente solicitud.

Los artículos "un" y "una" pueden emplearse en esta solicitud a fin de hacer referencia a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "JAK" se refiere a la familia de quinasas Janus (JAK), que son tirosina-quinazas citoplásmicas que transducen la señalización de citoquina desde receptores de membrana hasta factores de transcripción STAT. Se han descrito cuatro miembros de la familia JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, y el término JAK puede referirse a todos los miembros de la familia JAK en forma colectiva, o a uno o más de los miembros de la familia JAK, según lo indique el contexto.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o capaz de ser aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de los Estados Unidos de América, o la agencia correspondiente en países diferentes de los Estados Unidos; o citado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, y más en particular, en seres humanos.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable, y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. En particular, dichas sales no son tóxicas, y pueden ser sales orgánicas o inorgánicas de adición de ácidos y 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 canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril-sulfónico, 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 es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion metálico

alcalino, un ion alcalino-térreo, o un ion de aluminio; o coordinados con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Las sales además incluyen, solo a modo de ejemplo, sales de 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 hidrocloreto, hidrobromuro, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. El término "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a un contraión catiónico aceptable de un grupo funcional ácido. Dichos cationes se ejemplifican por medio de cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el cual se administra el compuesto de la invención.

- 10 El término "solvato" se refiere a formas del compuesto que están asociadas a un disolvente, habitualmente, por medio de una reacción de solvolisis. Esta asociación física incluye el enlace de hidrógeno. Los disolventes convencionales comprenden agua, etanol, ácido acético y similares. El compuesto de la invención se puede preparar, por ejemplo, en forma cristalina, y puede solvatarse o hidratarse. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, y además, comprenden tanto solvatos estequiométricos como solvatos no estequiométricos. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo, cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente en la red cristalina del sólido cristalino. El término "solvato" abarca solvatos tanto en fase de solución como capaces de aislamiento. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

El término "sujeto" incluye seres humanos. Los términos "ser humano", "paciente" y "sujeto" se usan de modo indistinto en la presente solicitud.

- 20 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar de acuerdo con el compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, etc., del sujeto tratado.

- 25 "Prevenir" o "prevención" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o un trastorno (es decir, evitar que por lo menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes del inicio de la enfermedad).

- 30 El término "profilaxis" se relaciona con la "prevención", y se refiere a una medida o un procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Ejemplos, sin limitación, de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalarios en riesgo de trombosis debido a, por ejemplo, la inmovilización; y la administración de un agente contra la malaria tal como cloroquina, antes de la visita a una región geográfica en donde la malaria sea endémica, o donde el riesgo de contraer la malaria sea alto.

- 35 "Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una modalidad, a la mejora de la enfermedad o el trastorno (es decir, la detención de la enfermedad o la reducción de la manifestación, el alcance o la gravedad de por lo menos uno de sus síntomas clínicos). En otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la mejora de por lo menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. Aun en otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), ya sea fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una modalidad adicional, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la ralentización del progreso de la enfermedad.

- 45 De acuerdo con la presente solicitud, el término "afecciones inflamatorias" se refiere al grupo de afecciones que incluyen artritis reumatoide, artrosis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, rinitis), enfermedades intestinales inflamatorias (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis), estados morbosos inducidos por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de revascularización quirúrgica o estados crónicos por endotoxinas que contribuyen, por ejemplo, a la insuficiencia cardíaca crónica), y enfermedades relacionadas con el cartilago, tales como las de las articulaciones. En particular, el término se refiere a artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.

- 50 De acuerdo con la presente solicitud, el término "enfermedades autoinmunitarias" se refiere al grupo de enfermedades que incluyen enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, que abarcan afecciones tales como EPOC, asma (por ejemplo, asma intrínseca, asma extrínseca, asma por polvo, asma infantil), en particular, asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hipersensibilidad de las vías respiratorias), bronquitis, que incluye asma bronquial, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I y complicaciones asociadas a ella; eccema atópico (dermatitis atópica), dermatitis de contacto y otras dermatitis eczematosas, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica. En particular, el término se refiere a EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "enfermedades proliferantes" se refiere a afecciones tales como cáncer

(por ejemplo, liomiosarcoma uterino o cáncer de próstata), trastornos mieloproliferantes (por ejemplo, policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis), leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda), mieloma múltiple, psoriasis, restenosis, esclerodermis o fibrosis. En particular, el término se refiere a cáncer, leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.

- 5 De acuerdo con la presente solicitud, el término “cáncer” se refiere al crecimiento maligno o benigno de células de la piel o de órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Un tipo de cáncer tiende a infiltrarse en tejido adyacente y diseminarse (metástasis) en órganos distantes, por ejemplo, en hueso, hígado, pulmón o cerebro. De acuerdo con esta invención, el término cáncer incluye tanto tipos de células tumorales metastásicas, tales como, pero sin limitación, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma,
- 10 rabdomiosarcoma y mastocitoma, y tipos de carcinoma de tejido, por ejemplo, pero sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de hígado primario, cáncer de ovario, cáncer de próstata y liomiosarcoma uterino.

- 15 De acuerdo con esta solicitud, el término “leucemia” se refiere a enfermedades neoplásicas de la sangre y de órganos formadores de sangre. Dichas enfermedades pueden causar la disfunción de la médula ósea y del sistema inmunitario, lo que hace al hospedante altamente sensible a infecciones y hemorragias. En particular, el término leucemia se refiere a leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA).

- 20 De acuerdo con la presente solicitud, el término “rechazo de trasplantes” se refiere al rechazo agudo o crónico de células, tejido o aloinjertos o xenoinjertos de órganos sólidos de, por ejemplo, islotes pancreáticos, células madre, médula ósea, piel, músculo, tejido corneal, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón y pulmón combinados, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago, o enfermedades de rechazo de injerto contra hospedante.

- 25 De acuerdo con esta solicitud, el término “enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago” incluye afecciones tales como artrosis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurogénica o neuropática, artropatía, formas endémicas de artritis, como artrosis deformante endémica, enfermedad de Mseleni y enfermedad de Handigodu; degeneración resultante de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante.

- 30 De acuerdo con esta solicitud, el término “malformaciones congénitas del cartílago” incluye afecciones tales como condrólisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria y trastornos relacionados.

De acuerdo con esa solicitud, el término “enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6” incluye afecciones tales como la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferante mesangial.

- 35 El “compuesto de la presente invención” y expresiones equivalentes tienen el propósito de abarcar el compuesto de la Fórmula descrita en esta solicitud con anterioridad, donde dicha expresión incluye las sales farmacéuticamente aceptables y los solvatos, por ejemplo, hidratos, y los solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables cuando el contexto lo permite. Asimismo, la referencia a productos intermedios, por sí mismos reivindicados o no, tiene la intención de contemplar sus sales y solvatos, cuando el contexto lo permita.

- 40 Otros derivados del compuesto de esta invención tienen actividad tanto en su forma de ácido como de derivado ácido, si bien en la forma sensible de ácido, a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con tejidos, o liberación retardada en el organismo de mamífero (véase la referencia de Bundgard, H., *Design of Prodrugs*, pp. 7–9, 21–24, Elsevier, Ámsterdam 1985).

- 45 De acuerdo con esta solicitud, el término “variante isotópica” se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una “variante isotópica” de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos, tales como, por ejemplo, deuterio (^2H o D), carbono-13 (^{13}C), nitrógeno-15 (^{15}N), o similares. Se entenderá que, en un compuesto donde se realiza dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando se presentan, pueden variar, de modo que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser $^2\text{H/D}$, cualquier carbono puede ser ^{13}C , o cualquier nitrógeno puede ser ^{15}N , y que la presencia y el desplazamiento de dichos átomos pueden ser determinados por el experto en la técnica. Asimismo, la invención
- 50 puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, en el caso, por ejemplo, en el que los compuestos resultantes se pueden usar para estudios de fármacos y/o distribución en tejidos sustratos. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y fácil medio de detección. Además, se pueden preparar compuestos sustituidos con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , que serán útiles en estudios de topografía por emisión de positrones (TEP) para el examen de la ocupación de receptores sustratos.
- 55

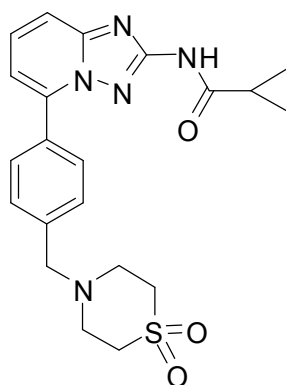
Todas las variantes isotópicas del compuesto proporcionado en esta solicitud, radiactivas o no, se pretende que sean contempladas dentro del alcance de la invención.

Los “tautómeros” se refieren a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto particular, y que varían en el desplazamiento de electrones y átomos de hidrógeno. En consecuencia, dos estructuras pueden encontrarse en equilibrio a través del movimiento de electrones π y un átomo (habitualmente H). Por ejemplo, los enoles y las cetonas son tautómeros debido a que se interconvierten rápidamente mediante el tratamiento con ácido o base. Otro ejemplo de tautomerismo comprende las formas aci- y nitro- del fenilnitrometano, que se forman, asimismo, mediante el tratamiento con ácido o base.

Las formas tautómeras pueden ser importantes para el logro de la reactividad química óptima y la actividad biológica de un compuesto de interés.

El compuesto

- 10 La presente invención se basa en el descubrimiento de que el compuesto de la invención es un inhibidor de JAK, y de que es útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6. También se describen en la presente solicitud métodos para la producción del compuesto de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6, mediante la administración del compuesto de la invención. En una modalidad específica, el compuesto de la invención es un inhibidor de JAK1 y JAK2.
- 15
- 20 Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención, se describe el compuesto de la invención que tiene la fórmula (I):



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

El compuesto de la invención es un nuevo inhibidor de JAK. En particular, el compuesto es un potente inhibidor de JAK1 y JAK2; sin embargo, también inhibe TYK2 y JAK3, con una potencia menor.

- 25 El compuesto de la invención exhibe una potencia *in vivo* drásticamente mejor. Estas mejoras se observan específica y sorprendentemente incluso en compuestos estructuralmente similares. El uso de un compuesto con estas mejoras puede lograr un menor requerimiento de dosificación (y por lo tanto, un mejor programa de dosificación).

Composiciones farmacéuticas

- 30 Cuando se emplea como un agente farmacéutico, el compuesto de esta invención habitualmente se administra en forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones se pueden preparar de manera conocida en la técnica farmacéutica, y comprenden por lo menos un compuesto activo. En general, el compuesto de esta invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad del compuesto administrada realmente, en general, será determinada por el médico, en vista de las circunstancias pertinentes que incluyen la afección a tratar, la vía de administración seleccionada, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y factores similares.
- 35

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por una diversidad de vías, que incluyen la vía oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, intravenosa, intramuscular e intranasal. Dependiendo de la vía propuesta de suministro, el compuesto de esta invención, se formula preferentemente como composiciones inyectables u orales o como bálsamos, lociones o parches, todos ellos, para administración transdérmica.

- 40 Las composiciones para la administración oral pueden adoptar la forma de suspensiones o soluciones líquidas a granel, o polvos a granel. Sin embargo, más comúnmente, las composiciones se presentan en formas farmacéuticas unitarias, para facilitar la dosificación exacta. El término “formas farmacéuticas unitarias” se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, donde

cada unidad contiene una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto con un excipiente, vehículo o portador farmacéutico adecuado. Las formas farmacéuticas unitarias típicas incluyen jeringuillas o ampollas premedidas, prellenadas, de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas, o similares, en el caso de composiciones sólidas. En dichas composiciones, el compuesto de la invención habitualmente es un componente menor (de alrededor de 0,1 a alrededor de 50% en peso o preferentemente, de alrededor de 1 a alrededor de 40% en peso), donde el resto lo constituyen diversos vehículos o portadores y auxiliares de tratamiento útiles para la formación de la forma farmacéutica deseada.

Las formas líquidas adecuadas para la administración oral pueden comprender un vehículo adecuado acuoso o no acuoso, con tampones, agentes de puesta en suspensión y dispersantes, colorantes, aromatizantes y similares. Las formas sólidas pueden comprender, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente de deslizamiento, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Las composiciones inyectables se basan típicamente en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato, u otros portadores inyectables conocidos en la técnica. Como anteriormente, el compuesto activo en dichas composiciones habitualmente es un componente minoritario, frecuentemente de alrededor de 0,05 a 10% en peso, siendo el resto el portador inyectable e ingredientes similares.

Las composiciones transdérmicas habitualmente se formulan como una crema o una pomada para uso tópico que contiene los ingredientes activos, en general, en una cantidad que varía de alrededor de 0,01 a alrededor de 20% en peso, preferentemente, de alrededor de 0,1 a alrededor de 20% en peso, preferentemente, de alrededor de 0,1 a alrededor de 10% en peso y aún más preferentemente, de alrededor de 0,5 a alrededor de 15% en peso. Cuando se formulan como una pomada, los ingredientes activos habitualmente serán combinados con una base para pomada paraafínica o miscible con agua. Alternativamente, los ingredientes activos se pueden formular en una crema con, por ejemplo, una base de crema de tipo aceite en agua. Las formulaciones transdérmicas de este tipo son bien conocidas en la técnica, y en general, incluyen ingredientes adicionales para aumentar la penetración dérmica o la estabilidad de los ingredientes activos o de la formulación. Todas dichas formulaciones transdérmicas conocidas e ingredientes se incluyen dentro del alcance de esta invención.

El compuesto de la invención además se puede administrar por medio de un dispositivo transdérmico. En consecuencia, la administración transdérmica se puede lograr usando un parche del tipo reservorio o de tipo membrana porosa, o de una variedad de matriz sólida.

Los componentes descritos con anterioridad para las composiciones de administración oral, inyectables o de administración tópica son puramente representativos. Otros materiales, al igual que las técnicas de tratamiento y similares se exponen en la *Part 8 of Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, 1985*, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, que incorporado en la presente solicitud a modo de referencia.

El compuesto de la invención además se puede administrar en formas de liberación prolongada, o desde sistemas de suministro de fármacos de liberación prolongada. Una descripción de materiales de liberación prolongada representativos puede hallarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas que se pueden preparar de acuerdo con esta invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a las siguientes composiciones farmacéuticas.

Formulación 1 – Comprimidos

El compuesto de la invención se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Puede añadirse una cantidad menor de estearato de magnesio como lubricante. Se pueden formarse con la mezcla comprimidos de 240–270 mg (80–90 mg de compuesto activo de amida por comprimido) en una prensa formadora de comprimidos.

Formulación 2 – Cápsulas

El compuesto de la invención se puede mezclar como un polvo seco con un diluyente de almidón en una relación en peso de aproximadamente 1:1. Con la mezcla pueden llenarse cápsulas de 250 mg (125 mg de compuesto activo de amida por cápsula).

Formulación 3 – Líquido

El compuesto de la invención (125 mg) se puede mezclar con sacarosa (1,75 g) y goma de xantano (4 mg), y la mezcla resultante se puede combinar, ser pasada a través de un tamiz U.S. de malla N° 10, y luego ser mezclada con una solución previamente formada de celulosa microcristalina y carboximetil-celulosa sódica (11:89, 50 mg) en agua. Se

pueden diluir con agua, benzoato sódico (10 mg), aromatizante y colorante, y ser añadidos con agitación. Luego se puede añadir con agitación suficiente agua. A continuación, se puede añadir una cantidad adicional de agua suficiente para obtener un volumen total de 5 mL.

Formulación 4 – Comprimidos

- 5 El compuesto de la invención se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Se puede añadir una cantidad menor de estearato de magnesio, como lubricante. Con la mezcla pueden formarse comprimidos de 450–900 mg (150–300 mg de compuesto activo de amida) en una prensa formadora de comprimidos.

Formulación 5 – Inyección

- 10 El compuesto de la invención se puede disolver o poner en suspensión en un medio acuoso inyectable de solución salina estéril tamponada hasta una concentración de aproximadamente 5 mg/mL.

Formulación 6 – Tópica

- 15 Se puede fundir alcohol estearílico (250 g) y vaselina blanca (250 g) a aproximadamente 75°C, y luego se puede añadir una mezcla del compuesto de la invención (50 g), metilparabeno (0,25 g), propilparabeno (0,15 g), laurilsulfato de sodio (10 g) y propilenglicol (120 g) disueltos en agua (alrededor de 370 g), y la mezcla resultante se puede agitar hasta la coagulación.

Métodos de tratamiento

- 20 El compuesto de la invención se puede usar como agente terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos que están causalmente relacionadas o son atribuibles a la actividad anormal de JAK. En particular, las afecciones están relacionadas con la actividad anormal de JAK1 y/o JAK2. Por lo tanto, el compuesto y las composiciones farmacéuticas de la invención encuentran uso como agentes terapéuticos para la prevención y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio del cartilago, malformaciones congénitas del cartilago y enfermedades asociadas a la hipersecreción de IL6, en mamíferos, incluyen seres humanos.

- 25 En aspectos adicionales del método de tratamiento, se proporcionan en la presente solicitud métodos de tratamiento de un mamífero sensible a una afección inflamatoria, o afectado con una afección inflamatoria. Los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección o para la prevención de la afección, de una o más de las composiciones farmacéuticas o del compuesto de la invención, como se describen en esta solicitud. En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.

- 30 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una afección inflamatoria. En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (por ejemplo, asma) y enfermedades intestinales inflamatorias.

- 35 En aspectos adicionales del método de tratamiento, se describen en la presente solicitud métodos de tratamiento de un mamífero sensible a una enfermedad autoinmunitaria, o afectado con una enfermedad autoinmunitaria. Los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección o para la prevención de la afección, de una o más de las composiciones farmacéuticas o del compuesto de la invención descritos en esta solicitud. En una modalidad específica, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.

- 40 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria. En una modalidad específica, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de EPOC, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I y enfermedad intestinal inflamatoria.

- 45 En aspectos adicionales del método de tratamiento, se describen en la presente solicitud métodos de tratamiento de un mamífero sensible a una enfermedad proliferante, o afectado con una enfermedad proliferante, en particular, cáncer (por ejemplo, tumores sólidos, tales como liomiosarcoma uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, LMA o LLA), mieloma múltiple y/o psoriasis.

- 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de una enfermedad proliferante, en particular, cáncer (por ejemplo, tumores sólidos tales como liomiosarcoma uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ejemplo, LMA o LLA), mieloma múltiple y/o psoriasis.

En otro aspecto del método de tratamiento, se describen en la presente solicitud métodos de tratamiento de un mamífero sensible al rechazo de trasplante, o afectado con rechazo de trasplante. En una modalidad específica, la invención proporciona métodos de tratamiento de rechazo de trasplante de órganos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis del rechazo de trasplante. En una modalidad específica, la invención proporciona métodos de tratamiento de rechazo de trasplante de órganos.

- 5 En un aspecto de método de tratamiento se describe en la presente solicitud un método de tratamiento, de prevención o de profilaxis en un mamífero sensible a enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, o afectado con dichas enfermedades, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o de una o más de las composiciones farmacéuticas que se describen en esta solicitud.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago.

- 10 Además, se describe un método de tratamiento de malformaciones congénitas del cartílago, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de una o más de las composiciones farmacéuticas o del compuesto de la invención, descritos en esta solicitud.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de malformaciones congénitas del cartílago.

- 15 En aspectos adicionales del método de tratamiento, se describen métodos de tratamiento de un mamífero sensible a enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, o afectado con dichas enfermedades, en particular, la enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferante mesangial.

- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, en particular, la enfermedad de Castleman o glomerulonefritis proliferante mesangial.

- 25 Como un aspecto más de la invención, se proporciona el compuesto de la invención para uso como un agente farmacéutico, en especial, en el tratamiento o la prevención de las afecciones y enfermedades que se mencionan con anterioridad. Además, se proporciona en esta solicitud el uso de los presentes compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una de las afecciones o enfermedades que se mencionan anteriormente.

- 30 Un régimen particular del presente método comprende la administración a un sujeto que padece una enfermedad que conlleva 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 preferentemente, terminar con los procesos responsables de dicha inflamación. Una modalidad especial del método comprende la administración de una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un sujeto paciente que padece artritis reumatoide, o que es sensible a su desarrollo, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la inflamación en las articulaciones de dicho paciente, y preferentemente, terminar con los procesos responsables de dicha inflamación.

- 35 Otro régimen particular del presente método comprende la administración a un sujeto que padece un estado morbozo caracterizado por la degradación del cartílago o de la articulación (por ejemplo, artritis reumatoide y/o artrosis), de una cantidad eficaz del compuesto de la invención, durante un período de tiempo suficiente para reducir, y preferentemente, terminar los procesos autoperpetuantes responsables de dicha degradación. Una modalidad particular del método comprende la administración de una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un sujeto paciente que padece artrosis, o que es sensible a su desarrollo, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación del cartílago en las articulaciones de dicho paciente, y preferentemente, 40 terminar con los procesos autoperpetuantes responsables de dicha degradación. En una modalidad particular, dicho compuesto puede exhibir propiedades anabólicas y/o anticatabólicas de cartílago.

- Las concentraciones de las dosis de inyección varían de alrededor de 0,1 mg/kg/hora a por lo menos 10 mg/kg/hora, todas ellas, durante desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 horas, y en especial, 24 a 96 horas. Además, se puede administrar un bolo de precarga de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o 45 más, con el fin de lograr concentraciones uniformes adecuadas. Se espera que la dosis máxima total no exceda de alrededor de 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

- Para la prevención y/o el tratamiento de afecciones de larga duración, tales como afecciones degenerativas, el régimen de tratamiento habitualmente se extiende durante muchos meses o años, de modo que se prefiere la dosificación oral por razones de conveniencia y tolerancia del paciente. Con la dosificación oral, son regímenes representativos una a 50 cinco, y especialmente, dos a cuatro, y habitualmente, tres dosis orales al día. Con el uso de estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona desde alrededor de 0,01 hasta alrededor de 20 mg/kg del compuesto de la invención, donde las dosis particulares proporcionan, cada una, desde alrededor de 0,1 hasta alrededor de 10 mg/kg, y en especial, alrededor de 1 a alrededor de 5 mg/kg.

- Las dosis transdérmicas, en general, se seleccionan de manera que proporcionen concentraciones sanguíneas 55 similares o inferiores a las logradas con el uso de dosis de inyección.

Cuando se usa en la prevención del inicio de una afección inflamatoria, el compuesto de la invención se administrará a un paciente en riesgo de desarrollar la afección, habitualmente, por consejo y bajo la supervisión de un médico, en las concentraciones de dosificación que se describen anteriormente. Los pacientes en riesgo de desarrollar una afección particular, en general, incluyen los que tienen antecedentes familiares de la afección, o los que han sido

5 identificados por análisis o cribados genéticos, como particularmente sensibles al desarrollo de la afección.

El compuesto de la invención se puede administrar como el único agente activo, o se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, que incluyen otros compuestos que demuestran la misma o similar actividad terapéutica, y que se ha determinado que son seguros y eficaces para dicha administración combinada. En una modalidad específica, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite la utilización de dosis

10 significativamente menores de cada uno, con el fin de reducir los efectos secundarios observados.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que conlleva inflamación; los agentes particulares incluyen, pero sin limitación, agentes inmunorreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimus, micofenolato mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3, por

15 ejemplo, Orthocolone®), ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de artritis (por ejemplo, artritis reumatoide); los agentes particulares incluyen, pero sin limitación, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), esteroides, DMARD (sigla en inglés de "fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad") sintéticos (por ejemplo, pero sin limitación, metotrexato,

20 leflunomida, sulfasalazina, auranofina, aurotionalato sódico, penicilamina, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina y ciclosporina), y DMARD biológicos (por ejemplo, pero sin limitación, infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab y abatacept).

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de trastornos proliferantes; los agentes particulares incluyen, pero sin limitación: metotrexato, leucovorina, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluoruracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserrelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin™), capecitabina, hidrocóloruro de raloxifeno, inhibidores de EGFR (sigla en inglés de "receptor de factor de crecimiento epidérmico") (por ejemplo, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (sigla en inglés de "factor de crecimiento endotelial vascular") (por ejemplo, Avastin™), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™), Glivec® e inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Además, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con otras terapias que incluyen, pero sin limitación, radioterapia o cirugía. En una modalidad específica, el trastorno proliferante se selecciona de

30 cáncer, enfermedad mieloproliferante o leucemia.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades autoinmunitarias; los agentes particulares incluyen, pero sin limitación: glucocorticoides, agentes citostáticos (por ejemplo, análogos de purina), agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas nitrogenadas (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino y otros), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ejemplo, dactinomicina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-CD25 o anti-CD3 (OTK3), Atgam® y Thymoglobuline®), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones (por ejemplo, IFN-β), proteínas de unión a TNF (sigla en inglés de "factor de necrosis tumoral") (por ejemplo, infliximab (Remicade™), etanercept (Enbrel™) o adalimumab (Humira™)), micofenolato, fingolimod y miriociina.

40

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención del rechazo de trasplantes; los agentes particulares incluyen, pero sin limitación: inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (sigla en inglés de "diana de rapamicina") (por ejemplo, sirolimus, everolimus), antiproliferantes (por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico), corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de receptores anti-IL-2Rα, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, globulina antitimocito (ATG, por sus siglas en inglés), globulina antilinfocito (ALG, por sus siglas en inglés)).

45

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de asma, y/orinitis y/o EPOC; los agentes particulares abarcan, pero sin limitación: agonistas del receptor adrenérgico beta₂ (por ejemplo, salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (para inhalación o en comprimidos), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio), glucocorticoides (para vía oral o para inhalación), agonistas de β₂ de larga acción (por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol, y albuterol oral de liberación prolongada), combinaciones de esteroides para inhalación y broncodilatadores de larga acción (por ejemplo, fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrieno e inhibidores de la síntesis (por ejemplo, montelukast, zafirlukast y zileuton), inhibidores de la liberación de mediador (por ejemplo, cromoglicato y cetotifeno), reguladores biológicos de la respuesta de IgE (por ejemplo, omalizumab), antihistamínicos (por ejemplo, ceterizina, cinarizina, fexofenadina) y vasoconstrictores (por ejemplo, oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

55

Asimismo, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con terapias de emergencia para el asma y/o la EPOC; dichas terapias abarcan la administración de oxígeno o heliox, salbutamol nebulizado o terbutalina (opcionalmente, en combinación con un anticolinérgico por ejemplo, ipratropio), esteroides sistémicos (para vía oral o intravenosa, por ejemplo, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona o hidrocortisona), salbutamol intravenoso, beta-agonistas no específicos, inyectables o para inhalación (por ejemplo, epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol), anticolinérgicos (para vía IV o nebulización, por ejemplo, glicopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina, bamifilina), anestésicos para inhalación que tienen efecto broncodilatador (por ejemplo, isoflurano, halotano, enflurano), ketamina y sulfato de magnesio intravenoso.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de EII (enfermedad intestinal inflamatoria); los agentes particulares incluyen, pero sin limitación: glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, budesonida), agentes inmunomoduladores sintéticos modificadores de la enfermedad (por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y agentes inmunomoduladores biológicos modificadores de la enfermedad (infliximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de LES (lupus eritematoso sistémico); los agentes particulares incluyen, pero sin limitación: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés) tales como antipalúdicos (por ejemplo, plaquenil, hidroxiquina), inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico; fármacos inmunosupresores y analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroides, opiáceos (por ejemplo, dextropropoxifeno y co-codamol), opioides (por ejemplo, hidrocodona, oxicodona, MS Contin, o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo Duragesic.

En una modalidad, el compuesto de la invención se administra de forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la prevención de psoriasis; los agentes particulares incluyen, pero sin limitación: tratamiento tópicos, tales como soluciones para baño, humectantes, cremas con medicación y pomadas que contienen alquitrán mineral, ditranol (antralina), corticoesteroides como desoximetasona (Topicort™), fluocinonida, análogos de vitamina D₃ (por ejemplo, calcipotriol), retinoides de aceite de argán (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos tales como metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxiurea, sulfasalazina, micofenolato mofetilo, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o agentes biológicos, tales como Amevive™, Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ y ustekinumab (un bloqueador de IL-12 e IL-23). Asimismo, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con otras terapias que abarcan, pero sin limitación, fototerapia o fotoquimioterapia (por ejemplo, fototerapia con ultravioleta A (PUVA, por sus siglas en inglés) y psoraleno.

Con la administración conjunta, se incluye cualquier medio para el suministro de dos o más agentes terapéuticos al paciente, como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para el experto. Si bien dos o más agentes se pueden administrarse en forma simultánea en una sola formulación, esto no es esencial. Los agentes se pueden administrar en diferentes formulaciones y en momentos diferentes.

Procedimientos generales de síntesis

Aspectos generales.

El compuesto de la invención y los ejemplos comparativos descritos en el documento WO 2010010190 se pueden preparar a partir de materiales iniciales de fácil obtención, usando los siguientes procedimientos y métodos generales. Se apreciará que cuando se proporcionan condiciones típicas o preferidas de proceso (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reaccionantes, disolventes, presiones, etc.), se pueden usar también otras condiciones de proceso, a menos que se establezca lo contrario. Las condiciones óptimas de reacción pueden variar con los reaccionantes o los disolventes particulares utilizados, si bien dichas condiciones pueden ser determinadas por el experto en la técnica, mediante procedimientos de optimización habituales.

Asimismo, como será evidente para los expertos en la técnica, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales a fin de evitar que ciertos grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, al igual que las condiciones adecuadas para la protección y desprotección, son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describen numerosos grupos protectores y su introducción y retirada en T. W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis, Second Edition*, Wiley, New York, 1991, y en referencias allí citadas.

Los siguientes métodos se presentan con detalle en relación con la preparación del compuesto de la invención, como se define anteriormente, y los ejemplos comparativos. El compuesto de la invención y de los ejemplos comparativos se pueden preparar a partir de reaccionantes y materiales iniciales conocidos o comerciales, por el experto en la técnica de la síntesis orgánica.

Todos los reaccionantes eran de calidad comercial, y se usaron tal como fueron recibidos, sin purificación adicional, a menos que se establezca lo contrario. Se usaron disolventes anhidros comerciales para las reacciones efectuadas en atmósfera inerte. Los disolventes de calidad reactivo se utilizaron en todos los otros casos, a menos que se indique lo contrario. Se efectuó la cromatografía en columna en gel de sílice 60 (35–70 µm). La cromatografía de capa delgada

se llevó a cabo usando placas F-254 de gel de sílice previamente revestidas (espesor: 0,25 mm). Los espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker DPX 400 NMR (400 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) para los espectros de ^1H RMN se expresan en partes por millón (ppm) en relación con tetrametilsilano (δ 0,00), o el pico de disolvente residual apropiado, es decir, CHCl_3 (δ 7,27), como referencia interna. Las multiplicidades se proporcionan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (q), multiplete (m) y ancho (br). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Los espectros de MS de electropulverización se obtuvieron en un espectrómetro Micromass platform LC/MS. Columna utilizada para todos los análisis de LCMS: Waters Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm , 2,1 mm DI x 50 mm L (Part N° 186002350)). HPLC preparatoria: Waters XBridge Prep C18, 5 μm ODB 19 mm DI x 100 mm L (Part N° 186002978). Todos los métodos se efectuaron usando gradientes de MeCN/ H_2O . H_2O contiene o bien TFA al 0,1%, o NH_3 al 0,1%.

Lista de abreviaturas utilizadas en la sección experimental:

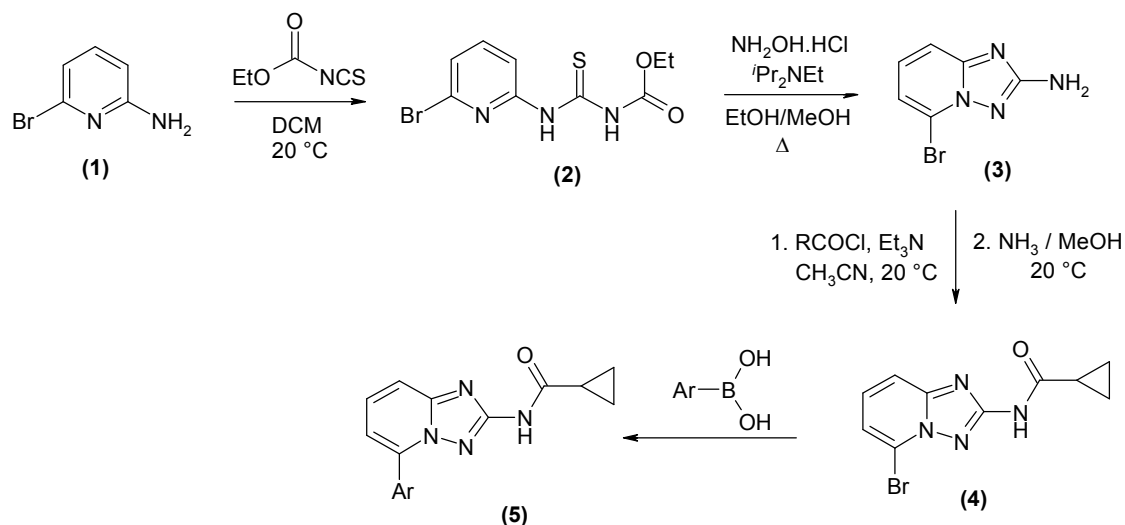
DCM:	Diclorometano
DiPEA:	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
MeCN	Acetonitrilo
BOC	<i>tert</i> -Butiloxi-carbonilo
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPA	Difenilfosforilazida
LC-MS	Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas
Ppm	partes por millón
EtOAc	acetato de etilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
Rt	tiempo de retención
s	singlete
br s	singlete ancho
m	multiplete
d	doblete
PdCl_2dppf	[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II)
TEA	Trietilamina

Preparación por síntesis del compuesto de la invención y de los ejemplos comparativos

El compuesto de la invención y de los ejemplos comparativos se pueden producir de acuerdo con el siguiente esquema de reacción.

Método de síntesis general

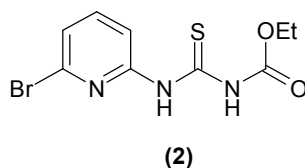
Esquema 1



donde Ar representa fenil-L1-heterocicloalquilo, donde L1 es un enlace, $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CO}-$, y el grupo heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido.

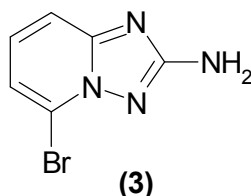
Aspecto general.

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



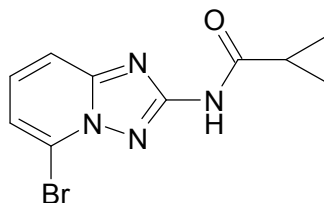
A una solución de 2-amino-6-bromopiridina (**1**) (253,8 g, 1,467 mol) en DCM (2,5 L), enfriada hasta 5°C, se añade isotiocianato de etoxycarbonyl (173,0 mL, 1,467 mol), gota a gota, durante 15 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se deja que se caliente hasta la temperatura ambiente (20°C) y se agita durante 16 horas. La evaporación a vacío proporciona un sólido, que puede ser recogido por filtración, lavado por completo con gasolina (3 x 600 mL) y secado al aire, para obtener el compuesto (**2**). La tiourea se puede usar como tal para la siguiente etapa, sin ninguna purificación. ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 12,03 (1H, br s, NH), 8,81 (1H, d, J 7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, t, J 8,0 Hz, H-4), 7,32 (1H, dd, J 7,7 y 0,6 Hz, H-5), 4,31 (2H, q, J 7,1 Hz, CH_2), 1,35 (3H, t, J 7,1 Hz, CH_3).

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



A una suspensión de hidrócloruro de hidroxilamina (101,8 g, 1,465 mol) en EtOH/MeOH (1:1, 900 mL) se añade *N,N*-diisopropiletilamina (145,3 mL, 0,879 mol), y la mezcla se agita a temperatura ambiente (20°C) durante 1 hora. A continuación, se añade 1-((6-bromo-piridin-2-il)-3-carboetoxi-tiourea (**2**) (89,0 g, 0,293 mol), y la mezcla se calienta lentamente a reflujo (observación: se necesita lavador con lejía para extinguir el H_2S desprendido). Después de 3 horas a reflujo, la mezcla se deja enfriar y se filtra de manera que recoja el sólido precipitado. Se recoge producto adicional mediante la evaporación a vacío del filtrado, la adición de H_2O (250 mL) y filtración. Los sólidos reunidos se lavan sucesivamente con H_2O (250 mL), EtOH/MeOH (1:1, 250 mL) y Et_2O (250 mL); a continuación, se secan a vacío con el fin de obtener el derivado de triazolopiridina (**3**) en forma de un sólido. El compuesto se puede usar como tal en la siguiente etapa, sin ninguna purificación. ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,43–7,34 (2H, m, 2 x aromático-H), 7,24 (1H, dd, J 6,8 y 1,8 Hz, aromático-H), 6,30 (2H, br, NH_2); m/z 213/215 (1:1, $\text{M} + \text{H}^+$, 100%).

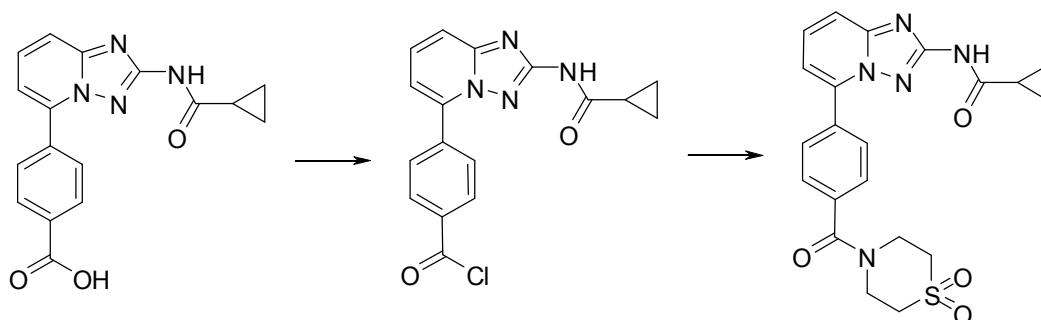
1.1.3. Procedimiento general de monoacilación para obtener el producto intermediario (4):



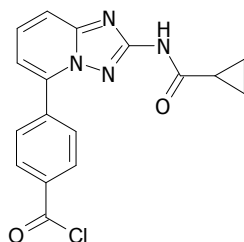
5 A una solución de la 2-amino-triazolopiridina (**3**) (7,10 g, 33,3 mmol) en CH₃CN seco (150 mL) a 5°C se añade Et₃N (11,6 mL, 83,3 mmol), seguido de cloruro de ciclopropanocarbonilo (83,3 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se deja que se caliente hasta la temperatura ambiente, y se agita hasta que se consume todo el material inicial (**3**). Si es necesario, se añade una cantidad adicional de Et₃N (4,64 mL, 33,3 mmol) y cloruro de ciclopropanocarbonilo (33,3 mmol), de manera que se asegure la reacción completa. Después de la evaporación del disolvente a vacío, el residuo resultante se trata con solución de amoníaco metanólico, 7 N (50 mL), y se agita a temperatura ambiente (durante 1–16 horas) para hidrolizar cualquier producto bisacilado. El aislamiento del producto se efectúa mediante la eliminación de los compuestos volátiles a vacío, seguido por la trituración con Et₂O (50 mL). Los sólidos se recogen mediante la filtración, se lavan con H₂O (2 × 50 mL), acetona (50 mL) y Et₂O (50 mL), y luego se secan a vacío para obtener el producto intermedio bromado deseado (**4**).

Método A.*Preparación de compuestos de la invención por acoplamiento de Suzuki (5).*

15 Se añade un ácido bórico apropiado (2 eq.) a una solución de producto intermedio bromado (**4**) en 1,4-dioxano/agua (5:1). Se añaden a la solución K₂CO₃ (2 eq.) y PdCl₂dppf (5%). La mezcla resultante se calienta luego en un microondas a 140°C durante 30 minutos (esta reacción también puede llevarse a cabo mediante el calentamiento tradicional en un baño de aceite a 90°C durante 16 horas en N₂). Se añade agua, y la solución se extrae con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secan sobre MgSO₄ anhidro y se evaporan a vacío. El compuesto final se obtiene después de purificación por medio de la cromatografía instantánea o HPLC preparatoria. HPLC: Waters XBridge Prep C18, 5 µm ODB 19 mm DI x 100 mm L (Part N° 186002978). Todos los métodos utilizan gradientes de MeCN/H₂O. H₂O contiene o bien 0,1% de TFA, o 0,1% de NH₃.

Método B.

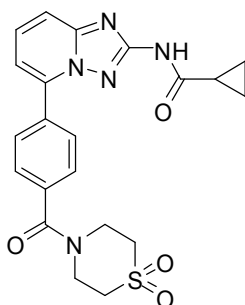
25

B1. 4 Cloruro de 4-[2-(Ciclopropanocarbonil-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il]-benzoilo.

30 Se añaden dos gotas de DMF a una solución de ácido 4-[2-(ciclopropanocarbonil-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il]-benzoico (1 eq.), obtenida por el Método A usando ácido 4-carboxifenilborónico en DCM en atmósfera de N₂. A continuación, se añade gota a gota cloruro de oxalilo (2 eq.), a esta solución resultante (liberación de gas). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la finalización de la reacción por LC-MS, se

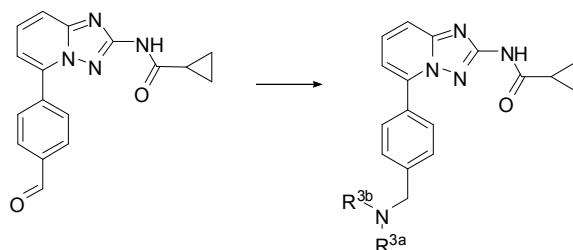
retira el disolvente. El cloruro de ácido bruto se usa sin otra purificación en la siguiente etapa.

B2. Formación de amida (Método general).



- 5 Una amina apropiada (1,1 eq.) y Et₃N (5 eq.) se disuelven en DCM en atmósfera de N₂, y se enfrían a 0°C. El cloruro de ácido (B1, 1 eq.) disuelto en DCM se añade gota a gota esta solución. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de este período de tiempo, se completa la reacción. Se extrae el compuesto con EtOAc y agua, se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄ anhidro. Las capas orgánicas se filtran y se evaporan. El compuesto final se aísla por medio de HPLC preparatoria. HPLC preparatoria: Waters XBridge Prep C18, 5 µm ODB 19 mm DI x 100 mm L (Part N° 186002978). Todos los métodos utilizan gradientes de MeCN/H₂O. El H₂O contiene o bien 0,1% de TFA o 0,1% de NH₃.

Método C.

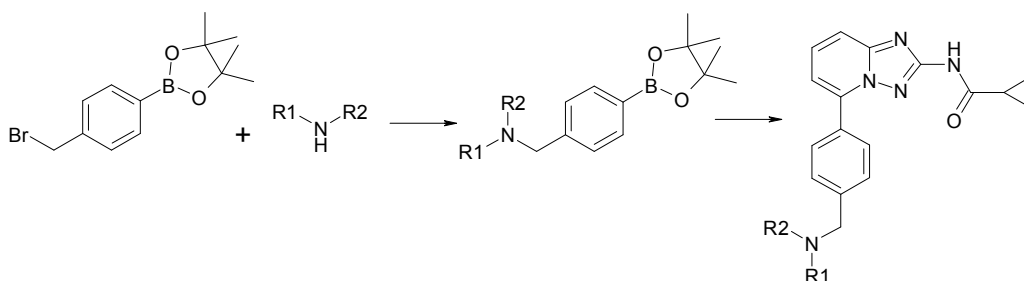


donde R^{3a} o R^{3b} junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos pueden formar un heterocicloalquilo.

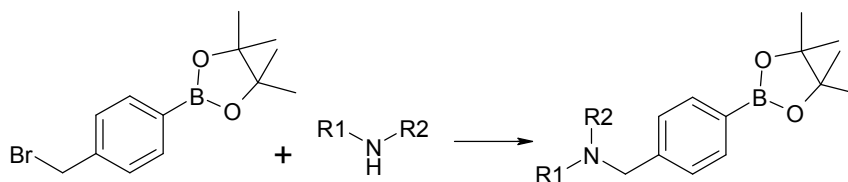
Alquilación reductora (método general).

- 15 Se mezclan una amina apropiada (2 eq.), ácido ciclopropanocarboxílico (por ejemplo, [5-(4-formil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico) preparado por el método A (1 eq.) y Ti(OPr)₄ y se agitan a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se diluye en etanol, y se añade Na(CN)BH₃ (1 eq.). La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se diluye con agua y se filtra. El producto filtrado se lava con etanol. Las fases de disolvente reunidas se evaporan a vacío. El compuesto final se aísla por medio de HPLC preparatoria.

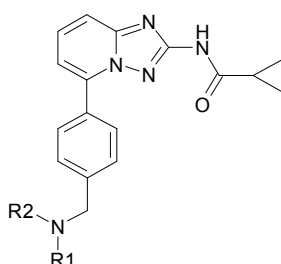
Método D.



donde R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos pueden formar un heterocicloalquilo.

Reacción de alquilación.

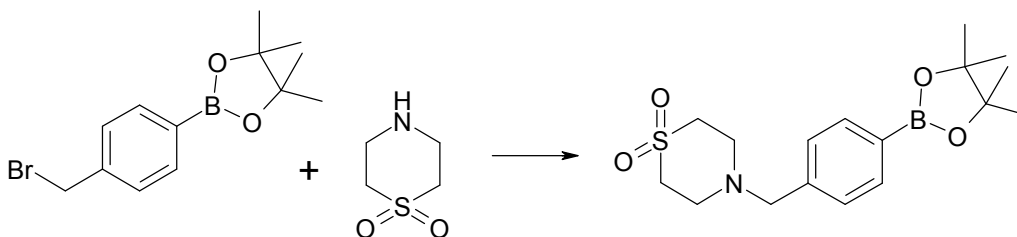
- 5 Se disuelven 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (1 eq.) y Et₃N (2 eq.) (o AgCO₃) en DCM/MeOH (4:1 v:v) bajo N₂, y se añade gota a gota una amina (2 eq.). La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de este período de tiempo, la reacción se completa. El disolvente se evapora. Se extrae el compuesto con EtOAc y agua, se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄ anhidro. Las capas orgánicas se filtran y se evaporan. El compuesto final se aísla por medio de cromatografía instantánea.

Acoplamiento de Suzuki.

- 10 El ácido borónico (2 eq.) obtenido se añade a una solución de (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (**4**) en 1,4-dioxano/agua (5:1). Se añade a la solución K₂CO₃ (2 eq.) y PdCl₂dppf (5%). La mezcla resultante se calienta luego en un microondas a 140°C durante 30 minutos (esta reacción también puede llevarse a cabo mediante el calentamiento tradicional en un baño de aceite a 90°C durante 16 horas bajo N₂). Se añade agua, y la solución se extrae con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secan sobre MgSO₄ anhidro y se evaporan a vacío. El compuesto final se obtiene después de purificación por medio de cromatografía instantánea o HPLC preparatoria. HPLC: Waters XBridge Prep C18, 5 µm ODB 19 mm DI x 100 mm L (Part N° 186002978). Todos los métodos utilizan gradientes de MeCN/H₂O. El H₂O contiene o bien 0,1% de TFA o 0,1% de NH₃.
- 15

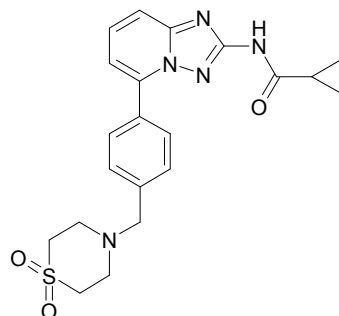
Síntesis del compuesto de la invención y de los ejemplos comparativos.**Compuesto ilustrativo 1 (el compuesto de la invención).**

- 20 *Etapa 1:*



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

Etapa 2: Acoplamiento de Suzuki.

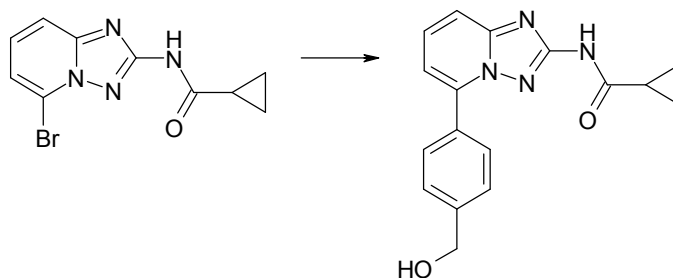


5 Se añadió 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-bencil]-tiomorfolina-1,1-dióxido (1,1 eq.) a una solución de (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico en 1,4-dioxano/agua (4:1). Se añadieron a la solución K_2CO_3 (2 eq.) y $PdCl_2dppf$ (0,03 eq.). La mezcla resultante se calentó luego en un baño de aceite a 90°C durante 16 horas, bajo N_2 . Se añadió agua, y la solución se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporaron a vacío. El compuesto final se obtuvo después purificación por medio de cromatografía instantánea.

10 Alternativamente, después de finalización de la reacción, se añade un depurador de paladio, tal como 1,2-bis(difenilfosfino)etano. La mezcla de reacción se deja enfriar, y se lleva a cabo la filtración. La torta de filtración se vuelve a poner en suspensión en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetona), se separa el sólido mediante filtración, se lava con una cantidad adicional de acetona, y se seca. El sólido resultante se vuelve a poner en suspensión en agua, se añade HCl acuoso, y después de la agitación a T. A., la solución resultante se filtra sobre Celite (Celpure P300). A continuación, se añade NaOH acuoso al producto filtrado, y la suspensión resultante se agita a T. A., el sólido se separa mediante filtración, se lava con agua y se seca por succión. Finalmente, la torta se solubiliza nuevamente en una mezcla de THF/ H_2O , y se trata con un depurador de paladio (por ejemplo, SMOPEX 234) a 50°C. La suspensión se filtra, los disolventes orgánicos se eliminan por medio de evaporación, y la suspensión resultante se lava con agua y metanol, se seca y se tamiza, para obtener el compuesto del epígrafe en forma de una base libre.

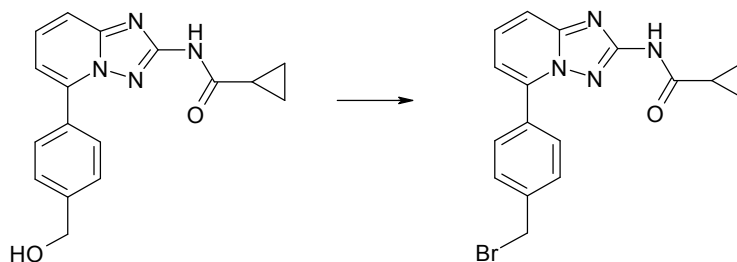
Vía alternativa para el Compuesto ilustrativo 1 (el compuesto de la invención).

20 Etapa 1:



25 Se añade ácido 4-(hidroximetil)fenilborónico (1,1 eq.) a una solución de (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico en 1,4-dioxano/agua (4:1). Se añadieron a la solución K_2CO_3 (2 eq.) y $PdCl_2dppf$ (0,03 eq.). La mezcla resultante se calentó luego en un baño de aceite a 90°C durante 16 horas bajo N_2 . Se añadió agua, y la solución se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporaron a vacío. La mezcla resultante se usó sin purificación adicional.

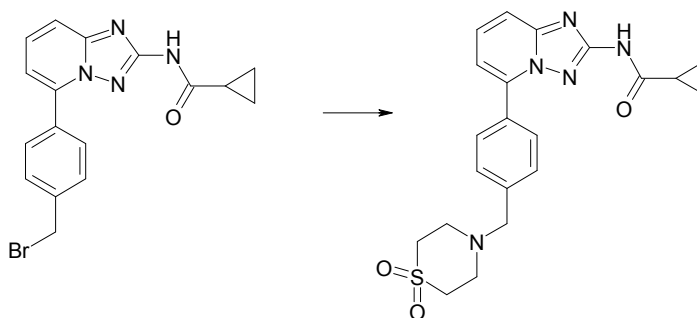
Etapa 2:



A una solución de [5-(4-hidroximetil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico

(1,0 eq.) en cloroformo, se añadió lentamente tribromuro de fósforo (1,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, se detuvo con hielo y agua (20 mL) y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo blanco resultante se trituró en diclorometano/éter dietílico, 2:1, para obtener el producto esperado en forma de un sólido de color blanco.

5 **Etapas 3:**



- 10 Se disolvieron [5-(4-bromometil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (1 eq.) y DIPEA (2 eq.) en DCM/MeOH (5:1, v:v) bajo N_2 , y se añadió gota a gota 1,1-dióxido de tiomorfolina (1,1 eq.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de este período de tiempo, la reacción se completó. El disolvente se evaporó. El compuesto se disolvió en DCM, se lavó con agua y se secó sobre MgSO_4 anhidro. Las capas orgánicas se filtraron y se evaporaron. El compuesto final se aisló por cromatografía en columna usando EtOAc para obtener el producto deseado.

Ejemplos comparativos.

Compuesto comparativo 2.

- 15 Este compuesto se preparó usando el método general A y 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-bencil]-morfolina.

Compuesto comparativo 3.

Este compuesto se preparó usando el método general A e hidrocloreto del éster de pinacol del ácido 3-(4-morfolinometil)-fenilborónico.

- 20 **Compuesto comparativo 4.**

Este compuesto se preparó usando el método general A y éster de pinacol del ácido 2-(4-morfolino)piridina-5-borónico.

Compuesto comparativo 5.

- 25 Este compuesto se preparó usando el método general A y 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]morfolina.

Compuesto comparativo 6.

Este compuesto se preparó usando el método general C y N-metil-piperazina.

Compuesto comparativo 7.

Este compuesto se preparó usando el método general C y piperidina.

- 30 **Compuesto comparativo 8.**

Este compuesto se preparó usando el método general C y amida del ácido piperidina-4-carboxílico.

Compuesto comparativo 9.

Este compuesto se preparó usando el método general C y 1-piperazin-1-il-etanona.

Compuesto comparativo 10

- 35 Este compuesto se preparó usando el método general B y 1,1-dióxido de tiomorfolina.

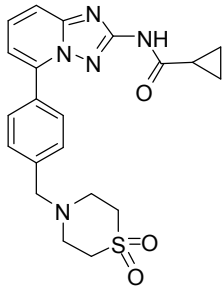
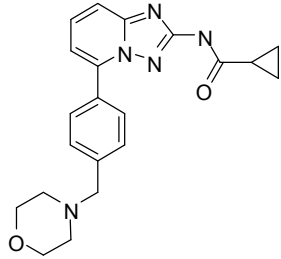
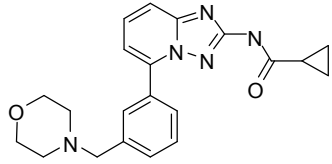
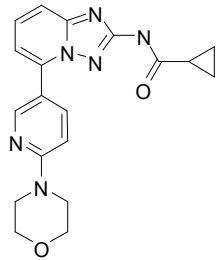
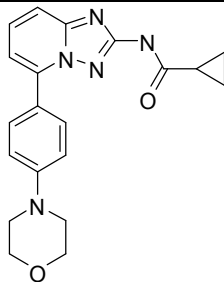
Compuesto comparativo 11.

Este compuesto se preparó usando el método general D y 4,4-difluoropiperidina.

El compuesto de la invención y de los ejemplos comparativos que se han preparado de acuerdo con los métodos de síntesis que se describen en esta solicitud se recogen en la Tabla I que sigue. Los datos espectrales de RMN del

5

Tabla I

Nº del compuesto	Estructuras	Nombre	MW	MS Med,
Compuesto ilustrativo 1		{5-[4-(1,1-dioxo-1-tiomorfolin-4-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	425,51	426
Compuesto comparativo 2		N-(5-(4-(morfolinometil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	377,45	378,20
Compuesto comparativo 3		N-(5-(3-(morfolinometil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	377,45	378,20
Compuesto comparativo 4		N-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	364,41	365,10
Compuesto comparativo 5		N-(5-(4-morfolinofenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	363,42	364,0

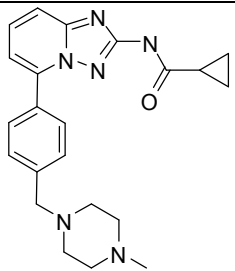
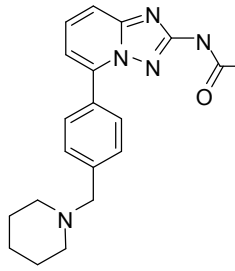
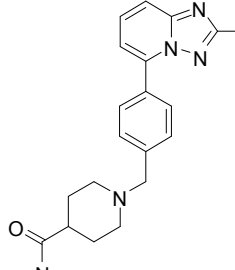
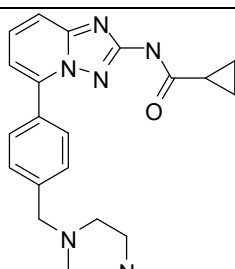
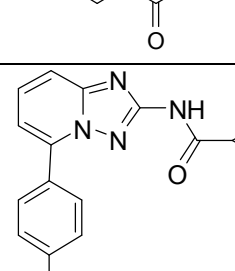
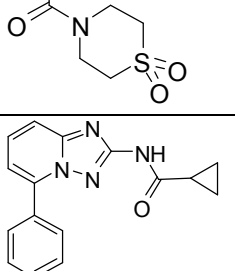
Compuesto comparativo 6		N-(5-(4-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	390,49	391,1
Compuesto comparativo 7		N-(5-(4-(piperidin-1-ilmetil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	375,48	376,1
Compuesto comparativo 8		1-(ciclopropanocarboxamido)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-5-il)bencil)piperidina-4-carboxamida	418,5	419,1
Compuesto comparativo 9		N-(5-(4-((4-acetoilpiperazin-1-il)metil)fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il)ciclopropanocarboxamida	418,5	419,1
Compuesto comparativo 10		{5-[4-(1,1-dioxo-1-tiomorfolina-4-carbonil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	439,49	440,0
Compuesto comparativo 11		{5-[4-(4,4-difluoro-piperidin-1-ilmetil)-fenil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il}-amida de ácido ciclopropanocarboxílico	411,46	412,1

Tabla II: Datos de RMN del compuesto ilustrativo y de los compuestos comparativos de la invención

Nº del compuesto	(δ) Datos de RMN
Compuesto ilustrativo 1	(¹ H, DMSO- <i>d</i> 6) 11,00 (1H, b, NH), 7,99 (2H, d, 2 x ArH), 7,70 (2H, m, 2 x ArH), 7,53 (2H, d, 2 x ArH), 7,30 (1H, dd, ArH), 3,78 (2H, s, CH ₂), 3,14 (4H, b, 4 x CH), 2,93 (4H, b, 4 x CH), 2,03 (1H, b, CH), 0,82 (4H, m, 2 x CH ₂)
Compuesto comparativo 2	(¹ H, CDCl ₃) 10,20 (1H, b, NH), 8,06 (2H, d, ArH), 7,72 (2H, m, ArH), 7,63 (2H, d, ArH), 7,23 (1H, d, ArH), 4,27 (2H, s, CH ₂), 3,99 (4H, m, 2 x CH ₂), 3,50 (2H, br, CH ₂), 2,95 (2H, br, CH ₂), 1,97 (1H, br, CH), 1,17 (2H, m, CH ₂), 0,95 (2H, m, CH ₂)
Compuesto comparativo 3	(¹ H, CDCl ₃) 8,32 (1H, s, ArH), 7,96 (1H, m, ArH), 7,79 (1H, m, ArH), 7,66 (3H, m, ArH), 7,32 (1H, d, ArH), 4,31 (2H, s, CH ₂), 4,05 (4H, b, 2 x CH ₂), 3,6 (2H, br, CH ₂), 3,06 (2H, br, CH ₂), 1,85 (1H, br, CH), 1,12 (2H, m, CH ₂), 0,98 (2H, m, CH ₂)
Compuesto comparativo 4	(¹ H, CDCl ₃) 8,71 (1H, s, NH), 8,35 (1H, m, ArH), 8,27 (1H, br, ArH), 7,57 (2H, d, ArH), 7,07 (1H, m, ArH), 6,78 (1H, d, ArH), 3,86 (4H, m, 2 x CH ₂), 3,66 (4H, m, 2 x CH ₂), 1,6 (1H, br, CH), 1,22 (2H, m, CH ₂), 0,95 (2H, m, CH ₂)
Compuesto comparativo 5	(¹ H, DMSO- <i>d</i> 6) 11,06 (1H, br, NH), 7,98 (2H, d, ArH), 7,67 (1H, m, ArH), 7,59 (1H, d, ArH), 7,25 (1H, m, ArH), 7,08 (2H, m, ArH), 3,67 (4H, m, 2 x CH ₂), 3,25 (4H, m, 2 x CH ₂), 2,02 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, 2 x CH ₂)
Compuesto comparativo 10	(¹ H, DMSO- <i>d</i> 6) 11,03 (1H, b, NH), 8,11 (2H, d, ArH), 7,73 (1H, d, ArH), 7,72 (1H, s, ArH), 7,68 (2H, d, ArH), 7,36 (1H, dd, ArH), 4,01 (2H, b, CH ₂), 3,81 (2H, b, CH ₂), 3,31 (4H, b bajo pico de agua, 2 x CH ₂), 2,03 (1H, b, CH), 0,81 (4H, m, CH ₂)
Compuesto comparativo 11	(¹ H, DMSO- <i>d</i> 6) 10,99 (1H, b, NH), 7,98 (2H, d, 2 x ArH), 7,70 (2H, m, 2 x ArH), 7,50 (2H, d, 2 x ArH), 7,29 (1H, dd, ArH), 3,65 (2H, s, CH ₂), 2,54 (4H, b, 4 x CH), 1,98 (5H, b, 5 x CH), 0,81 (4H, m, 2 x CH ₂)

Ejemplos biológicos.

5 Ejemplo 1. Ensayos *in vitro*

1.1 Ensayo de inhibición de JAK1

El dominio catalítico JAK1 humano recombinante (aminoácidos 850-1154; nº de catálogo 08-144) fue adquirido a Carna Biosciences. Se incubaron 10 ng de JAK1 con 12,5 µg de sustrato poliGT (Sigma nº de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (Tris-HCl, 15 mM, pH 7,5; DTT, 1 mM; Tween-20 al 0,01% ; MgCl₂, 10 mM; ATP no radiactivo 2 µM; 025 µCi de ³³P-gamma-ATP (GE Healthcare, nº de catálogo AH9968), concentraciones finales) con o sin 5 µL de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 25 µL, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, fondo en forma de V). Después de 45 minutos a 30°C, las reacciones se detuvieron por adición de 25 µL/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. La totalidad de la mezcla de reacción de quinasa terminada se transfirió a placas filtro de 96 pocillos prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) (Perkin Elmer nº de catálogo 6005177) usando una cosechadora de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µL por pocillo de una solución de ácido fosfórico 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se añadieron 40 µL/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura usando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa 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 vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

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

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el análisis de los efectos dosis-respuesta en el ensayo de JAK1 y el cálculo del valor de la CI₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se analizó de forma habitual en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución en serie de 1/3, 8 puntos (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Los siguientes compuestos se han analizado para determinar su actividad frente a JAK1 y los valores de la CI₅₀, establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, se recogen a continuación en la Tabla IIIA.

Tabla IIIA: Valores de JAK1 de los compuestos

Nº del compuesto	JAK1 Cl_{50} (nM)
Compuesto ilustrativo 1	47,07, 55,66, 50,1, 48,29
Compuesto comparativo 2	50,91, 52,11
Compuesto comparativo 3	291
Compuesto comparativo 4	1032
Compuesto comparativo 5	1450
Compuesto comparativo 6	3448
Compuesto comparativo 7	504,1
Compuesto comparativo 8	435
Compuesto comparativo 9	334,3
Compuesto comparativo 10	18,16
Compuesto comparativo 11	7,69

1.2 Ensayo de determinación de K_i de JAK1

Para la determinación de K_i , se mezclaron diferentes cantidades de compuesto con la enzima, y la reacción enzimática se siguió como función de la concentración de ATP. El valor K_i se determinó por medio del trazado recíproco doble de Km frente a la concentración del compuesto (Lineweaver–Burk plot). Se usó en el ensayo 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774). El sustrato fue péptido Ulight–JAK–1 50 nM (Tyr1023) (Perkin Elmer, TRF0121). La reacción se llevó a cabo en MOPS, 25 mM, pH 6,8, 0,01%; DTT 2 mM; $MgCl_2$ 5 mM; Brij–35, con diversas concentraciones de ATP y compuesto. El sustrato fosforilado se midió usando un anticuerpo antifosfotirosina marcado con Eu, PT66 (Perkin Elmer, AD0068). Se llevó a cabo la lectura en el instrumento EnVision (Perkin Elmer), con una excitación a 320 nm seguida de emisión a 615 nm y 665 nm.

Por ejemplo, cuando se analizó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor K_i de 39 nM.

1.3 Ensayo de inhibición de JAK2

El dominio catalítico de JAK2 humano recombinante (aminoácidos 808–1132; nº de catálogo PV4210) fue adquirido a Invitrogen. Se incubaron 0,025 mU de JAK2 con 2,5 µg de sustrato poliGT (Sigma nº de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasas (MOPS 5 mM, pH 7,5; $MgAc$ 9 mM; EDTA 0,3 mM; Brij al 0,06% y DTT 0,6 mM; ATP no radiactivo 1 µM; 0,25 µCi de ^{32}P –gamma–ATP (GE Healthcare, nº de catálogo AH9968), concentraciones finales), con o sin 5 µL de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 25 µL, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, fondo en forma de V). Después de 90 minutos a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 25 µL/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. El total de la mezcla de reacción de quinasas terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) (Perkin Elmer, nº de catálogo 6005177), empleando un cosechador de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron seis veces con 300 µL por pocillo de una solución de ácido fosfórico 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se añadieron 40 µL/pocillo de Microscint–20; se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura empleando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasas 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 vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

Porcentaje de inhibición = $\left(\frac{\text{cpm determinadas para la muestra con compuesto de ensayo presente} - \text{cpm determinadas para la muestra con inhibidor de control positivo}}{\text{cpm determinadas en presencia de vehículo} - \text{cpm determinadas para la muestra con inhibidor de control positivo}} \right) \times 100$.

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el ensayo de los efectos dosis-respuesta en el ensayo de JAK2 y el cálculo del valor de la Cl_{50} para cada compuesto. Cada compuesto se analizó de forma habitual en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución en serie 1/3, 8 puntos (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Los siguientes compuestos se han analizado para determinar su actividad frente a JAK2 y los valores de la Cl_{50} , establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, se recogen a continuación en la Tabla IIIB.

Tabla IIIB: Valores IC₅₀ de JAK2 de los compuestos

Nº del compuesto	JAK2 IC ₅₀ (nM)
Compuesto ilustrativo 1	31,37, 41,16, 55,49, 167,34
Compuesto comparativo 2	38,73, 152,3, 184,7
Compuesto comparativo 3	N/A
Compuesto comparativo 4	N/A
Compuesto comparativo 5	1760
Compuesto comparativo 6	5070
Compuesto comparativo 7	6449
Compuesto comparativo 8	7731, 1355
Compuesto comparativo 9	848,7
Compuesto comparativo 10	65,42
Compuesto comparativo 11	15,51

1.4. Ensayo de determinación de Kd de JAK2

- Se usó JAK2 (Invitrogen, PV4210) en una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se efectuó en Hepes 50 mM, pH 7,5, Brij-35 al 0,01%, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM, usando el trazador de quinasa 236, 25 nM (Invitrogen, PV5592) y Eu-anti-GST 2 nM (Invitrogen, PV5594), con diversas concentraciones de compuestos. La detección del trazador se efectuó de acuerdo con el procedimiento de los fabricantes.

Por ejemplo, cuando se analizó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor Kd de 205 nM.

1.5. Ensayo de inhibición de JAK3

- El dominio catalítico de JAK3 humano recombinante (aminoácidos 781–1124; número de catálogo PV3855) fue adquirido a Invitrogen. Se incubaron 0,025 mU de JAK3 con 2,5 µg de sustrato poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (Tris 25 mM, pH 7,5, EGTA 0,5 mM, Na₃VO₄ 0,5 mM, b-glicerolfosfato 5 mM, Triton X-100 al 0,01%, ATP no radiactivo 1 µM, 0,25 de µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968), concentraciones finales), con o sin 5 µL de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO concentración final 1%), en un volumen total de 25 µL, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, fondo en forma de V). Después de 105 minutos a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 25 µL/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. Toda la mezcla de reacción de quinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) (Perkin Elmer, número de catálogo 6005177), empleando un cosechador de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µL por pocillo de una solución de ácido fosfórico 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se añadieron 40 µL/pocillo de Microscint-20, se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura empleando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa restando cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia de un inhibidor de control positivo (estaurosporina 10 µM) de las cpm obtenidas en presencia de vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:
- Porcentaje de inhibición = ((cpm determinadas para la muestra con compuesto de ensayo presente – cpm determinadas para la muestra con inhibidor de control positivo) dividido por (cpm determinadas en presencia de vehículo – cpm determinadas para la muestra con inhibidor de control positivo)) * 100.
- Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el análisis de los efectos dosis-respuesta en el ensayo de JAK3 y el cálculo del valor de la IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se analizó de forma habitual en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución en serie de 1/3, 8 puntos (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO 1%. Cuando la potencia de la serie de compuestos aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).
- Los siguientes compuestos se han analizado para determinar su actividad frente a JAK3 y los valores de la IC₅₀, establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, se recogen a continuación en la Tabla IIIC.

Tabla IIIC: Valores de Cl_{50} de JAK3 de los compuestos

Nº del compuesto	JAK3 Cl_{50} (nM)
Compuesto ilustrativo 1	149,35, 187,3, 189,3, 194,7
Compuesto comparativo 2	2843
Compuesto comparativo 11	194,6

1.6. Ensayo de determinación de K_i de JAK3

Para la determinación de K_i , se mezclan diferentes cantidades de compuesto con la enzima, y la reacción enzimática se sigue como una función de la concentración de ATP. El valor de K_i se determina por medio del trazado recíproco doble de K_m frente a la concentración de compuesto (Lineweaver–Burk plot). Se usó JAK3 (Carna Biosciences, 09CBS–0625B) en una concentración final de 10 ng/mL. El sustrato fue la sal sódica de Poli(Glu, Tyr) (4:1), MW 20 000 – 50 000 (Sigma, P0275). La reacción se efectuó en Tris 25 mM, pH 7,5, Triton X–100 al 0,01%, EGTA, 0,5 mM, DTT 2,5 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, b–glicerolfosfato 5 mM, $MgCl_2$, 10 mM con diversas concentraciones de ATP y compuesto, y se detuvo mediante la adición de ácido fosfórico 150 mM. La medición del fosfato incorporado en el sustrato poliGT se realizó por medio de la carga de las muestras en una placa de filtro (usando un cosechador Perkin Elmer), y el lavado posterior. Se midió el ^{33}P incorporado en poliGT en un contador de centelleo Topcount después de adición de líquido de centelleo a las placas de filtro (Perkin Elmer).

Por ejemplo, cuando se analizó el Compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor de K_i de 353 nM.

1.7. Ensayo de inhibición de TYK2

El dominio catalítico de TYK2 humano recombinante (aminoácidos 871–1187; número de catálogo 08–147) fue adquirido a Carna Biosciences. Se incubaron 5 ng de TYK2 con 12,5 µg de sustrato poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en tampón de reacción de quinasa (Hepes 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, Na_3VO_4 0,2 mM, de NP–40 al 0,1%, ATP no radiactivo 0,1 µM, 0,125 µCi de ^{33}P –gamma–ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968), concentraciones finales), con o sin 5 µL de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO concentración final 1%), en un volumen total de 25 µL, en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner, fondo en forma de V). Después de 90 minutos a 30°C, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 25 µL/pocillo de ácido fosfórico 150 mM. Toda la mezcla de reacción de quinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pocillos prelavadas (ácido fosfórico 75 mM) (Perkin Elmer número de catálogo 6005177) usando una cosechadora de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µL por pocillo de una solución de ácido fosfórico 75 mM, y se selló el fondo de las placas. Se añadieron 40 µL/pocillo de Microscint–20, se selló la parte superior de las placas, y se efectuó la lectura usando el instrumento Topcount (Perkin Elmer). Se calculó la actividad de quinasa 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 vehículo. La capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir esta actividad se determinó de la siguiente manera:

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

Se prepararon series de dilución de dosis para los compuestos, lo que permitió el análisis de los efectos dosis-respuesta en el ensayo de TYK2 y el cálculo del valor de la Cl_{50} para cada compuesto. Cada compuesto se analizó de forma habitual en una concentración de 20 µM, seguida de una dilución en serie de 1/3, 8 puntos (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO 1%. Cuando la potencia de la serie de compuesto aumentó, se prepararon más diluciones, y/o la concentración superior se disminuyó (por ejemplo, 5 µM, 1 µM).

Los siguientes compuestos se han analizado para determinar su actividad frente a TYK2; y los valores de la Cl_{50} , establecidos empleando los ensayos que se describen en esta solicitud, se recogen a continuación en la Tabla IIID.

Tabla IIID: Valores Cl_{50} de TYK2 de los compuestos

Nº del compuesto	TYK2 Cl_{50} (nM)
Compuesto ilustrativo 1	72,7, 73,75, 79,07, 86,77
Compuesto comparativo 2	2096
Compuesto comparativo 11	125,8

1.8. Ensayo de determinación de K_d de TYK2.

Se usó TYK2 (Carna Biosciences, 09CBS–0983D) en una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se

efectuó en Hepes 50 mM, pH 7,5, Brij-35 al 0,01%, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM; usando trazador de quinasa 236, 50 nM (Invitrogen, PV5592) y Eu-anti-GST 2 nM (Invitrogen, PV5594) con diversas concentraciones de compuestos. La detección del trazador se efectuó de acuerdo con el procedimiento de los fabricantes.

Por ejemplo, cuando se analizó el compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor K_d de 376 nM.

5 Ejemplo 2. Ensayos celulares

2.1. Ensayo de señalización de JAK-STAT

Se mantuvieron células HeLa en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Para la transfección se usaron células HeLa a 70% de confluencia. Se transfectaron de forma transitoria 20000 células en 87 µL de medio de cultivo celular, con 40 ng de pSTAT1(2)-informador de luciferasa (Panomics), 8 ng de informador LacZ como informador de control interno y 52 ng de pBSK, usando 0,32 µL de Jet-PEI (Polyplus) como reactivo de transfección por pocillo, en un formato de placa de 96 pocillos. Después de la incubación durante una noche a 37°C, CO₂ al 10%, se retiró el medio de transfección. Se añadieron 75 µL de DMEM + suero de ternero fetal inactivado por calor al 1,5%. Se añadieron 15 µL de compuesto en una concentración de 6,7 x en un período de tiempo de 60 minutos, y luego 10 µL de OSM humana (Peprotech) en una concentración final de 33 ng/mL.

Todos los compuestos se analizaron por duplicado, comenzando desde 20 µM, seguido por una dilución serie de 1/3, 8 dosis en total (20 µM – 6,6 µM – 2,2 µM – 740 nM – 250 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) en una concentración final de DMSO 0,2%.

Después de la incubación durante una noche a 37°C, CO₂ al 10%, las células se lisaron en 100 µL de tampón de lisis/pocillo (PBS, CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂ 0,5 mM, trehalosa al 5%, Tergitol NP9 al 0,025%; BSA al 0,15%).

Se usaron 40 µL de lisado celular para leer la actividad de β-galactosidasa mediante la adición de 180 µL de solución de β-Gal (30 µL de ONPG 4 mg/mL + 150 µL de tampón de β-galactosidasa (Na₂HPO₄ 0,06 M, NaH₂PO₄ 0,04 M, MgCl₂ 1 mM)) durante 20 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de Na₂CO₃ 1 M. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

La actividad de luciferasa se midió usando 40 µL de lisado celular más 40 µL de Steadylite®, como lo describe el fabricante (Perkin Elmer), en el instrumento EnVision (Perkin Elmer).

Se usaron 10 µM de un inhibidor de pan-JAK como control positivo (100% de inhibición). Como control negativo, se usó DMSO al 0,5% (0% de inhibición). Los controles positivo y negativo se utilizaron para el cálculo de los valores z' y de "porcentaje de inhibición" (PIN, por sus siglas en inglés).

Porcentaje de inhibición = ((fluorescencia determinada en presencia de vehículo – fluorescencia determinada para la muestra con compuesto de ensayo presente) dividido por (fluorescencia determinada en presencia de vehículo – fluorescencia determinada para la muestra sin desencadenante)) * 100.

Se trazaron los valores de PIN para los compuestos analizados para la determinación de dosis-respuesta, y se derivaron los valores de la CE₅₀.

35 Tabla IV

Nº del compuesto	CE ₅₀ (nM)
Compuesto ilustrativo 1	922,5, 625,6, 987,7, 1767
Compuesto comparativo 2	>10000, 3322, 2492
Compuesto comparativo 11	740,4

Ejemplo 2.2. Ensayo de señalización con OSM/IL-1β

OSM e IL-1β demostraron sobre-regular sinérgicamente los niveles de MMP13 en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, en una proporción de 15.000 células/pocillo, en un volumen de 120 µL de DMEM (Invitrogen) que contenía FBS al 10% (v/v) y penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen), y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% de. Las células fueron preincubadas con 15 µL de compuesto en medio M199 con DMSO al 2%, 1 hora antes del desencadenamiento con 15 µL de OSM e IL-1β, de modo que se lograra 25 ng/mL de OSM y 1 ng/mL de IL-1β, y se midieron los niveles de MMP13 en medio acondicionado, 48 horas después del desencadenamiento. La actividad de MMP13 se midió usando un ensayo de actividad de captura de anticuerpos. Para este propósito, se revistieron placas de 384 pocillos (NUNC, 460518, MaxiSorb black) con 35 µL de una solución de 1,5 µg/mL anticuerpo MMP13 antihumano (R&D Systems, MAB511), durante 24 horas a 4°C. Después del lavado de los pocillos, dos veces con PBS + Tween al 0,05%, los sitios de unión restantes se bloquearon con 100 µL de leche desnatada seca al 5% (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) en PBS, durante 24 horas a 4°C. A continuación, los pocillos se

lavarón dos veces con PBS + Tween al 0,05%, y se añadieron 35 µL de una dilución 1/10 de líquido sobrenadante de cultivo que contenía MMP13 en tampón de bloqueo diluido 100 veces, y se incubaron los pocillos durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los pocillos dos veces con PBS + Tween al 0,05%, y luego se efectuó la activación de MMP13 mediante la adición de 35 µL de una solución 1,5 mM, de acetato de 4-aminofenilmercúrico (APMA, por sus siglas en inglés) (Sigma, A9563), y la incubación a 37°C durante 1 hora. Los pocillos se lavaron nuevamente con PBS + Tween al 0,05%, y se añadieron 35 µL de sustrato MMP13 (Biomol, P-126, sustrato fluorógeno OmniMMP). Después de la incubación durante 24 horas a 37°C, se midió la fluorescencia del sustrato convertido en un Perkin Elmer Wallac EnVision 2102 Multilabel Reader (excitación de longitud de onda: 320 nm; emisión de longitud de onda: 405 nm).

- 10 Porcentaje de inhibición = ((fluorescencia determinada en presencia de vehículo – fluorescencia determinada para la muestra con compuesto de ensayo presente) dividido por (fluorescencia determinada en presencia de vehículo – fluorescencia determinada para la muestra sin desencadenante)) * 100.

Por ejemplo, cuando se analizó el compuesto ilustrativo 1 en este ensayo, se midió un valor de la CE₅₀ de 2242,5 (± 1098,5) nM.

15 **Ejemplo 2.3. Ensayo de proliferación de PBL**

Se estimulan linfocitos de sangre periférica humana (PBL, por sus siglas en inglés) con IL-2, y se mide la proliferación usando un ensayo de incorporación de BrdU. Los PBL se estimulan en primer lugar durante 72 h con PHA (fitohemaglutinina) para inducir el receptor IL-2 a continuación se dejan de estimular durante 24 h para detener la proliferación de células, y luego se efectúa la estimulación con IL-2 durante otras 72 horas (que incluyen 24 horas de marcado con BrdU). Las células se preincubaban con compuestos de ensayo 1 hora antes de la adición de IL-2. Se cultivan las células en RPMI 1640 que contiene FBS 10% (v/v).

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

2.4.1. Protocolo de estimulación de IFNα

- 25 Con el objetivo de predecir la potencia de los compuestos de ensayo para inhibir las vías de señalización dependientes de JAK1 o JAK2 *in vivo*, se desarrolló un modelo fisiológicamente pertinente *in vitro* usando sangre completa humana. En el ensayo de WBA, se trató *ex vivo* la sangre extraída de voluntarios humanos, que habían dado consentimiento informado, con compuesto (1 hora), y luego se estimuló o bien durante 30 minutos con interferón α (IFNα, vía dependiente de JAK1), o durante 2 horas, con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, vía dependiente de JAK2).

30 *2.4.1.1. Ensayo de fosfo – STAT1*

Para la estimulación de IFNα, se midió el incremento en la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 1 (pSTAT1) por INFα en extractos leucocitarios, usando un ensayo ELISA de pSTAT1. La fosforilación de transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) después del desencadenamiento de interferón alfa (IFN α) es un episodio mediado por JAK1. Se desarrolló el ensayo de fosfo-STAT1, que se usó para medir los niveles de fosfo-STAT1 en extractos celulares, para evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir las vías de señalización dependientes de JAK1.

Se trató *ex vivo* con compuesto (1 h) sangre completa humana, extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, y posteriormente, se estimuló durante 30 minutos con IFNα. El aumento en la fosforilación de STAT1 por INFα en extractos leucocitarios se midió usando un ensayo ELISA de fosfo-STAT1.

- 40 El tampón de lisis de ACK consistió en NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM. El pH del tampón fue 7,3.

Se diluyó un concentrado de tampón de lisis celular 10 x (parte del kit ELISA sándwich PathScan Phospho-STAT1 (Tyr701) Cell Signalling) 10 veces en H₂O. Se añadieron inhibidores de proteinasa al tampón, antes del uso.

Se disolvieron 20 µg de IFNα en 40 µL de H₂O para obtener una solución madre de 500 µg/mL. La solución madre se conservó a -20°C.

- 45 Se preparó una serie de dilución de tres veces del compuesto en DMSO (concentración más alta: 10 mM). A continuación, el compuesto se diluyó adicionalmente en medio (factor de dilución dependiente de la concentración deseada de compuesto final).

2.4.1.1.1. Incubación de sangre con compuesto y estimulación con IFNα

- 50 Se recogió sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se dividió en partes alícuotas de 392 µL. A continuación, se añadieron 4 µL de dilución de compuesto a cada parte alícuota, y las muestras de sangre se incubaron durante 1 hora a 37°C. La solución madre de IFNα se diluyó 1000 veces en medio RPMI para obtener una solución de trabajo de 500 ng/mL. Se añadieron 4 µL de la solución de trabajo de 500 ng/mL a las muestras de sangre (concentración final de IFNα: 5 ng/mL). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

2.4.1.1.2. Preparación de extractos celulares

- Al final del período de estimulación, se añadieron 7,6 mL de tampón ACK a las muestras de sangre, para lisar los eritrocitos. Las muestras se mezclaron invirtiendo los tubos cinco veces, y la mezcla de reacción se incubó en hielo durante 5 minutos. La lisis de los RBC (eritrocitos) debe ser evidente durante esta incubación. Las células se sedimentaron por centrifugación a 300 g, 4°C, durante 7 minutos, y se eliminó el líquido sobrenadante. Se añadieron a cada tubo 10 mL de 1 x PBS, y el sedimento celular se volvió a poner en suspensión. Las muestras se centrifugaron nuevamente durante 7 minutos a 300 g, 4°C. Se eliminó el líquido sobrenadante, y el sedimento se volvió a poner en suspensión en 500 µL de 1 x PBS. A continuación, la suspensión celular se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 mL. Las células se sedimentaron por centrifugación a 700 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el líquido sobrenadante, y el sedimento se disolvió en 150 µL de tampón de lisis celular. Las muestras se incubaron en hielo durante 15 minutos. A continuación, las muestras se conservaron a -80°C hasta posterior procesamiento.

2.4.1.1.3. Medición de la fosforilación de STAT1 por ELISA

Se usó el kit ELISA sándwich Pathscan Phospho-STAT1 (Tyr701) de Cell Signaling (número de catálogo 7234) para la determinación de los niveles de fosfo-STAT1.

- Los extractos celulares se descongelaron en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 16000 g, a 4°C, y se recogieron los lisados aclarados. Mientras tanto, se equilibraron tiras de micropocillos del kit hasta la temperatura ambiente, y se preparó tampón de lavado por dilución 20 x, de tampón de lavado en H₂O. Las muestras se diluyeron dos veces en diluyente de muestra, y se añadieron 100 µL a las tiras de micropocillos. Las tiras se incubaron durante la noche a 4°C.
- Al día siguiente, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µL del anticuerpo de detección a los pocillos. Las franjas se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces nuevamente con tampón de lavado. Se añadieron a cada pocillo 100 µL de anticuerpo secundario unido a HRP, y las muestras se incubaron a 37°C. Después de 30 min, los pocillos se lavaron tres veces nuevamente, y se añadieron 100 µL de sustrato TMB a todos los pocillos. Cuando las muestras se tornaron azules, se añadieron 100 µL de solución de detención, a fin de detener la reacción. Se leyó la absorbancia a 450 nm.

2.4.1.2. Análisis de los datos

La inhibición de la inducción de fosfo-STAT1 por IFN α en extractos celulares se representó frente a la concentración de compuesto, y se derivaron los valores de la IC_{50} usando el programa informático Graphpad. Los datos se retuvieron si R^2 era mayor que 0,8 y la pendiente era menor que 3.

2.4.1.2. ELISA de IL-8

- Para la estimulación del GM-CSF, se mide el aumento de los niveles de interleuquina-8 (IL-8) en plasma, usando un ensayo ELISA de IL-8. La expresión de interleuquina-8 (IL-8) inducida por el factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es un episodio mediado por JAK2. El ensayo ELISA de IL-8, que se puede usar para medir los niveles de IL-8 en muestras de plasma, se ha desarrollado para evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir las vías de señalización dependientes de JAK2.

Se trató *ex vivo* (1 hora) con compuesto sangre humana completa extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, y luego se estimuló durante 2 horas con GM-CSF. Se mide el aumento de los niveles de IL-8 en plasma usando un ensayo ELISA de IL-8.

- Se disuelven 10 µg de GM-CSF en 100 µL de H₂O de modo que se obtenga una solución madre de 100 µg/mL. La solución madre se conserva a -20°C.

Se prepara una serie de dilución de tres veces del compuesto de ensayo en DMSO (concentración más alta: 10 mM). A continuación, el compuesto se diluye adicionalmente en medio (factor de dilución dependiente de la concentración final de compuesto deseada).

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

- Se recoge sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se divide en partes alícuotas de 245 µL. A continuación, se añaden 2,5 µL de dilución de compuesto de ensayo a cada parte alícuota, y las muestras de sangre se incuban durante 1 hora a 37°C. La solución madre de GM-CSF se diluye 100 veces en medio RPMI para obtener una solución de trabajo de 1 µg/mL. Se añaden 2,5 µL de la solución de trabajo de 1 µg/mL a las muestras de sangre (concentración final de GM-CSF: 10 ng/mL). Las muestras se incuban a 37°C durante 2 horas.

2.4.1.2.2. Preparación de muestras de plasma

Las muestras se centrifugan durante 15 min a 1000 g, a 4°C. Se recogen 100 µL del plasma y se conserva a -80°C hasta el uso posterior.

2.4.1.2.3. Medición de los niveles de IL–8 por ELISA

Se usa el kit de inmunoensayo quimioluminiscente de IL–8 humana de R&D Systems (número de catálogo: Q8000B) para determinar los niveles de IL–8.

5 Se prepara tampón de lavado mediante la dilución 10 x de tampón de lavado en H₂O. Se prepara reactivo Glo de trabajo por adición de 1 parte de reactivo Glo 1 a 2 partes de reactivo Glo B, 15 minutos a 4 horas antes del uso.

Se añaden 100 µL de diluyente de ensayo RD1–86 a cada pocillo. A continuación, se añaden 50 µL de muestra (plasma). La placa de ELISA se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente, a 500 rpm. Todos los pocillos se lavan 4 veces con tampón de lavado, y se añaden 200 µL de conjugado de IL–8 a cada pocillo. Después de la incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavan 4 veces con tampón de lavado, y se añaden 100 µL de reactivo Glo de trabajo, a cada pocillo. La placa ELISA se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente (protegida de la luz). Se mide la luminiscencia (tiempo de lectura 0,5 s/pocillo).

2.4.1.3. Resultados

15 Por ejemplo cuando se sometió a este protocolo, el valor pCI₅₀ del compuesto ilustrativo 1 para la inhibición del incremento inducido por INFα de los niveles de pSTAT1 fue 6,23 ± 0,15 (SEM). Esto demuestra que el compuesto 1 inhibe potentemente la vía JAK1 en el entorno fisiológico.

2.4.2. Protocolo de estimulación de IL–6

Además se efectuó un análisis de citometría de flujo para establecer la selectividad *ex vivo* para el compuesto de JAK1 sobre JAK2, usando sangre completa humana. Por lo tanto, se extrajo sangre de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado. La sangre se equilibró luego durante 30 minutos a 37°C con oscilación moderada, y luego se dividió en partes alícuotas en tubos Eppendorf. Se añadió compuesto en diferentes concentraciones, y se incubó a 37°C durante 30 minutos con oscilación moderada, a continuación, se estimuló durante 20 minutos a 37°C, con oscilación moderada, con interleuquina 6 (IL–6), para la estimulación de la vía dependiente de JAK1 o GM–CSF, para la estimulación de la vía dependiente de JAK2. Luego se evaluaron fosfo–STAT1 y fosfo–STAT5 usando el análisis FACS.

25 2.4.2.1. Ensayos de fosfo–STAT1

Para el aumento estimulado por IL–6, de la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 1 (pSTAT1) en leucocitos, se trató *ex vivo*, sangre completa humana extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, con el compuesto durante 30 minutos, y luego se estimuló durante 20 minutos con IL–6. El aumento de la fosforilación de STAT1 por IL–6 en linfocitos se midió usando anticuerpo antifosfo–STAT1 por FACS.

30 Se diluyó el tampón 5 veces con agua destilada el tampón 5X Lyse/Fix (BD PhosFlow, número de catálogo 558049) y se precalentó a 37°C. El tampón diluido Lyse/Fix restante se desechó.

Se disolvieron 10 µg de rhIL–6 (R&D Systems, número de catálogo 206–IL) en 1 mL de PBS, BSA al 0,1% para obtener una solución madre de 10 µg/mL. La solución madre se dividió en partes alícuotas y se conservó a –80°C.

35 Se preparó una serie de diluciones de tres veces del compuesto en DMSO (solución 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%.

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

40 Se recogió sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se dividió en partes alícuotas de 148,5 µL. A continuación, se añadieron 1,5 µL de la dilución de compuesto de ensayo a cada parte alícuota de sangre, y las muestras de sangre se incubaron durante 30 minutos a 37°C, con oscilación moderada. Se añadió una solución madre de IL–6 (1,5 µL) a las muestras de sangre (concentración final 10 ng/mL), y las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos, con oscilación moderada.

2.4.2.1.2. Preparación de leucocitos y marcaje de CD4

45 Al final del período de estimulación, se añadieron inmediatamente a las muestras de sangre 3 mL de tampón 1 X Lyse/Fix precalentado, se sometieron brevemente a vórtice y se incubaron durante 15 minutos a 37°C en un baño de agua, para lisar los eritrocitos y fijar los leucocitos y luego se congelaron a –80°C hasta su uso posterior.

50 Para las siguientes etapas, los tubos se descongelaron a 37°C durante aproximadamente 20 minutos, y se centrifugaron durante 5 minutos a 400 x g a 4°C. El sedimento celular se lavó con 3 mL de 1X PBS frío, y después de la centrifugación, el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 100 µL de PBS que contenía BSA al 3%. Se añadieron anticuerpo anti–CD4 conjugado con FITC o anticuerpo isotipo conjugado con FITC de control, y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

2.4.2.1.3. Permeabilización celular y marcaje con anticuerpo antifosfo-STAT1

Después del lavado de las células con 1X PBS, el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 100 µL de 1 X PBS enfriado con hielo, y se añadieron 900 µL de metanol al 100% enfriado con hielo. Luego las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos para su permeabilización.

- 5 Las células permeabilizadas luego se lavaron con 1X PBS que contenía BSA al 3%, y finalmente se volvieron a poner en suspensión en 80 µL de 1 X PBS, que contenía BSA al 3%.

Se añadieron y mezclaron 20 µL de anticuerpo anti-STAT1 de ratón PE (pY701) o anticuerpo de control isotipo IgG2ak de ratón PE (BD Biosciences, números de catálogo 612564 y 559319, respectivamente) y a continuación se incubaron durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad.

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

2.4.2.1.4 Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

- 15 Se contaron 50000 episodios totales, y se midieron las células positivas para fosfo-STAT1 después de la entrada en células CD4+, en la entrada linfocítica. Se analizaron los datos usando el programa informático FACSDiva, y se calculó el porcentaje de inhibición de la estimulación con IL-6 sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 en células CD4+.

2.4.2.2. Ensayo de fosfo-STAT5

- 20 Para el aumento estimulado con GM-CSF de la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 5 (pSTAT5) en leucocitos, se trata ex vivo sangre completa humana extraída de voluntarios humanos que habían dado consentimiento informado, con el compuesto durante 30 minutos, y posteriormente se estimula durante 20 minutos con GM-CSF. El aumento de la fosforilación de STAT5 por GM-CSF en monocitos se mide usando un anticuerpo antifosfo-STAT5 por FACS.

El tampón 5 X Lyse/Fix (BD PhosFlow, número de catálogo 558049) se diluye 5 veces con agua destilada, y se precalienta a 37°C. El resto del tampón diluido Lyse/Fix se desecha.

- 25 Se disuelven 10 µg de rhGM-CSF (AbCys S. A., número de catálogo P300-03) en 100 µL de PBS, BSA al 0,1%, para obtener una solución madre de 100 µg/mL. La solución madre se conserva en partes alícuotas a -80°C.

Se prepara una serie de diluciones de tres veces del compuesto en DMSO (solución madre, 10 mM). Las muestras tratadas con control reciben DMSO sin el compuesto de ensayo. Todas las muestras se incuban con una concentración final de DMSO del 1%.

- 30 2.4.2.2.1. Incubación de sangre con el compuesto y estimulación con GM-CSF

Se recoge sangre humana en tubos heparinizados. La sangre se divide en partes alícuotas de 148,5 µL. A continuación, se añaden 1,5 µL de dilución de compuesto a cada parte alícuota, y las muestras de sangre se incuban durante 30 minutos a 37°C, con oscilación moderada. Se añade solución madre de GM-CSF (1,5 µL) a las muestras de sangre (concentración final 20 pg/mL), y las muestras se incuban a 37°C durante 20 minutos, con oscilación moderada.

2.4.2.2.2. Preparación de leucocitos y marcaje de CD14

Al final del período de estimulación, se añaden inmediatamente a las muestras de sangre 3 mL de tampón 1 X Lyse/Fix precalentado, se someten brevemente a vórtice y se incuban durante 15 minutos a 37°C en un baño de agua para lisis de los eritrocitos y fijar los leucocitos y luego se congelan a -80°C hasta su uso posterior.

- 40 Para las siguientes etapas, los tubos se descongelan a 37°C durante alrededor de 20 minutos, y se centrifugan durante 5 minutos a 400 x g a 4°C. El sedimento de células se lava con 3 mL de 1X PBS frío, y después de centrifugación el sedimento de células se vuelve a poner en suspensión en 100 µL de PBS que contiene BSA al 3%. Se añade anticuerpo anti-CD14 de ratón FITC (BD Biosciences, número de catálogo 345784) o anticuerpo isotipo IgG2bk de ratón FITC de control (BD Biosciences, número de catálogo 555057), y se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.

2.4.2.2.3. Permeabilización celular y marcaje con anticuerpo antifosfo-STAT5

Después del lavado de las células con 1 X PBS, el sedimento de células se vuelve a poner en suspensión en 100 µL de 1 X PBS enfriado con hielo, y se añaden 900 µL de metanol al 100% enfriado con hielo. Luego las células se incuban a 4°C durante 30 minutos para su permeabilización.

- 50 Las células permeabilizadas se lavan luego con 1 X PBS que contiene BSA al 3%, y finalmente, se vuelven a poner

en suspensión en 80 µL de 1 X PBX que contiene BSA al 3%.

Se añaden 20 µL de anticuerpo anti-STAT5 de ratón PE (pY694) o anticuerpo de control isotipo IgG1κ de ratón PE (BD Biosciences, números de catálogo 612567 y 554680, respectivamente), se mezclan y luego se incuban durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad.

- 5 Las células se lavan luego una vez con 1 X PBS y se analizan en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

2.4.2.2.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

- 10 Se cuentan 50000 episodios totales, y se miden las células positivas para fosfo-STAT5 después la entrada en células CD14+. Los datos se analizaron usando el programa informático FACSDiva, y corresponde al porcentaje de inhibición de la estimulación con GM-CSF, calculado sobre el porcentaje de células positivas para fosfo-STAT5 en células CD14+.

2.4.2.2. Resultados

- 15 Cuando se somete a este protocolo se determinó el porcentaje de inhibición (PIN) obtenido a partir de la media de 3 voluntarios sanos, para cada compuesto de ensayo. Por ejemplo, se analizó el Compuesto ilustrativo 1, y devolvió un valor de $pCI_{50} = 6,08$ en la inhibición de la fosforilación de STAT1.

Ejemplo 3. Modelos in vivo

Ejemplo 3.1 Modelo CIA.

3.1.1. Materiales

- 20 Se adquirieron a Difco coadyuvante de Freund completo (CFA) y coadyuvante de Freund incompleto (IFA). Se adquirieron colágeno bovino tipo II (CII), lipopolisacárido (LPS) y Enbrel a 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 demás reactivos utilizados fueron de calidad reactivo, y todos los disolventes fueron de calidad analítica.

3.1.2. Animales

- 25 Se adquirieron ratas Dark Agouti (machos de 7–8 semanas) a 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*.

3.1.3. Artritis inducida por colágeno (CIA, por sus siglas en inglés)

- 30 Un día antes del experimento, se preparó solución de CII (2 mg/mL) con ácido acético 0,05 M, y se conservó 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. Pueden 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 (solución de CII de concentración 2 mg/mL en solución salina de 0,1 mL de CFA) el día 9. Este método de inmunización fue modificado a partir de los métodos publicados (Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005).

3.1.4. Diseño del estudio

- 40 Los efectos terapéuticos de los compuestos se analizaron en el modelo CIA en ratas. Las ratas se dividieron de forma aleatoria en grupos iguales, donde 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.). Se analizó típicamente un compuesto de interés en tres dosis, por ejemplo, 3, 10, 30 mg/kg, p. o.

3.1.5. Evaluación clínica de la artritis

- 45 La artritis se clasifica de acuerdo con el método de Khachigian 2006, Lin *et al.*, 2007, y Nishida *et al.*, 2004. La hinchazón de cada una de las cuatro patas se clasifica con la puntuación artrítica de siguiente manera: 0 - sin síntomas; 1 - leve, aunque enrojecimiento e hinchazón definidos de un tipo de articulación, tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dedos individuales, sin consideración del número de dedos afectados; 2 - enrojecimiento e hinchazón moderados de dos o más tipos de articulaciones; 3: enrojecimiento e hinchazón graves de la pata completa, incluyendo los dedos; 4 - máxima inflamación de la extremidad, con afectación de múltiples articulaciones (máxima puntuación de artritis clínica acumulativa 16 por animal) (Nishida *et al.*, 2004).

Para permitir el meta-análisis de múltiples estudios, los valores de la puntuación clínica se normalizaron de la siguiente manera:

AUC de puntuación clínica (puntuación AUC): Se calculó el área bajo la curva (AUC) desde el día 1 hasta el día 14 para cada rata individual. El AUC de cada animal se dividió por el AUC medio obtenido para el vehículo en el estudio del cual se obtuvieron los datos de dicho animal, y se multiplicó por 100 (es decir, el AUC se expresó como un porcentaje del AUC medio del vehículo por estudio).

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

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

Clínicamente, el descenso de peso corporal se asocia con la artritis (Shelton *et al.*, 2005; Argiles *et al.*, 1998; Rall, 2004; Walsmith *et al.*, 2004). En consecuencia, los cambios en el peso corporal después del inicio de la artritis se pueden usar como un criterio de valoración no específico para 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:

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

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

3.1.7. Radiología

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

3.1.8. Histología

Después del análisis radiológico, las patas traseras de los ratones se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 10% (pH 7,4), se descalcificaron con descalcificante óseo rápido para histología fina (Laboratories Eurobio) y se incrustaron en parafina. Con el fin de garantizar la evaluación extensa de las articulaciones artríticas, se cortaron por lo menos cuatro secciones en serie (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). Los exámenes histológicos para establecer la inflamación sinovial y el daño óseo y de cartilago se efectuaron en tipo doble ciego. En cada pata, se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron la infiltración celular; la gravedad del paño sinovial; la erosión de cartilago; y la erosión ósea. La clasificación se efectuó de la siguiente manera: 1 - normal; 2 - leve; 3: moderada; 4 - notable. Estas cuatro puntuaciones se suman, y se representan como una puntuación adicional, es decir, la "puntuación total de AR".

3.1.9. Análisis por tomografía microcomputarizada (µCT) del calcáneo (hueso del talón)

La degradación ósea observada en AR se produce especialmente en el hueso cortical, y puede ser revelada por el análisis de µCT (Sims NA *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 50 (2004) 2338–2346: "Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis"; Oste L *et al.*, *ECTC Montreal 2007*: "A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry"). Después del escaneo y de la reconstrucción de volumen tridimensional del hueso calcáneo, se mide la degradación ósea como número de objetos separados presentes por diapositiva, aislados *in silico* perpendiculares al eje longitudinal del hueso. Cuanto mayor es la cantidad de hueso degradada, más objetos separados se miden. Se analizan 1000 rodajas, distribuidas uniformemente a lo largo del calcáneo (espaciadas aproximadamente 10,8 µm).

3.1.10. PK en estado estacionario

El día 7 u 11, se recogieron muestras de sangre en el seno retroorbital, con litio-heparina 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 conservaron a -20°C para análisis pendiente. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de ensayo por medio de un método por LC-MS/MS, en el cual el espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de electropulverización positiva. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando Winnonlin® (Pharsight®, Estados Unidos), y se supuso que los niveles plasmáticos de predosis eran iguales a los niveles plasmáticos a las 24 horas.

La Tabla V expuesta a continuación resume los resultados obtenidos para varios parámetros PK, para el compuesto de la invención y un ejemplo comparativo, lo que ilustra las mejores propiedades de PK (por ejemplo, C_{max} , $T_{1/2}$) del compuesto de la invención.

Tabla V

		Compuesto ilustrativo 1 PO (mg/kg/día)						Compuesto comparativo 2 PO (mg/kg/día)	
		0,1	0,3	1	3	10	30	10	30
$C_{\text{máx}}$	(ng/mL)	5,18	19,3	102	363	1.167	3.805	867	2630
$T_{\text{máx}}$	(h)	3	1	1	1	1	1	1	1
AUC (0–24h)	(ng·h/mL)	30	163	931	1.932	7.172	27.767	2019	7809
$T_{1/2}$	(h)	NC	NC	3,6	5,6	4,5	3,9	1,17	3,36

3.1.11. Resultados.

La Tabla VI a continuación resume los resultados obtenidos para el Compuesto ilustrativo 1 y el Compuesto comparativo 2 en el modelo CIA de rata; un “*” indica que hubo una mejoría estadísticamente significativa en la puntuación, $p < 0,05$ en frente al control sin tratar.

Tabla VI

Compuesto	Dosis (mg/kg/día)	Evaluación clínica [§]		Hinchazón de patas	Puntuación de Larsen
		Puntuación del criterio de valoración	Puntuación AUC		
Compuesto ilustrativo 1	0,1	*	*		
	0,3	*	*	*	
	1	*	*	*	
	3	*	*	*	*
Compuesto comparativo 2	10	*			
	30	*		*	*

§ – “Puntuación clínica” se refiere a la puntuación AUC normalizada/puntuación del criterio de valoración normalizada obtenido para el compuesto ilustrativo 1, y la puntuación de AUC/puntuación de criterio de valoración para el compuesto comparativo 2.

El Compuesto ilustrativo 1 exhibió mejoras estadísticamente significativas en los valores de la puntuación clínica normalizada (calculados como AUC o como la diferencia desde el día 1 al día 14) en una dosis de 0,1 mg/kg. Además, se observaron un aumento estadísticamente significativo en la lectura de hinchazón de patas y en la puntuación de Larsen con las dosis de 0,3 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente. En contraste, el compuesto comparativo 2 exhibió mejoras estadísticamente significativas solo en los valores de puntuación clínica normalizada (el día 14), con una dosis de 10 mg/kg. Asimismo, se observaron un aumento estadísticamente significativo en la lectura de hinchazón de patas y en la puntuación de Larsen con las dosis de 30 mg/kg. Por lo tanto, el compuesto ilustrativo 1 muestra una mejora de la eficacia de 100 veces con relación al compuesto comparativo 2, cuando se comparan las dosis orales. En particular, con una dosis de 3 mg/kg para el compuesto ilustrativo 1, se observaron mejoras estadísticamente significativas en todas las mediciones, sin embargo, una dosis mayor de compuesto comparativo 2 logró solo una mejora estadísticamente significativa en la puntuación clínico. Esta mejora de la potencia *in vivo* no puede ser atribuida

a la mayor exposición del compuesto, ya que puede observarse que la AUC (0–24h) es menor para el compuesto ilustrativo 1 en las dosis de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg/día, en comparación con el compuesto comparativo 2 en la dosis de 10 mg/kg/día.

Ejemplo 3.2. Modelo de choque septicémico

- 5 La inyección de lipopolisacárido (LPS, por sus siglas en inglés) induce una rápida liberación de factor de necrosis tumoral soluble (TNF–alfa) en la periferia. Este modelo se usó para analizar los probables bloqueadores de la liberación de TNF *in vivo*.

10 Se trataron seis ratones hembra BALB/cJ (20 g) por grupo, con la dosis propuesta, una vez, p.o. Treinta minutos más tarde, se inyectó LPS (15 µg/kg; *E. Coli* serotipo 0111:B4) i.p. Noventa minutos más tarde, los ratones se sacrificaron y se recogió la sangre. Se determinaron los niveles de TNF alfa en circulación usando equipos comerciales de ELISA. Se utilizó dexametasona (5 µg/kg) como compuesto antiinflamatorio de referencia. Se analizaron los compuestos seleccionados en una o múltiples dosis, por ejemplo, 3 y/o 10 y/o 30 mg/kg, p.o.

El compuesto ilustrativo 1 y los compuestos comparativos 2 y 10 fueron activos en una dosis de 30 mg/kg, p.o.

Ejemplo 3.3. Modelo MAB

- 15 El modelo MAB permite una rápida evaluación de la modulación de una respuesta inflamatoria de tipo AR por agentes terapéuticos (Kachigian L. M., *Nature Protocols* (2006), 2512–2516: “Collagen antibody–induced arthritis”). Se inyecta, i. v., a ratones DBA/J un cóctel de mAb dirigidos contra colágeno II. Un día después, se inicia el tratamiento con compuesto (vehículo: HPβCD 10% (v/v)). Después de tres días, los ratones reciben una inyección de LPS, i.p. (50 µg/ratón), que logra un rápido inicio de la inflamación. El tratamiento con compuesto continúa hasta 10 días después de la inyección de los mAb. Se lee la inflamación por medio de la medición de la hinchazón de las patas, y el registro de la puntuación clínica de cada pata. Se presenta la puntuación de artritis clínica acumulativa de cuatro extremidades para mostrar la gravedad de la inflamación. Se aplica un sistema de puntuación a cada extremidad usando una escala de 0–4, siendo 4 la inflamación más grave.

- 0 Libre de síntomas
- 1 Leve, aunque enrojecimiento e hinchazón definidos de un tipo de articulación, tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dedos individuales, sin consideración del número de dedos afectados
- 2 Enrojecimiento e hinchazón moderados de dos o más tipos de articulaciones
- 3 Enrojecimiento e hinchazón graves de la pata entera, incluyendo los dedos
- 4 Inflamación máxima de la extremidad, con afectación de múltiples articulaciones

Ejemplo 3.4. Modelos oncológicos

- 25 Los modelos *in vivo* para la validación de la eficacia de moléculas pequeñas para enfermedades mieloproliferantes inducidas por JAK2 están descritos por Wernig *et al.*, *Cancer Cell*, 13, 311, 2008, y Geron *et al.*, *Cancer Cell*, 13, 321, 2008.

Ejemplo 3.5. Modelo de EII (enfermedad intestinal inflamatoria) de ratón

- 30 Los modelos *in vitro* e *in vivo* para la validación de la eficacia de moléculas pequeñas para la EII están descritos por Wirtz *et al.* 2007.

Ejemplo 3.6. Modelo de asma de ratón

Los modelos *in vitro* e *in vivo* para la validación de la eficacia de moléculas pequeñas para asma están descritos por Nials *et al.*, 2008; Ip *et al.*, 2006; Pernis *et al.*, 2002; Kudlacz *et al.*, 2008.

- 35 **Ejemplo 4: Farmacocinética, DMPK (sigla en inglés de “metabolismo de fármacos y farmacocinética”) y ensayos de toxicidad**

Ejemplo 4.1. Solubilidad termodinámica

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

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

Después de 24 h, se transfieren 800 µL de la muestra a un tubo Eppendorf y se centrifugan 5 minutos a 14000 rpm.

Luego se transfieren 200 µL del líquido sobrenadante de la muestra a una MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50), y se filtra el líquido sobrenadante (0,33-0,40 atm (10–12" de Hg)) con la ayuda de un colector a vacío, hacia una placa limpia Greiner de polipropileno, de 96 pocillos, de fondo en forma de V, (número de catálogo 651201). Se diluyen 5 µL del filtrado en 95 µL (F20) del mismo tampón utilizado para la incubación en la placa que contiene la

5 curva estándar (Greiner, número de catálogo 651201).

Se prepara inmediatamente la curva estándar para el compuesto en DMSO, iniciando desde una solución madre de DMSO 10 mM, diluida, factor 2, en DMSO (5000 µM), y luego diluida adicionalmente en DMSO hasta 19,5 µM. Luego se transfieren 3 µL de la serie de dilución a partir de 5000 µM, hasta una mezcla de 97 µL de acetonitrilo–tampón (50/50). El intervalo de concentración final fue 2,5 a 150 µM.

10 Se sella la placa con esterillas de sellado (MA96RD–04S, www.kinesis.co.uk), y se miden las muestras a temperatura ambiente en LCMS (ZQ 1525, de Waters) en condiciones optimizadas, usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

Las muestras se analizaron en LCMS con un caudal de 1 mL/min. El disolvente A consiste en amoníaco 15 mM, y el disolvente B es acetonitrilo. La muestra se aplica por pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3.5 µM (2,1 x 30 mm) de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de aplicación total de 2 minutos, y varía de 5% de B a 95% de B.

Se analizan las áreas de los picos con la ayuda del paquete de programas informáticos Masslynx, y se representan las áreas pico de las muestras frente a la curva estándar para obtener la solubilidad del compuesto.

Los valores de solubilidad se expresan en µM o µg/mL.

20 **Ejemplo 4.2. Solubilidad en agua**

Partiendo de una solución madre 10 mM en DMSO, se preparó una dilución en serie del compuesto en DMSO. La serie de dilución se transfirió a una placa Maxisorb 96 NUNC de fondo F (número de catálogo 442404), y se añadió tampón de fosfato 0,2 M, pH 7.4, o tampón de citrato 0,1 M, pH 3,0, a temperatura ambiente.

25 La concentración final varió de 200 µM a 2,5 µM en 5 etapas iguales de dilución. La concentración final de DMSO no excedió de 2%. Se añadió pireno 200 µM, a los rincones de cada placa de 96 pocillos, que sirvieron como puntos de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

Las placas de ensayo se sellaron y se incubaron durante 1 hora a 37°C, mientras se agitaba a 230 rpm. A continuación, las placas se escanearon en un microscopio de luz blanca para obtener imágenes individuales del precipitado por concentración. Se analizó el precipitado y se convirtió en un número, que se representó en un gráfico. La primera

30 concentración en la cual el compuesto aparece disuelto por completo es la concentración que se indica 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.

Tabla VII

Nº del compuesto	pH 3,0 (µg/mL)	pH 7,4 (µg/mL)
Compuesto ilustrativo 1	>85	>85
Compuesto comparativo 2	>38	>38
Compuesto comparativo 10	>87,9	>87,9

35

Ejemplo 4.3. Unión de proteína plasmática (diálisis en equilibrio)

Una solución madre 10 mM del compuesto en DMSO se diluyó con un factor 5 en DMSO. Esta solución se diluyó adicionalmente en plasma de perro, ratón, rata o humano recién descongelado (BioReclamation INC), con una concentración final de 10 µM y una concentración final de DMSO de 0,5% (5,5 µL en 1094,5 µL de plasma en una

40 placa de 96 pocillos PP–Masterblock (Greiner, número de catálogo 780285)).

Se preparó una placa Pierce Red Device con inserciones (ThermoScientific, número de catálogo 89809) y se llenó con 750 µL de PBS la cámara de tampón y 500 µL del plasma enriquecido, la cámara de plasma. La placa se incubó durante 4 horas a 37°C, mientras se agitaba a 230 rpm. Después de la incubación, se transfirieron 120 µL de ambas cámaras a 360 µL de acetonitrilo en una placa PP de 96 pocillos profundos de fondo redondo (Nunc, número de

45 catálogo 278743), que se selló con una tapa de papel aluminio. Las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 minutos. Esta placa se centrifugó luego 30 min a 1200 rcf a 4°C, y el líquido sobrenadante se transfirió a una placa PP de 96 pocillos de fondo en forma de V (Greiner, 651201) para el análisis por LCMS.

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

- 5 Las muestras se analizaron por LCMS con un caudal de 1 mL/min. El disolvente A consistió en amoníaco 15 mM, y el disolvente B fue acetonitrilo. La muestra se aplicó por pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3,5 μ M (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tuvo un tiempo de aplicación total de 2 minutos, y varió de 5% de B a 95% de B.

El área del pico del compuesto en la cámara de tampón y la cámara de plasma se consideró 100% de compuesto. El porcentaje asociado a plasma se obtuvo a partir de estos resultados, y se recogió como porcentaje asociado a plasma.

- 10 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.

Tabla VIII

Número del compuesto	Humano (%)	Rata (%)
Compuesto ilustrativo 1	76,4	65,7
Compuesto comparativo 2	70,5	64,5
Compuesto comparativo 10	n/a	51
Compuesto comparativo 11	91,25	76,5

Ejemplo 4.4. Estabilidad microsómica

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

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

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

Se preparó una solución de trabajo final que contenía microsomas hepáticos (Xenotech) de una especie de interés (humana, ratón, rata, perro), G6PDH previamente descrito y cofactores, y esta mezcla se incubó durante no más de 20 minutos a temperatura ambiente.

- 25 Se añadieron 30 μ L de la dilución de compuesto precalentada a 40 μ L de agua precalentada en los tubos Matrix, y se añadieron 30 μ L de la mezcla microsómica. Las concentraciones de reacción finales fueron compuesto 3 μ M, 1 mg de microsomas, 0,4 U/mL de G6PDH, $MgCl_2$ 3,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM; y NADP⁺ 1,3 mM.

- 30 Para medir el porcentaje restante de compuesto en el tiempo cero se añadió MeOH o can (1:1) al pocillo, antes de la adición de la mezcla microsómica. Las placas se sellaron con sellos Matrix Septra TM (Matrix, número de catálogo 4464) y se sacudieron durante algunos segundos para garantizar la mezcla completa de todos los componentes.

Las muestras cuya reacción no se detuvo se incubaron a 37°C, 300 rpm, y después de 1 hora de incubación, la reacción se detuvo con MeOH canACN (1:1).

- 35 Después de detener la reacción, las muestras se mezclaron y se colocaron en hielo durante 30 minutos para precipitar las proteínas. Las placas se centrifugaron luego 30 minutos a 1200 rcf a 4°C, y se transfirió el líquido sobrenadante a una placa PP de 96 pocillos de fondo en forma de V (Greiner, 651201) para el análisis por LCMS.

Estas placas se sellaron con esterillas de sellado (MA96RD-04S) de www.kinesis.co.uk, y las muestras se midieron a temperatura ambiente por LCMS (ZQ 1525 de Waters) en condiciones optimizadas usando Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula original.

- 40 Las muestras se analizaron por LCMS con un caudal de 1 mL/min. El disolvente A consistió en amoníaco 15 mM, y el disolvente B fue metanol o acetonitrilo, de acuerdo con la solución de detención utilizada. Las muestras se aplicaron por pulverización de ion positivo en una columna XBridge C18, 3,5 μ M (2,1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tuvo un tiempo de aplicación total de 2 minutos, y varió de 5% de B a 95% de B.

- 45 El área del pico del compuesto original en el tiempo 0 se consideró que era el 100% restante. El porcentaje restante después de 1 hora de incubación se calculó a partir del tiempo 0, y se calculó como el porcentaje restante. La solubilidad del compuesto en la concentración de ensayo final en tampón se examinó por medio de un microscopio, y

se recogen los resultados.

Los datos sobre la estabilidad microsómica se expresan como porcentaje de la cantidad total de compuesto restante después de 60 minutos.

Tabla IX

Número del compuesto	Humano (%)	Rata (%)
Compuesto ilustrativo 1	87,2	65,6
Compuesto comparativo 2	73	38
Compuesto comparativo 10	102	89
Compuesto comparativo 11	51	26

5

Ejemplo 4.5. Permeabilidad de Caco-2.

Se efectuaron ensayos bidireccionales de Caco-2 como se describe a continuación. Se adquirieron células Caco-2 de la European Collection of Cell Cultures (ECACC, número de catálogo 86010202) y se usaron después de un cultivo celular de 21 días en placas de 24 pocillos Transwell (Fisher TKT-545-020B).

- 10 Se sembraron 2×10^5 células/pocillo en medio de cultivo en 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 adquiridos a Sigma) en solución salina equilibrada de Hanks que contenía HEPES 25 mM (pH 7,4), y se añadieron o bien a las cámaras apicales (125 µL) o basolaterales (600 µL) del montaje de placas Transwell en una concentración de 10 µM, con una concentración final de DMSO de 0,25%.

15

Se añadieron 50 µM de Lucifer Yellow (Sigma) al tampón donador, en todos los pocillos para evaluar la integridad de las capas celulares mediante el control de la penetración de Lucifer Yellow. Debido a que Lucifer Yellow (LY) no puede penetrar libremente las barreras lipófilas, un alto grado de transporte de LY indica escasa integridad de la capa celular.

20

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

Se midió el Lucifer Yellow 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 del lado basolateral y apical.

25

Se midieron las concentraciones de compuesto en las muestras por medio de la cromatografía líquida de alto rendimiento/espectroscopia de masas (LC-MS/MS).

Los valores de permeabilidad aparente (P_{app}) se calcularon a partir de la relación:

$$P_{app} = \frac{[\text{compuesto}]_{\text{aceptor final}} \times V_{\text{aceptor}}}{([\text{compuesto}]_{\text{donador inicial}} \times V_{\text{donador}})} \times \frac{1}{T_{inc} \times V_{\text{donador}} / \text{área de la superficie} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/s}}$$

V = volumen de cámara.

30

T_{inc} = tiempo de incubación.

Área de la superficie = 0,33 cm².

Las relaciones de salida, como indicación de la salida activa desde la superficie celular apical, se calcularon usando la relación $P_{app} B > A / P_{app} A > B$.

Se usaron los siguientes criterios de aceptación del ensayo:

35

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

Rodamina 123 o Vinblastina: valor de P_{app} ($A > B$) ≤ 5 ($\times 10^{-6}$ cm/s) con relación de salida ≥ 5 .

Permeabilidad de Lucifer Yellow: ≤ 100 nm/s.

Tabla X

Número del compuesto	P _{ap} A>B (x 10 ⁻⁶ cm/s)	Relación de salida
Compuesto ilustrativo 1	3,33	15,7
Compuesto comparativo 2	25	0,95
Compuesto comparativo 10	0,05	97,6
Compuesto comparativo 11	36,5	0,9

Ejemplo 4.6. Estudio farmacocinético en roedores**4.6.1. Animales**

- 5 Se obtuvieron ratas Sprague–Dawley (machos, de 5–6 semanas) de Janvier (Francia). Las ratas se aclimataron durante por lo menos 7 días antes del tratamiento, y se mantuvieron con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (07:00 – 19:00). La temperatura se mantuvo a aproximadamente 22°C, y se les proporcionó alimentos y agua *ad libitum*. Dos días antes de la administración de los compuestos 1 y 2, las ratas se sometieron a cirugía para colocarles un catéter en la vena yugular, bajo anestesia de isoflurano. Después de la cirugía, las ratas se alojaron de forma individual. Las ratas fueron privadas de alimentos durante por lo menos 16 horas antes de la dosificación oral, y 6 horas después. Se proporcionó agua *ad libitum*.

4.6.2. Estudio farmacocinético

- 15 Se formularon los compuestos en PEG200/solución salina fisiológica (60/40) para la vía intravenosa, y en metilcelulosa al 0,5% (compuesto ilustrativo 1 y compuesto comparativo 2) e hidroxipropil-β-ciclodextrina al 10%, pH 3 (compuesto 11), 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 caudal en una concentración de 1 mg/kg, con un volumen de dosificación de 5 mL/kg. Cada grupo consistió en tres ratas. Para los compuestos 1 y 2, se recogieron muestras de sangre por medio de la vena yugular con litio-heparina 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). Para el compuesto 11, se recogieron muestras de sangre en el seno retroorbital con litio-heparina 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 minutos, y las muestras de plasma resultantes se conservaron a –20°C para el análisis pendiente.

4.6.3. Cuantificación de los niveles de compuestos en plasma

- 25 Se determinaron las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de ensayo por un método de LC–MS/MS, en el cual el espectrómetro de masas se operó en modo de electropulverización positivo.

4.6.4. Determinación de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando Winnonlin® (Pharsight®, Estados Unidos).

Tabla XI

	Compuesto ilustrativo 1		Compuesto comparativo 2		Compuesto comparativo 11
	IV 1 mg/kg (n = 3)	PO 5 mg/kg (n = 3)	IV 1 mg/kg (n = 3)	PO 5 mg/kg (n = 3)	PO 5 mg/kg (n = 3)
C ₀ o C _{máx} (ng/mL)	1407 (28)	310 (33)	863(4)	1320 (42)	547 (8)
T _{máx} (h)		2,2 [0,5–5]		0,33 [0,25–0,5]	0,25 [0,25–0,25]
AUC (0–z) (ng.h/mL)	722 (2)	1429 (24)	470 (5)	1437 (33)	690 (23)
AUC (0–24 h) (ng.h/mL)	739 (2)	1681 (8)	474 (5)	1465 (30)	
Cl	1,35 (2)		2,12 (5)		
V _{ss}	1,76 (3)		1,46 (4)		
T _{1/2}	1,6 (3)		0,74 (8)	0,92 (57)	0,92 (7)
F (%)	45		62		

Ejemplo 4.7. Estudio de toxicidad en rata de 7 días

Se efectúa un estudio de toxicidad oral de 7 días con los compuestos de ensayo en ratas machos Sprague–Dawley, a 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.

- 5 Los compuestos de ensayo se formulan en HPβCD al 30% (v/v) en agua purificada. Cada grupo incluye 5 ratas machos principales, al igual que 3 animales satélites, para la toxicocinética. Se suministra a un cuarto grupo HPβCD al 30% (v/v) en agua solamente, a la misma frecuencia, volumen de dosificación y por la misma vía de administración, que funciona como el grupo de control con vehículo.

- 10 La meta del estudio consiste en determinar la menor dosis que no provoca episodios adversos identificables (nivel de efecto adverso no observable – NOAEL, por sus siglas en inglés).

Ejemplo 4.8. Estabilidad de hepatocitos

Los modelos para la evaluación del aclaramiento metabólico en hepatocitos están descritos por McGinnity *et al.*, *Drug Metabolism and Disposition*, 2008, 32, 11, 1247.

Ejemplo 4.9. Sensibilidad para la prolongación QT

- 15 Se evaluó el potencial para la prolongación QT en el ensayo de pinzamiento de parche de hERG.

Pinzamiento zonal de célula completa convencional

- 20 Se efectuaron registros de pinzamiento zonal de célula completa usando un amplificador EPC10 controlado por el programa informático Pulse v8.77 (HEKA). La resistencia de serie típicamente fue inferior a 10 MΩ y fue compensada más del 60%, a los registros no se le restaron las fugas. Los electrodos se fabricaron a partir de vidrio de pipeta GC150TF (Harvard).

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

La solución de pipeta de parche interno contenía: Kgluconato, 100 mM, KCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM; Na₂ATP 5 mM, glutathione 2 mM, EGTA, 11 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2.

- 25 Los fármacos se perfundieron usando un sistema de perfusión rápido Biologic MEV–9/EVH–9.

- 30 Todos los registros se efectuaron en células HEK293 que expresaban de forma estable canales de 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 1000 ms, seguido de un pulso de corriente de cola a –50 mV durante 2000 ms, y el potencial de mantenimiento fue –80 mV. Los pulsos se aplicaron cada 20 s, y todos los experimentos se efectuaron a temperatura ambiente.

Resultados

Por ejemplo, cuando se efectúa este ensayo, el valor de la Cl₅₀ medido del compuesto ilustrativo 1 fue superior a 150 μM.

35 Conclusiones generales

- 40 Los datos proporcionados en la presente solicitud demuestran que el compuesto ilustrativo 1 (el compuesto de la invención) exhibe potencia *in vivo* significativamente mayor, en comparación con compuestos estructuralmente similares. Esta mejora es inesperada, y no podría haber sido prevista por el experto en la técnica, en particular, debido a que muchos de estos compuestos estructuralmente similares exhiben potencia *in vitro* muy similar frente a JAK1 y JAK2.

- 45 Los expertos en la técnica apreciarán que las descripciones precedentes son ilustrativas y de naturaleza explicativa, y tienen el propósito de ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas. A través de la experimentación habitual, el experto reconocerá variaciones y modificaciones evidentes que pueden efectuarse. Por lo tanto, se tiene la intención de que la invención no sea definida por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

Referencias.

Choy, E. H., Panayi, G. S. (2001). *N Engl J Med.* 344: 907–16.

Chubinskaya, S. and Kuettner, K. E. (2003). "Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes". *The international journal of biochemistry & cell biology* 35 (9)1323–1340.

- Clegg D. O. *et al.* (2006). *N Engl J Med.* 2006, 354:795–808. “Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis”.
- Firestein, G. S. (2003). *Nature.* 423: 356–61.
- Lee, D. M, Weinblatt, M. E. (2001). *Lancet.* 358: 903–11.
- 5 Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J. P., Bogdanowicz, P. (2003) “JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)–6/soluble IL–6R down–regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes”. *J Biol Chem.* 278 (5) 2903–2912.
- 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”. (2001) *J. Immunol.* 166: 3491–3498.
- 10 O'Dell, J. R. (2004). “Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis”. *N. Engl. J. Med.* 350 (25): 2591–602.
- Osaki, M., Tan, L., Choy, B. K., Yoshida, Y., Cheah, K. S. E, Auron, P. E., Goldring, M. B. (2003). “The TATA–conatining core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon–gamma–mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1alpha, JAK1 and JAK2”. *Biochem. J.* 369: 103–115.
- 15 Otero, M., Lago, R., Lago, F., Gomez Reino, J. J., Gualillo, O. (2005). “Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin–1”. *Arthritis Research & Therapy.* 7:R581–R591.
- Sims, N. A. *et al.*, (2004). “Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen–induced arthritis”. *Arthritis Rheum.* 50: 2338–2346.
- 20 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, 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.
- Smolen, J. S., Steiner, G. (2003). *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 473–88.
- Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J., Rudolphi, K. A. (2005). *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 331–44.
- 25 “Osteoarthritis – an untreatable disease?”
- Tam, L., McGlynn, L. M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J. M. S., Edwards, J. (2007), *British Journal of Cancer*, 97, 378–383.
- Constantinescu *et al.*, 2007, *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (3): 122–131.
- Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadimitsu Kishimoto, *Arthritis Res.*, 2002, 4 (supl. 3): S233–S242.
- 30 O'Shea J., *et al.* *Nature Review Drug Discovery*, 3 (2004) 555–564: “A new modality for immunesuppresion: targeting the JAK/STAT pathway”.
- Vainchenker, W. *et al.* *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (2008) 385–393: “JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immune deficiencies”.
- 35 Levy, D. and Loomis, C. *New England Journal of Medicine*, 357 (2007) 1655–1658: “STAT3 signaling and the Hyper–IgE–syndrome”.
- Wernig *et al.* (2008). “Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F–induced polycythemia vera”, *Cancer Cell* 13 (4), 311–320.
- Geron *et al.* (2008), “Selective inhibition of JAK2–driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors”, *Cancer Cell*, 13 (4), 321–30.
- 40 Wirtz *et al.* (2007), “Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073–1083.
- Nials *et al.* (2008), “Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge”, *Disease Models & Mechanisms*, 213–220.
- 45 Ip *et al.* (2006), “Interleukin (IL)–4 and IL–13 up–regulate monocyte chemoattractant protein–1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen–activated protein kinase, extracellular signal–regulated kinase 1/2 and Janus kinase–2 but not c–Jun NH2–terminal kinase 1/ 2 signalling pathways”, *Clin. Exp. Immun.*, 162–172.
- Pernis *et al.* (2002), “JAK–STAT signaling in asthma”, *J. Clin. Invest.* 1279.

Kudlacz *et al.* (2008), "The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia", *Eur. J. Pharmacol.* 154-161.

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., Willmane, C. L.; (2009) "JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia", *PNAS* May 22. [Epub ahead of print].

Argiles, J. M., Lopez-Soriano, F. J. (1998) "Catabolic proinflammatory cytokines". *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1: 245-51.

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: 802-5.

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: 339-44.

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 p21(WAF1/Cip1) expression". *Arthritis Rheum.* 10: 3365-76.

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

Salvemini, D., Mazzon, E., Dugo, L., Serrano, 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: 2909-21.

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.

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: 2338-46.

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

Khachigian, L. M. "Collagen antibody-induced arthritis". (2006). *Nature Protocols.* 1, 2512-6.

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. Apr.*; 150 (7): 829-31.

McGinnity, *et al.* *Drug Metabolism and Disposition.* 2008, 32, 11, 1247.

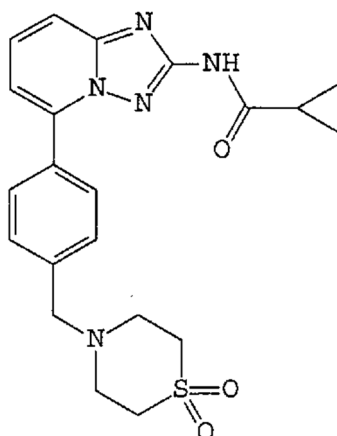
Debe entenderse que factores tales como la capacidad de penetración celular diferencial de los diversos compuestos pueden contribuir a discrepancias entre la actividad de los compuestos en los ensayos celulares y bioquímicos *in vitro*.

Por lo menos algunas de las denominaciones químicas de los compuestos de la invención, como se proporcionan y se exponen en esta solicitud, pueden haber sido generadas sobre una base automatizada mediante el uso de un programa informático comercial para la denominación química, y no han sido verificadas independientemente. Los programas representativos que realizan esta función incluyen la herramienta de denominación Lexichem, comercializada por Open Eye Software, Inc., y la herramienta Autonom Software, comercializada por MDL, Inc. En el caso donde la denominación química indicada y la estructura representada difieran, registrará la estructura representada.

Las estructuras químicas expuestas en esta solicitud se prepararon usando o bien ChemDraw® o ISIS® /DRAW. Cualquier valencia abierta que aparezca en un átomo de carbono, oxígeno o nitrógeno en las estructuras de esta solicitud indica la presencia de un átomo de hidrógeno. Cuando existe un centro quiral en una estructura, aunque no se exponga estereoquímica específica para el centro quiral, ambos enantiómeros asociados con la estructura quiral están contemplados por la estructura.

REIVINDICACIONES

1. Una sal de ácido maleico de un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



(I)

2. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de la sal del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende un agente terapéutico adicional.
4. La sal del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso como un medicamento.
5. La sal del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de transplantes, enfermedades que implican el deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago, enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferante mesangial.
6. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, artrosis, enfermedades alérgicas de las vías respiratorias y enfermedades inflamatorias del intestino.
7. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la afección inflamatoria es artritis reumatoide.
8. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la afección inflamatoria es la enfermedad de Crohn.
9. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la afección inflamatoria es colitis.
10. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad que implica deterioro del recambio de cartílago se selecciona de espondilitis anquilosante y artritis psoriásica.
11. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad autoinmunitaria es dermatitis atópica.
12. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad de rechazo de transplantes es enfermedad de injerto frente a hospedante.
13. La sal del compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la sal del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento, prevención o profilaxis de afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferantes, rechazo de transplantes, enfermedades que implican deterioro del recambio de cartílago, malformaciones congénitas del cartílago y/o enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis proliferante mesangial.

15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento y/o prevención de artritis, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades autoinmunitarias o rechazo de transplantes.