

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-186994- -00000-0000

Fecha: 2014-08-26 15:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

# Industria y Comercio $T=F=4$

## SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

### PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: INHIBIDOR DE LA QUINASA REGULADORA DE LA SEÑAL DE APOPTOSIS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C07D 233/56

71. SOLICITANTE: GILEAD SCIENCES, INC.

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América.

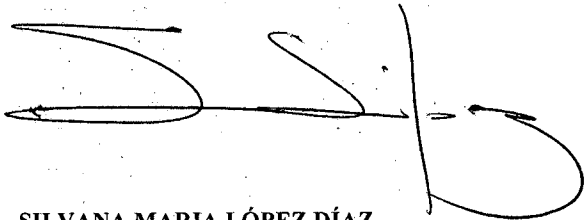
74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

|                                          |                                                                                                                                             |            |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO                                                                                                    | radicación |
|                                          |                                                           |            |
|                                          | No. 14-186994- -00000-0000                                                                                                                  |            |
|                                          | Fecha: 2014-08-26 15:07:35    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR<br>Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI<br>Act. 411 PRESENTACION    Folios 15 |            |

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

|    |                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                            |                                                                                                |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | TIPO DE SOLICITUD                                                                                                                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención<br><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad<br><input type="checkbox"/> Capítulo II |
| 2  | DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)                                                                                                                                                                      |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | Solicitud Internacional No.                                                                                                                                                                                 | PCT/US2013/022997                                                                                          | Fecha 24 de Enero de 2013                                                                      |
|    | Publicación Internacional No.                                                                                                                                                                               | WO 2013/112741 A1                                                                                          | Fecha 01 de Agosto de 2013                                                                     |
| 3  | TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)                                                                                                                                                  |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | <b><u>INHIBIDOR DE LA QUINASA REGULADORA DE LA SEÑAL DE APOPTOSIS</u></b>                                                                                                                                   |                                                                                                            |                                                                                                |
| 4  | CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C07D 233/56                                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 5  | SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL<br><b>GILEAD SCIENCES, INC.</b>                                                                                                                                                    | NOMBRE                                                                                                     | IDENTIFICACIÓN<br>TIPO                                                                         |
| 6  | DATOS DEL SOLICITANTE                                                                                                                                                                                       |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | DIRECCIÓN: 333 Lakeside Drive Foster City, No. TELÉFONO:<br>CIUDAD: California 94404, CORREO ELECTRONICO:<br>PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América |                                                                                                            |                                                                                                |
| 7  | INVENTOR (ES)                                                                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | APELLIDOS<br>NOTTE,                                                                                                                                                                                         | NOMBRES<br>Gregory                                                                                         | NACIONALIDAD                                                                                   |
|    | DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:                                                                                                                                                                            |                                                                                                            |                                                                                                |
| 8  | DATOS INVENTOR (ES)                                                                                                                                                                                         |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | DIRECCIÓN<br>21 Otay Avenue,                                                                                                                                                                                | CIUDAD<br>San Mateo,                                                                                       | ESTADO<br>California 94403,<br>PAÍS RESIDENCIA<br>Estados Unidos de América                    |
|    | OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)                                                                                                                                                           |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | <input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 9  | <input type="checkbox"/> REPRESENTANTE LEGAL <input checked="" type="checkbox"/> APODERADO                                                                                                                  |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | APELLIDOS<br><b>LÓPEZ DÍAZ</b>                                                                                                                                                                              | NOMBRES<br><b>SILVANA MARIA</b>                                                                            | IDENTIFICACIÓN<br><b>C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ</b>                                       |
|    | DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6                                                                                                                                                                       | No. TELÉFONO 6181088                                                                                       |                                                                                                |
|    | CIUDAD Bogotá, D.C.                                                                                                                                                                                         | CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co.                                                      |                                                                                                |
|    | PAÍS Colombia                                                                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 10 | DECLARACIONES DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                          |                                                                                                            |                                                                                                |
|    | (33) PAÍS DE ORIGEN<br>Estados Unidos de América                                                                                                                                                            | CÓDIGO PAÍS<br>US                                                                                          | (31) NÚMERO<br>61/591.710<br>(32) FECHA AAA/MM/DD<br>2012/01/27                                |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS                                      |                                                                                                                                                            |                                |
| Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.                                                                                                                                                                       |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                      |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| 12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES                                          |                                                                                                                                                            |                                |
| Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.                                                                                                                                                                    |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| 13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | REDUCCIÓN DE TASAS                                                                            |                                                                                                                                                            |                                |
| Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.                                                                                                                                          |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Micro, pequeñas y medianas empresas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Universidades públicas o privadas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Entidades sin ánimo de lucro <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| 14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO |                                                                                                                                                            |                                |
| Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet. |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO                                                        | Nº 14-087599//<br>14-058714                                                                                                                                | Fecha 14/08/2014<br>04/06/2014 |
| 16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | FIRMA DEL APODERADO :                                                                         |                                                                                                                                                            |                                |
| <div></div> <div>SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ<br/>C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ</div>                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                                |
| 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | ANEXOS                                                                                        |                                                                                                                                                            |                                |
| Documentación Técnica<br>Solicitud Internacional en castellano                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                               | Documentación Jurídica                                                                                                                                     |                                |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Descripción      Nº de folios: 43                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                               | 9. <input checked="" type="checkbox"/> Poderes, si fuera el caso.                                                                                          |                                |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones      Nº Reivindicaciones: 12                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                               | 10. <input type="checkbox"/> Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.                                        |                                |
| 3. <input checked="" type="checkbox"/> Dibujos y/o figuras      Nº folios:2                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               | 11. <input type="checkbox"/> Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. |                                |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/> Resumen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 12. <input type="checkbox"/> Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.       |                                |
| 5. <input type="checkbox"/> Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               | 13. Reducción de tasas                                                                                                                                     |                                |
| 6. <input type="checkbox"/> Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                               | Micro, pequeñas o medianas empresas                                                                                                                        |                                |
| 7. <input type="checkbox"/> Arte final 12 x 12.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.                |                                |
| 8. <input type="checkbox"/> Anexo formato digital.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.                                                 |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | Universidades públicas o privadas                                                                                                                          |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación                                                 |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | Entidades sin ánimo de lucro                                                                                                                               |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Copia de registro vigente en Cámara de comercio.                                                                                  |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Hoja de información complementaria.                                                                                               |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Otros, especificar                                                                                                                |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 14. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.                                                    |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 15. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.                                                                          |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 16. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.                                       |                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 17. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.                                                             |                                |

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**NIT : 800.176.089-2**

- / -



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**RECIBO DE CAJA**

**No. 14 - 0087599**

Bogotá D.C., Agosto 14 de 2014 - 13:49:23

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 20233216 | 14/08/2014 | 27.232.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO        |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|----------------|---------------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 515.000.00     | 515.000.00          |
|       |                         |                                            |                | <b>\$515.000.00</b> |

**SON: \*\*QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 14-186994-00000-0000**

Fecha: 2014-08-26 15:07:35  
Tra. 11 PATENTE IYI  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR  
Eve: 378 FASE NACIONAL I  
Folios: 15

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mai: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 14 de 2014 - 13:49:31

2

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0058714

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 09:25:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO     | CUENTA | No. PAGO   | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------|--------|------------|------------|---------------|
| RECIBO DE CA | 999999999 | 58593  | 04/06/2014 |            | 31.561.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT.         | RENTISTICO  | CONCEPTO                                                        | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|---------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|----------------|--------------|
| 2 50005-01-01 | SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA<br>ADICIONAL A LAS 10 INIC | 31.000.00      | 62.000.00    |
|               |             |                                                                 |                | \$62.000.00  |

SON: \*\*SESENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

-\*\*\*\*\*-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-186994-00000-0000

Fecha: 2014-08-26 15:07:35

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR

Eve. 378 FASENACIONALI

Folios: 1/5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 4 de 2014 - 09:25:19

|                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                       | PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA<br>RELACIÓN DE ANEXOS                                                                                                                                                                                                                |
| Dependencia: <span style="float: right; font-size: 1.5em;">2020</span>                                                                                                     | Fecha: <span style="font-size: 1.5em;">14</span> / <span style="font-size: 1.5em;">8</span> / <span style="font-size: 1.5em;">26</span> /<br><div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: 0.8em;"> <span>AAAA</span> <span>MM</span> <span>DD</span> </div> |
| Recorrido: <span style="font-size: 1.5em;">4</span>                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Tipo de Radicación:    Entrada: <input checked="" type="checkbox"/> Salida: <input type="checkbox"/> Traslado: <input type="checkbox"/> Convenio: <input type="checkbox"/> |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Radicador:                                                                                                                                                                 | Planilla:                                                                                                                                                                                                                                                                           |

| ID | No. Radicación | Consecutivo | Item |
|----|----------------|-------------|------|
| 1  | 14-186994      | 0           | 7    |
| 2  |                |             |      |
| 3  |                |             |      |
| 4  |                |             |      |
| 5  |                |             |      |
| 6  |                |             |      |
| 7  |                |             |      |
| 8  |                |             |      |
| 9  |                |             |      |
| 10 |                |             |      |
| 11 |                |             |      |
| 12 |                |             |      |
| 13 |                |             |      |
| 14 |                |             |      |
| 15 |                |             |      |
| 16 |                |             |      |
| 17 |                |             |      |

| Item | Unidad de Conservación                 |
|------|----------------------------------------|
| 1    | Bolsa                                  |
| 2    | Caja                                   |
| 3    | Libro                                  |
| 4    | Sobre                                  |
| 5    | Tomo                                   |
| 6    | Otro                                   |
| Item | Soporte Documental                     |
| 7    | CD <input checked="" type="checkbox"/> |
| 8    | Disquete                               |
| 9    | DVD                                    |
| 10   | Folleto                                |
| 11   | Foto                                   |
| 12   | Periódico                              |
| 13   | Plano                                  |
| 14   | Publicación Periódica                  |
| 15   | USB                                    |
| 16   | Otro                                   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Observaciones:<br><div style="font-family: cursive; font-size: 1.2em; margin-top: 10px;">           El anexo contiene:<br/>           1 Archivo en formato PDF, los cuales fueron<br/>           procesados y subidos al sistema         </div> <div style="text-align: right; margin-top: 100px; font-family: cursive; font-size: 1.5em;">           Claudia         </div> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



No. 14-186994- -00000-0000

Fecha: 2014-08-26 15:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5LISTA DE CHEQUEO  
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONESPATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                   |                                                                                                                         |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |

# **INHIBIDOR DE LA QUINASA REGULADORA DE LA SEÑAL DE APOPTOSIS**

## **CAMPO DE LA INVENCION**

5           La presente invención se relaciona con un compuesto novedoso para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por ASK1. La invención también se relaciona con compuestos intermedios para su preparación y con composiciones farmacéuticas que contienen dicho compuesto novedoso.

## **ANTECEDENTES**

10           La quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) es un miembro de la familia de proteínas quinasa quinasa quinasa activadas por mitógeno ("MAP3K") que activa la proteína quinasa de c-Jun en la región N-terminal ("JNK") y MAP quinasa p38 ((Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P. T., Saitoh, M., Moriguchi, T., Matsumoto, K., Miyazono, K., y Gotoh, Y. (1997) *Science*, 275, 90-94). La ASK1 es activada por  
15 una variedad de estímulos incluyendo el estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno (ROS), LPS, TNF- $\alpha$ , FasL, estrés de RE, y aumento de las concentraciones de calcio intracelular (Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., y Ichijo, H. (2009) *Cell Comm. Signal.* 7:1-10; Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., y Ichijo, H. (2007) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48: 1-8.27; Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., y Ichijo, I. (2007) *J. Biochem. Mol. Biol.* 40:1-6). La fosforilación de la proteína ASK1 puede  
20 conducir a apoptosis u a otras respuestas celulares dependiendo del tipo de célula. Se ha informado que la activación de ASK1 y la señalización por ASK1 desempeñan un papel importante en una amplia gama de enfermedades, incluyendo trastornos neurodegenerativos, cardiovasculares, inflamatorios, autoinmunes, y metabólicos.  
25 Además, la ASK1 ha sido implicada en la mediación del daño de órganos después de isquemia y reperfusión de corazón, cerebro, y riñón (Watanabe *et al.*, (2005) *BBRC* 333, 562-567; Zhang *et al.*, (2003) *Life Sci* 74:37-43; Terada *et al.* (2007) *BBRC* 364: 1043-49).

Se ha informado que las ROS están asociadas con aumentos en la producción de citoquinas inflamatorias, fibrosis, apoptosis y necrosis en el riñón. (Singh D K, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. *Nat Rev Endocrinol* 2011 March; 7(3):176-184; Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001 Dec. 13; 414(6865):813-820; Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010 November; 6(11):667-678).

Por otra parte, el estrés oxidativo facilita la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) que causan daño renal adicional y la producción de ROS. (Hung K Y, *et al.*, N-acetylcysteine-mediated antioxidation prevents hyperglycemia-induced apoptosis and collagen synthesis in rat mesangial cells. *Am J Nephrol* 2009; 29(3):192-202).

La fibrosis túbulointersticial en el riñón es un fuerte predictor de la progresión de la falla renal en pacientes con enfermedades renales crónicas (Schainuck L I, *et al.*, Structural-functional correlations in renal disease. Part II: The correlations. *Hum Pathol* 1970; 1: 631-641).

La obstrucción ureteral unilateral (OUU) en ratas es un modelo ampliamente utilizado de fibrosis túbulointersticial. La OUU causa inflamación tubulointerstitial, aumenta la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), y la acumulación de miofibroblastos, que secretan proteínas de la matriz tales como colágeno y fibronectina. El modelo de OUU se puede utilizar para probar el potencial de un fármaco para tratar la enfermedad renal crónica mediante la inhibición de la fibrosis renal (Chevalier *et al.*, Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy, *Kidney International* (2009) 75, 1145-1152).

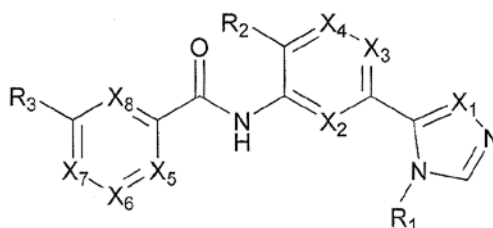
Por lo tanto, los agentes terapéuticos que funcionan como inhibidores de la señalización por ASK1 tienen el potencial de remediar o mejorar la vida de los pacientes que necesitan tratamiento para enfermedades o afecciones tales como trastornos neurodegenerativos, cardiovasculares, inflamatorios, autoinmunes, y metabólicos. En particular, los inhibidores de ASK1 tienen el potencial para tratar enfermedades cardiorrenales, incluyendo enfermedad renal, enfermedad renal diabética,

enfermedad renal crónica, enfermedades fibróticas (incluyendo fibrosis pulmonar y renal), enfermedades respiratorias (incluyendo la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y daño pulmonar agudo), enfermedades hepáticas agudas y crónicas.

5 La publicación de la Patente de EE.UU. N ° 2007/0276050 describe métodos para identificar inhibidores de ASK1 útiles para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad cardiovascular y métodos para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad cardiovascular en un animal.

10 La patente WO2009027283 describe compuestos de triazolopiridina, métodos para la preparación de los mismos y métodos para el tratamiento de trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

15 La Publicación de Patente de EE.UU. N ° 2001/00095410A1, publicada el 13 de enero de 2011, divulga compuestos útiles como inhibidores de ASK-1. La Publicación de Patente de EE.UU. N ° 2001/00095410A1 se relaciona con compuestos de Fórmula (I):



(I)

en donde:

20 R<sup>1</sup> es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados de halo, oxo, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, arilo, arilo, -NO<sub>2</sub>, R<sup>6</sup>, -C(O)-R<sup>6</sup>, -OC(O)-R<sup>6</sup>-C(O)-O-R<sup>6</sup>, C(O)-N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -OC(O)-N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -S-R<sup>6</sup>, -

$S(=O)-R^6$ ,  $-S(=O)_2R^6$ ,  $-S(=O)_2-N(R^6)(R^7)$ ,  $-S(=O)_2-O-R^6$ ,  $-N(R^6)(R^7)$ ,  $-N(R^6)-C(O)-R^7$ ,  $-N(R^6)-C(O)-O-R^7$ ,  $-N(R^6)-C(O)-N(R^6)(R^7)$ ,  $-N(R^6)-S(=O)_2-R^6$ ,  $-CN$ , y  $-O-R^6$ ,

en donde alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, fenilo, y fenoxi están opcionalmente sustituidos por 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados entre alquilo, cicloalquilo, alcoxi, hidroxilo, y halo;

en donde  $R^6$  y  $R^7$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{15}$ , cicloalquilo, heterociclilo, arilo, y heteroarilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1-3 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo, mono- o dialquilamino, alquilo o arilo o heteroaril amida,  $-CN$ , alcoxi inferior,  $-CF_3$ , arilo, y heteroarilo; o

$R^6$  y  $R^7$  cuando se toman junto con el nitrógeno al que están unidos forman un heterociclo;

$R^2$  es hidrógeno, halo, ciano, alcoxi, o alquilo opcionalmente sustituido por halo;

$R^3$  es arilo, heteroarilo, o heterociclilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo, alcoxi, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, halo, oxo,  $-NO_2$ , haloalquilo, haloalcoxi,  $-CN$ ,  $-O-R^6$ ,  $-O-C(O)-R^6$ ,  $-O-C(O)-N(R^6)(R^7)$ ,  $-S-R^6$ ,  $-N(R^6)(R^7)$ ,  $-S(=O)-R^6$ ,  $-S(=O)_2R^6$ ,  $-S(=O)_2-N(R^6)(R^7)$ ,  $-S(=O)_2-O-R^6$ ,  $-N(R^6)-C(O)-R^7$ ,  $-N(R^6)-C(O)-O-R^7$ ,  $-N(R^6)-C(O)-N(R^6)(R^7)$ ,  $-C(O)-R^6$ ,  $-C(O)-O-R^6$ ,  $-C(O)-N(R^6)(R^7)$ , y  $-N(R^6)-S(=O)_2-R^7$ , en donde el alquilo, alcoxi, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo está además opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, oxo,  $-NO_2$ , alquilo, haloalquilo, haloalcoxi,  $N(R^6)(R^7)$ ,  $-C(O)-R^6$ ,  $-C(O)-O-R^6$ ,  $-C(O)-N(R^6)(R^7)$ ,  $-CN$ ,  $-O-R^6$ , cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

con la condición de que el grupo funcional heteroarilo o heterociclilo incluye al menos un átomo de nitrógeno en el anillo;

$X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$ ,  $X^4$ ,  $X^5$ ,  $X^6$ ,  $X^7$  y  $X^8$  son independientemente  $C(R^4)$  o  $N$ , en el cual cada  $R^4$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, cicloalquilo, arilo, heteroarilo,

heterociclilo, halo, -NO<sub>2</sub>, haloalquilo, haloalcoxi-CN, -O-R<sup>6</sup>, -S-R<sup>6</sup>, -N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -S(=O)-R<sup>6</sup>, -S(=O)<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -S(=O)<sub>2</sub>-N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -S(=O)<sub>2</sub>-O-R<sup>6</sup>, -N(R<sup>6</sup>)-C(O)-R<sup>7</sup>, -N(R<sup>6</sup>)-C(O)-O-R<sup>7</sup>, -N(R<sup>6</sup>)-C(O)-N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -C(O)-R<sup>6</sup>, -C(O)-O-R<sup>6</sup>, -C(O)-N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), or -N(R<sup>6</sup>)-S(=O)<sub>2</sub>-R<sup>7</sup>, en donde el alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, y heterociclilo

5 está además opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, oxo, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -O-CF<sub>3</sub>, -N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -C(O)-R<sup>6</sup>, -C(O)-O-R<sup>7</sup>, -C(O)-N(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>), -CN, -O-R<sup>6</sup>; o

X<sup>5</sup> y X<sup>6</sup> o X<sup>6</sup> y X<sup>7</sup> están unidos para proporcionar arilo fusionado opcionalmente sustituido o heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido; y

10 con la condición de que al menos uno de X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, y X<sup>4</sup> es C(R<sup>4</sup>);  
al menos dos de X<sup>5</sup>, X<sup>6</sup>, X<sup>7</sup>, y X<sup>8</sup> son C(R<sup>4</sup>); y  
al menos uno de X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup>, X<sup>6</sup>, X<sup>7</sup> y X<sup>8</sup> es N.

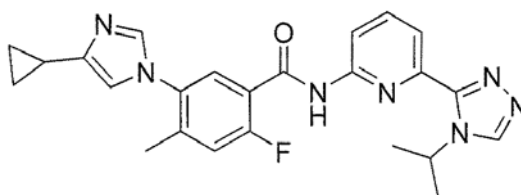
No obstante las divulgaciones anteriores, hay una necesidad de compuestos que sean potentes y presenten perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos mejorados  
15 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación ASK1.

Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto un compuesto novedoso dentro del alcance de la Publicación de Patente de EE.UU. US2011/0009410A que en suma exhibe una buena potencia, perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos mejorados en comparación con los compuestos descritos en la misma.

20

## **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con un compuesto de la fórmula:



(I),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una forma de realización, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula (I) en el tratamiento de una enfermedad en un paciente en necesidad de tratamiento con un inhibidor de ASK1.

- 5            En otra forma de realización, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

- 10           En otra forma de realización, la invención es un método para tratar la nefropatía diabética, o complicaciones de la diabetes, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

- 15           En otra forma de realización, la invención se relaciona con un método para tratar la enfermedad renal, o enfermedad renal diabética que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

En otra forma de realización, la invención se relaciona con un método para tratar la fibrosis renal, fibrosis pulmonar, o fibrosis pulmonar idiopática (FPI) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

- 20           En otra forma de realización, la invención se relaciona con un método para tratar la enfermedad renal diabética, nefropatía diabética, fibrosis renal, fibrosis hepática, o fibrosis pulmonar que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de fórmula (I), a un paciente en necesidad del mismo.

- 25           En otra forma de realización, la invención se relaciona con compuestos intermedios útiles para la síntesis del compuesto de fórmula (I).

En otra forma de realización, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

5 En otra forma de realización, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de la enfermedad renal diabética.

En otra forma de realización, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

10 En aún otra forma de realización, la invención se relaciona con el compuesto de fórmula (I) para uso en terapia.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

### Figuras

15 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los niveles de colágeno IV en la corteza renal de ratas sometidas a siete días de obstrucción ureteral unilateral y tratadas, ya sea, con vehículo o con 1, 3, 10, o 30 mg/kg b.i.d. del compuesto de fórmula (I).

20 La Figura 2 muestra imágenes representativas de secciones de la corteza renal teñidas con alfa-actina de músculo liso (un marcador de miofibroblastos activados) de ratas sometidas a siete días de obstrucción ureteral unilateral y tratadas con, ya sea, vehículo o con 1, 3, 10, o 30 mg/kg b.i.d del compuesto de fórmula (I).

### Definiciones y Parámetros Generales

25 Tal como se usa en el presente documento, las siguientes palabras y frases están destinadas a tener los significados indicados a continuación, excepto en la medida en que el contexto en que se utilizan indique lo contrario. Cuando no se mencione ninguna indicación o definición, está implícito el sentido común de la palabra o frase, el que se

puede encontrar en un diccionario correspondiente, o en el uso común conocido por un experto en la técnica.

El término “enfermedad renal crónica”, como se usa en el presente documento, se relaciona con la pérdida progresiva de la función renal en el tiempo, por lo general  
5 meses o incluso años. La enfermedad renal crónica (ERC) es diagnosticada por un profesional de atención de salud competente utilizando la información adecuada, y pruebas o marcadores conocidos por un experto en la técnica. La enfermedad renal crónica incluye implícitamente la enfermedad renal.

El término “enfermedad renal diabética”, como se usa en el presente documento,  
10 se relaciona con la enfermedad renal causada por la diabetes, agravada por la diabetes, o que se presenta con la diabetes. Es una forma de enfermedad renal crónica que se presenta en alrededor del 30% de los pacientes con diabetes. Se define como la diabetes con presencia de albuminuria y/o insuficiencia renal, es decir, disminución de la velocidad de filtración glomerular) (Véase de B, I, *et al.*, Temporal trends in the  
15 prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA* 2011 Jun. 22; 305(24):2532-2539).

El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales de compuestos farmacéuticos, por ejemplo, compuestos de fórmula (I) que retienen las propiedades y efectividad biológicas del compuesto de base, y que no son ni biológicamente ni de  
20 ninguna otra manera no deseables. Hay sales de adición ácidas y sales de adición básicas. Sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos.

Los ácidos y bases útiles para hacer reaccionar con un compuesto de base para formar sales farmacéuticamente aceptables (sales de adición ácidas o adición básicas  
25 respectivamente) son conocidos por un experto en la técnica. Del mismo modo, los métodos de preparación de sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto de base (tras la divulgación) son conocidos por un experto en la técnica y se divulgan, por ejemplo, en Berge, *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Science*, Enero 1977 vol. 66, No. 1, y en otras fuentes. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen, pero no están  
30 limitadas a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido

fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen, pero no están limitadas a, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido p-tolueno-sulfónico, y similares. Las bases útiles para la formación de sales de adición básicas son conocidas para un experto en la técnica. Un ejemplo de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I) es la sal de clorhidrato del compuesto de fórmula (I).

Como se usa en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye excipientes o agentes tales como solventes, diluyentes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares que no son perjudiciales para el compuesto de la invención o uso del mismo. El uso de tales portadores y agentes para preparar composiciones de sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Co., Philadelphia, Pa. 17ª Ed. (1985); y *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, Inc. 3ª Ed. (G. S. Banker & C. T. Rhodes, Eds.)

El término “enfermedades cardiorenal” como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades relacionadas con la función renal que son causadas o exacerbadas por problemas cardiovasculares como, por ejemplo, presión arterial alta o hipertensión. Se cree que la hipertensión es un importante factor que contribuye a la enfermedad renal.

El término “enfermedades respiratorias”, como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades que incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad del compuesto de fórmula (I) que es suficiente para efectuar el tratamiento como se define a continuación, cuando se administra a un paciente (particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento en una o más dosis. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, dependiendo del paciente, la enfermedad a tratar, el peso y/o la edad del paciente, la gravedad de la enfermedad, o la forma de administración, lo que podrá ser determinado por un médico o profesional de atención de salud calificado.

El término “tratamiento” o “tratar” significa administrar un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) con el propósito de:

- 5
- (i) retrasar la aparición de una enfermedad, es decir, lograr que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen o retrasar el desarrollo de los mismos;
  - (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener el desarrollo de síntomas clínicos; y/o
  - (iii) aliviar la enfermedad, es decir, lograr la regresión de los síntomas clínicos o la gravedad de los mismos.

10            En una forma de realización preferida, la invención se relaciona con el uso del compuesto de fórmula (I) en el tratamiento de la enfermedad renal crónica que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva a un paciente en necesidad del mismo.

15            En otra forma de realización preferida, la invención se relaciona con el uso del compuesto de fórmula (I) en el tratamiento de la enfermedad renal diabética que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva a un paciente en necesidad del mismo.

20            En otra forma de realización preferida, la invención se relaciona con el uso del compuesto de fórmula (I) en el tratamiento de la fibrosis pulmonar o renal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva a un paciente en necesidad del mismo.

25            La concentración inhibitoria máxima media ( $CI_{50}$ ) de un agente terapéutico es la concentración de un agente terapéutico necesaria para producir el 50% de la inhibición máxima de una enzima blanco. Es un objetivo deseable el descubrir un agente terapéutico, por ejemplo un compuesto que inhiba la quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) con una  $CI_{50}$  baja. De esta manera, los efectos secundarios no deseables se reducen al mínimo al tener la posibilidad de utilizar una dosis más baja del agente terapéutico para inhibir la enzima ASK1.

Del mismo modo, es un objetivo deseable el descubrir un agente terapéutico que tenga una constante de disociación baja ( $K_d$ ).  $K_d$  se utiliza para describir la afinidad entre un ligando (tal como un agente terapéutico) y la quinasa o receptor correspondiente; es decir, es una medida de cuan fuertemente un agente terapéutico se une a una quinasa en particular, por ejemplo a la quinasa reguladora de la señal de apoptosis ASK1. Por lo tanto, en el desarrollo de fármacos, en general, se prefiere una menor  $K_d$ .

Del mismo modo, es un objetivo deseable el descubrir un compuesto que tenga una  $CE_{50}$  baja.  $CE_{50}$  es la concentración de un fármaco que alcanza el 50% de eficacia máxima en la célula. El valor de  $CE_{50}$  se traduce en la concentración de un compuesto en el medio de ensayo necesaria para alcanzar 50% de la eficacia máxima. Por lo tanto, en el desarrollo de fármacos, en general, se prefiere una menor  $CE_{50}$ . Una unidad de medida útil asociada con  $CE_{50}$  es la  $CE_{50}$  ajustada a la unión a proteína ( $CE_{50}$ - ajUP, tal como se utiliza en el presente documento). Este valor mide la cantidad de un fármaco, por ejemplo, un compuesto de la fórmula (I) correlacionada con la fracción del fármaco que no está unida a la proteína que proporciona un 50% de eficacia máxima. Este valor mide la eficacia del fármaco corregida por, o correlacionada con, la cantidad de fármaco que está disponible en el sitio diana de acción.

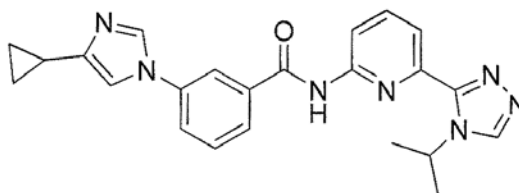
Otra propiedad deseable es tener un compuesto con una proporción baja de flujo de salida de membrana celular determinada mediante estudios de permeabilidad en células CACO. Se prefiere una proporción de flujo de salida  $((B/A)/(A/B))$  inferior a 3,0. Es de esperar que un compuesto con una proporción mayor a 3 esté sometido a un rápido flujo de salida activo de la célula y puede no durar lo suficiente en la célula como para que se alcance una eficacia máxima.

Otro objetivo deseable es descubrir un fármaco que exhiba una inhibición mínima fuera de la diana. Esto es, un fármaco que inhiba mínimamente las enzimas Cyp450 (citocromo P450). Más particularmente, se desea un fármaco que sea un inhibidor débil de cyp3A4, la más importante de las enzimas P450. Un inhibidor débil es un compuesto que provoca un aumento en los valores AUC en plasma de al menos 1,25 veces pero de menos de 2 veces, o 20-50% de disminución en el aclaramiento ([wikipedia.org/wiki/cyp3A4](http://wikipedia.org/wiki/cyp3A4), visitada el 12 Noviembre de 2011). Generalmente, se

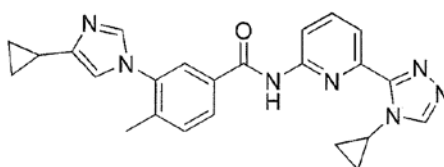
considera un inhibidor débil un compuesto que exhibe un  $CI_{50}$  de CYP3A4 mayor a  $10\mu M$ .

Una medida útil para comparar la inhibición de cyp3A4 entre los candidatos a droga es la proporción de la inhibición de cyp3A4 y la  $CE_{50}$  ajustada a la unión a proteína. Este valor da una indicación del potencial relativo de inhibición de cyp  
5 corregida por la  $CE_{50}$  ajustada a la unión a proteína que es específica de cada fármaco. Se prefiere una proporción más alta en esta medida como indicativa de menor potencial de inhibición de cyp3A4.

Inesperadamente y de forma ventajosa, los solicitantes han descubierto un  
10 compuesto (de fórmula (I) en el presente documento) dentro del alcance genérico de la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2001/00095410A1 que proporciona ventajas en comparación con los compuestos estructuralmente cercanos (en el presente documento designados como compuestos A y B) divulgados en Publicación de Patente de EE.UU. N° 2001/00095410A1.



Compuesto A



Compuesto B.

Por lo tanto, los objetos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, la provisión de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y métodos de uso del compuesto de fórmula (I) para el tratamiento de la enfermedad renal, enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, la nefropatía diabética, fibrosis renal o fibrosis pulmonar.

### Terapia Combinada

Los pacientes que reciben tratamiento contra enfermedades cardiorrenales, tal como la enfermedad renal crónica, pueden beneficiarse de un tratamiento de combinación de fármacos. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención se puede combinar con uno o más de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), tales como enalapril, captopril, ramipril, lisinopril, y quinapril; o bloqueadores de los receptores de angiotensina II (BRA), tales como losartan, olmesartan, e irbesartan; o agentes antihipertensivos tales como amlodipina, nifedipina, y felodipino. El beneficio de la combinación puede ser el aumentar la eficacia y/o reducir los efectos secundarios de un componente ya que la dosis de ese componente puede ser ajustada hacia abajo para reducir sus efectos secundarios al mismo tiempo que se obtiene el beneficio de su eficacia aumentada por la eficacia del compuesto de fórmula (I) y/u otro(s) componente(s) activo(s).

Los pacientes que presentan insuficiencia renal crónica tratable con inhibidores de la ASK1, tales como el compuesto de fórmula (I), también pueden presentar afecciones que se benefician de la coadministración (según las indicaciones de un profesional de atención de salud calificado) de un agente o agentes terapéuticos como son los antibióticos, analgésicos, antidepresivos y/o ansiolíticos en combinación con el compuesto de fórmula (I). Los tratamientos combinados se pueden administrar simultáneamente o uno después del otro dentro de intervalos que deben ser determinados de acuerdo a las indicaciones de un profesional de atención de salud calificado o a través de una presentación en dosis fijas (todos los ingredientes activos se combinan en la forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido) de dos o más agentes activos.

### Composiciones Farmacéuticas y Administración

El compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen, como el ingrediente activo, el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más  
5 excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen diluyentes sólidos y rellenos inertes, diluyentes, incluyendo soluciones acuosas estériles y diversos solventes orgánicos, potenciadores de permeación, solubilizantes y adyuvantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar sólo o en combinación con otros agentes terapéuticos. Las composiciones se pueden preparar para su suministro en forma  
10 de comprimidos sólidos, cápsulas, comprimidos oblongos, ungüentos, parches de piel, de liberación sostenida, comprimidos de desintegración rápida, preparaciones para inhalación, etc. Las composiciones farmacéuticas típicas se preparan y/o se administran usando métodos y/o procesos bien conocidos en la técnica farmacéutica (véase, por ejemplo, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Co., Philadelphia, Pa.  
15 17<sup>a</sup> Ed. (1985); y *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, Inc. 3<sup>a</sup> Ed. (G. S. Banker & C. T. Rhodes, Eds.).

Las formulaciones para tratamientos combinados que comprenden el compuesto de fórmula (I) se pueden presentar como formulaciones de dosis fija, por ejemplo, comprimidos, elixires, líquidos, pomadas, inhalantes, geles, etc., usando procedimientos  
20 conocidos por un experto en la técnica.

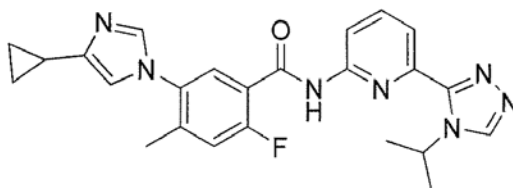
Las composiciones farmacéuticas del compuesto de fórmula (I) se pueden administrar en dosis únicas o múltiples dosis por vías que incluyen, por ejemplo, la vía rectal, bucal, intranasal y transdérmica; por inyección intraarterial, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía parenteral, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por  
25 vía oral, por vía tópica, como un inhalador o mediante un dispositivo impregnado o recubierto tal como un stent, por ejemplo, o un polímero cilíndrico insertado en la arteria. Las vías de administración preferidas incluyen la administración oral, parenteral e intravenosa.

El compuesto de fórmula (I) se puede administrar en una cantidad  
30 farmacéuticamente efectiva. En el caso de la administración oral, cada unidad de dosificación contiene preferiblemente de 1 mg a 500 mg del compuesto de fórmula

(I). Una dosis más preferida es de 1 mg a 250 mg del compuesto de fórmula (I). Se prefiere particularmente una dosis del compuesto de fórmula (I) que varía desde alrededor de 20 mg dos veces al día a alrededor de 50 mg dos veces al día. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad de compuesto realmente administrada por lo general será determinada por un médico a la luz de las circunstancias relevantes, las que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto coadministrado, si corresponde, la edad, peso, la respuesta individual del paciente, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

### Nomenclatura

El nombre del compuesto de la presente invención generado utilizando ChemBioDraw Ultra 11.



es 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-2-fluoro-4-metilbenzamida, también conocido como 5-((4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridina-2-il)-4-metilbenzamida.

### Síntesis del Compuesto de Fórmula (I)

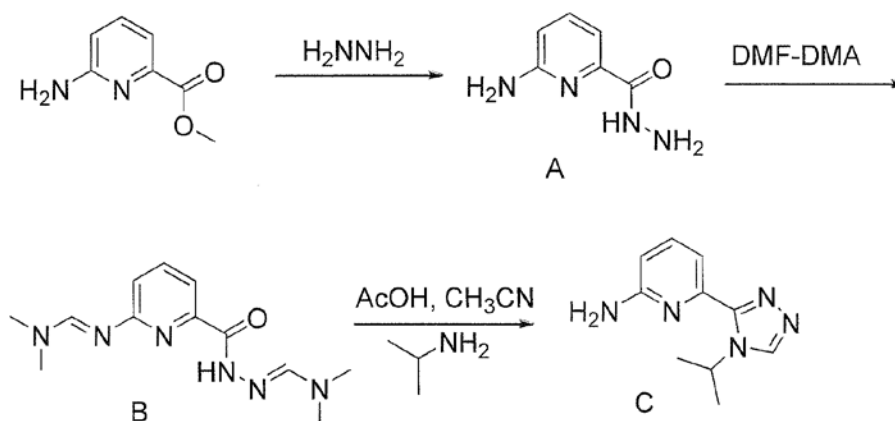
El compuesto de la invención se puede preparar usando métodos divulgados en este documento o modificaciones de los mismos que serán evidentes dada la descripción del presente documento. La síntesis del compuesto de la invención puede llevarse a cabo como se describe en el siguiente ejemplo. Si están disponibles, los reactivos se pueden comprar comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich u otros proveedores de productos químicos. Alternativamente, los reactivos se pueden preparar usando esquemas de reacción y métodos conocidos por un experto en la técnica.

## Parámetros de la Reacción de Síntesis

Los términos “solvente”, “solvente orgánico inerte” o “solvente inerte” se refieren a un solvente inerte bajo las condiciones de reacción que se describen junto con la descripción del mismo (incluyendo, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), éter dietílico, éter de petróleo (PE), metanol, piridina, etil acetato (EA) y similares. A menos que se especifique lo contrario, los solventes utilizados en las reacciones de la presente invención son solventes orgánicos inertes, y las reacciones se llevan a cabo bajo un gas inerte, preferiblemente nitrógeno.

- 10 Un método de preparación de compuestos de fórmula (I) se muestra a continuación en los Esquemas de Reacción 1 y 2.

Esquema 1



### 15 Preparación del Compuesto A

- A una solución de 6-aminopicolinato de metilo (432 g, 2,84 moles) en MeOH (5 L) se añadió  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (284 g, 5,68 moles, 2,0 eq.). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado formado en la mezcla se recolectó mediante filtración, se lavó con EA (2 L x 2) y después se secó al vacío para dar el compuesto A (405 g, rendimiento del 94%) como un sólido blanco.

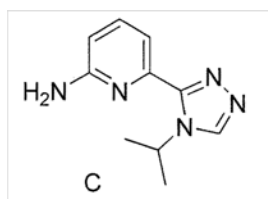
## Preparación del compuesto B

Una mezcla del compuesto **A** (405 g, 2,66 moles) en dimetilformamida-dimetilacetal (DMF-DMA) (3,54 L) se calentó a reflujo durante 18 h, se enfrió a temperatura ambiente y después se concentró bajo presión reducida. El residuo se recolectó en EA (700 mL) y se calentó a 50°C durante 20 min. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el sólido se recolectó mediante filtración y se secó al vacío para dar el compuesto **B** (572 g, rendimiento del 82%) como un sólido blanco.

## Preparación de C

A una solución del compuesto **B** (572 g, 2,18 moles) en una mezcla de CH<sub>3</sub>CN-AcOH (3,6 L, 4:1) se añadió propan-2-amina (646 g, 5,0 eq.). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 h y después se enfrió a temperatura ambiente, y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en agua (2,8 L) y se añadió NaOH acuoso 1 N a un pH de 8,0. El precipitado se recolectó mediante filtración y el filtrado se extrajo con EA (500 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y después se concentraron hasta un volumen de 150 mL. A esta mezcla a 0°C se añadió lentamente PE (400 mL) y la suspensión resultante se filtró. El sólido combinado se recrystalizó desde el EA-PE para dar el compuesto **C** (253 g, rendimiento del 57%) en forma de sólido blanquecino.

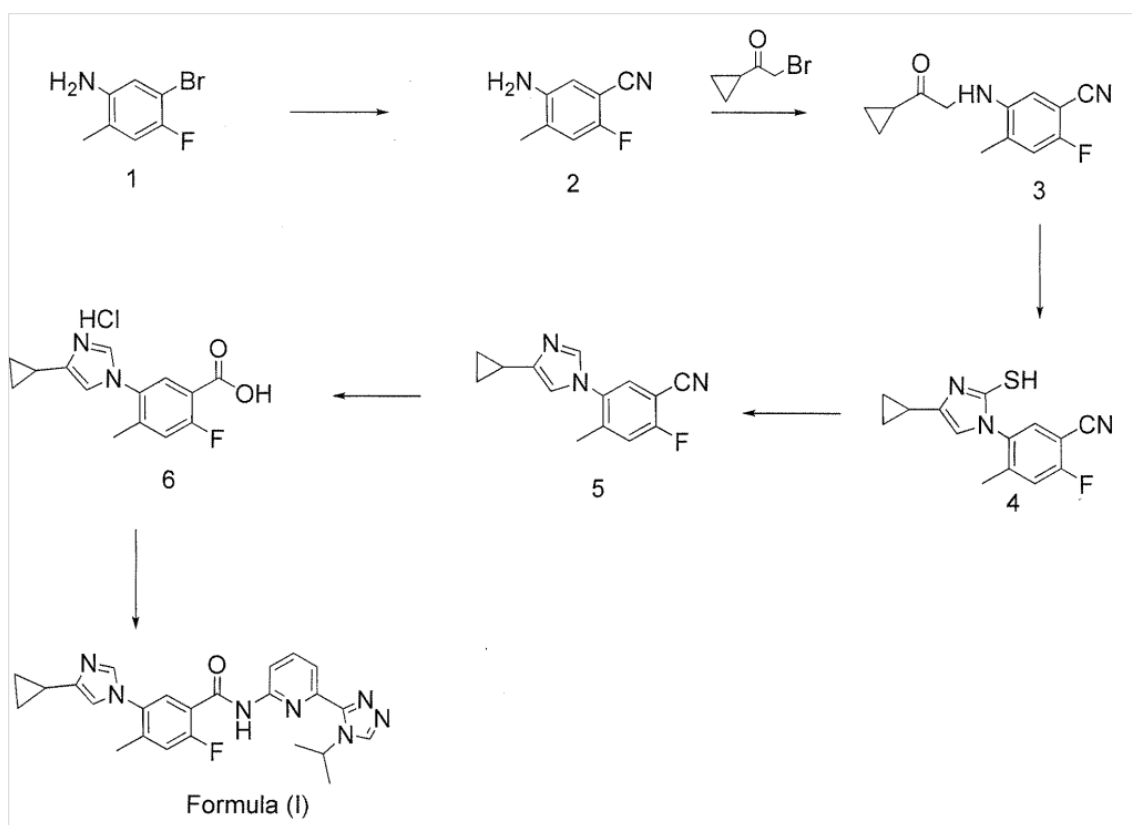
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,24 (s, 1 H); 7,52 (m, 2 H); 6,51 (dd, J=1,6, 7,2 Hz, 1 H); 5,55 (m, 1 H); 4,46 (bs, 2 H); 1,45 (d, J=6,8 Hz, 6 H). MS (ESI+) m/z: 204 (M+1)<sup>+</sup>. El compuesto C es un compuesto intermedio clave para la síntesis del compuesto de fórmula (I). Por lo tanto, un objeto de la presente invención es también la provisión del compuesto intermedio C,



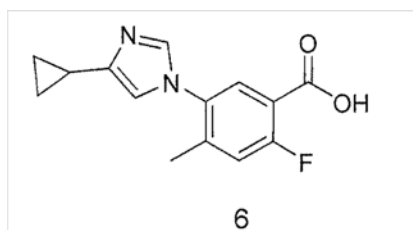
sus sales o sus formas protegidas, para la preparación del compuesto de fórmula (I). Un ejemplo de una sal del compuesto C es la sal de adición de HCl. Un ejemplo de una forma protegida del compuesto C es el compuesto carbamato tal como el que se obtiene con Cbz-Cl. Los grupos protectores, su preparación y usos se enseñan en G. M. Wuts y Theodora W. Greene, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 2ª edición, 1991, Wiley and Sons, Publishers.

### Esquema 2

Continuación de la preparación del compuesto de fórmula (I):



El compuesto 6 es un compuesto intermedio clave para la síntesis del compuesto de fórmula (I). Por lo tanto un objeto de la presente invención es también la provisión de compuesto intermedio 6,



sus sales o sus formas protegidas, para la preparación del compuesto de fórmula (I). Un ejemplo de una sal del compuesto 6 es la sal de adición de HCl. Un ejemplo de una forma protegida del compuesto 6 es un éster (por ejemplo, metil, etil o bencil ésteres) o el compuesto de carbamato tal como el que se obtiene con Cbz-Cl. Los grupos protectores, su preparación y usos se enseñan en Peter G. M. Wuts y Theodora W. Greene, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 2ª edición, 1991, Wiley and Sons, Publishers.

#### 10 Paso 1 - Preparación de 5-amino-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (2)

La 5-bromo-4-fluoro-2-metilanilina (1) inicial (20 g, 98 mmoles) se disolvió en 1-metilpirrolidinona anhidra (100 mL), y se añadió cianuro de cobre (I) (17,6 g, 196 mmoles). La reacción se calentó a 180°C durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente, y se añadió agua (300 mL) e hidróxido de amonio concentrado (300 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos y se extrajo con EA (3 x 200 mL). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo oleoso se lavó con hexanos (2 x 100 mL), y el sólido se disolvió en diclorometano y se cargó en una columna de gel de sílice. Se eluyó con 0 a 25% de EA en gradiente de hexano, lo que proporcionó 5-amino-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (10,06 g, 67,1 mmoles). LC/MS (m/z: 151 M<sup>+1</sup>).

#### Paso 2 - Preparación de 5-(2-ciclopropil-2-oxoetilamino)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (3)

Se disolvió 5-amino-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (12 g, 80 mmoles) en N,N-dimetilformamida anhidra (160 mL) bajo atmósfera de nitrógeno, y se añadió con agitación carbonato de potasio (13,27 g, 96 mmoles) y yoduro de potasio (14,61 g, 88 mmoles) en forma de sólidos. La reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura

ambiente y después se añadió bromometil ciclopropilcetona (20,24 ml, 180 mmoles). La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 3 horas, y luego se eliminaron los solventes bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EA (400 mL) y se lavó con 400 mL de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se volvió a disolver en una cantidad mínima de EA, y se añadieron hexanos para llevar la solución a una proporción de hexanos: EA de 3: 1 en volumen. El producto precipitó desde la solución y se recolectó mediante filtración para dar 5-(2-ciclopropil-2-oxoetilamino)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (14,19 g, 61,2 mmoles). LC/MS (m/z: 233, M<sup>+</sup>).

10 Paso 3 - Preparación de 5-(4-ciclopropil-2-mercapto-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (4)

Se disolvió 5-(2-ciclopropil-2-oxoetilamino)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (14,19g, 61,2 mmoles) en ácido acético glacial (300 mL). Se añadió con agitación tiocianato de potasio (11,9 g, 122,4 mmoles) como un sólido. La mezcla de reacción se calentó a 110°C durante 4 horas, en cuyo momento el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se recolectó en diclorometano (200 mL) y se lavó con 200 mL de agua. El extracto acuoso se extrajo con (2 x 200 mL) diclorometano adicional, los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio. El solvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo oleoso se volvió a disolver en EA (50 mL) y se añadió 150 mL de hexanos. Se formó una capa oscura y se añadió al matraz una barrita de agitación. La agitación vigorosa provocó que el producto precipitara en forma de un sólido de color durazno. El producto se recolectó mediante filtración, para dar 5-(4-ciclopropil-2-mercapto-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo, (14,26 g, 52,23 mmoles). Anal. LC/MS (m/z: 274, M<sup>+</sup>).

25 Paso 4 - Preparación de 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (5)

En un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 500 mL se colocó ácido acético (96 mL), agua (19 mL) y peróxido de hidrógeno (30%, 7,47 mL, 65,88 mmoles). La mezcla se calentó a 45 °C con agitación bajo atmósfera de nitrógeno mientras se controlaba la temperatura interna. Después se añadió 5-(4-ciclopropil-2-

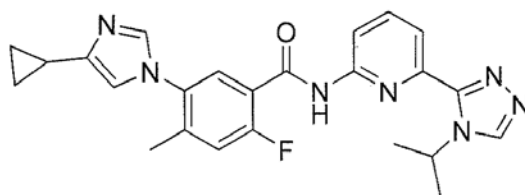
mercapto-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (6,00 g, 21,96 mmoles) como sólido en pequeñas porciones durante 30 minutos mientras se mantenía la temperatura interna bajo 55°C. Cuando se completó la adición de tioimidazol la reacción se agitó durante 30 minutos a una temperatura de 45°C, y después se enfrió a temperatura ambiente, y se añadió lentamente una solución de sulfito de sodio en agua a 20% p/p (6 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos y los solventes se eliminaron bajo presión reducida. El residuo se suspendió en 250 mL de agua y se añadió hidróxido de amonio acuoso 4N para llevar el pH a ~10. La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 200 mL), los productos orgánicos combinados, se secaron sobre sulfato de magnesio, y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de EA, y se añadió 80 mL de hexanos con agitación. Los solventes se separaron por decantación dejando un residuo oleoso. Este proceso se repitió y el producto 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo se obtuvo como un aceite viscoso (5,14 g, 21,33 mmoles) Anal. LC/MS (m/z: 242,  $M^{+1}$ ).

15 Paso 5 - Preparación de clorhidrato de ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico (6)

Se colocó 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (11,21 g, 46,50 mmoles) en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador de reflujo, y se suspendió en ácido clorhídrico al 38% (200 mL). La mezcla se calentó a 100°C durante 4,5 horas, y después se enfrió a temperatura ambiente. El solvente se eliminó bajo presión reducida para dar un sólido de color rosado, al que se añadió 100 mL de EA. El producto sólido se recolectó mediante filtración y se lavó con 3 x 100 mL de EA. Se añadió al producto sólido 100 mL de metanol al 10% en diclorometano, la mezcla se agitó, y el filtrado se recolectó. Esto se repitió con 2 porciones más de 100 mL de metanol al 10% en diclorometano. Los filtrados se combinaron y el solvente se eliminó bajo presión reducida, para proporcionar clorhidrato de ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico. No se llevó a cabo ninguna purificación adicional (11,13 g, 37,54 mmoles). Anal. LC/MS (m/z: 261,  $M^{+1}$ ).

30 Paso 6 - Preparación de 5-(4-ciclopropil-1 H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-4-metilbenzamida - fórmula (I)

Clorhidrato de ácido 5-(4-ciclopropil-1 H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico (1,5 g, 5,07 mmoles) se suspendió en 1,2-diclorometano anhidro (25 mL) a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de oxalilo (0,575 mL, 6,59 mmoles) con agitación bajo atmósfera de nitrógeno, seguido de la adición de N, N-dimetilformamida (0,044 mL, 0,507 mmoles). La mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente, y luego se eliminó el solvente bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 25 mL de diclorometano anhidro. Rápidamente se añadió 6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-amina (1,13 g, 5,58 mmoles) (compuesto C) y 4-dimetilaminopiridina (0,62 g, 5,07 mmoles) con agitación bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se añadió NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (15 mL). La mezcla se agitó durante 10 minutos, y las capas se separaron, y la capa acuosa se lavó 1 x 20 mL de diclorometano. Los productos orgánicos combinados se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH<sub>3</sub>CN y se añadió agua lentamente hasta que los sólidos precipitaron desde la mezcla. El sólido se recolectó mediante filtración y se secó para dar 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-4-metilbenzamida con ~96% de pureza (1,28 g, 2,88 mmoles). Anal. LC/MS (m/z: 446, M<sup>+</sup>). El material se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC (HPLC de fase inversa) para obtener una muestra analíticamente pura como la sal de HCl.



20

C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>7</sub>O·HCl, 446,2 (M+1), <sup>1</sup>H-NMR (DMSO): δ 11,12 (s, 1H); 9,41 (s, 1H); 9,32 (s, 1H); 8,20 (d, J=8,4 Hz, 1H); 8,07 (t, J=8,4 Hz, 1H); 7,95 (d, J=6,4 Hz, 1H); 7,92 (d, J=7,6 Hz, 1H); 7,79 (s, 1H); 7,59 (d, J=10,4 Hz, 1H); 5,72 (sept, J=6,8 Hz, 1H); 2,29 (s, 3H); 2,00-2,05 (m, 1H); 1,44 (d, J=6,8 Hz, 6H); 1,01-1,06 (m, 2H); 0,85-0,89 (m, 2H).

25

### Ensayos biológicos

## **Ensayo de Quinasa TR-FRET (determinación bioquímica de $CI_{50}$ ) de ASK1 (Quinasa 1 Reguladora de la Señal de Apoptosis)**

La capacidad de los compuestos para inhibir la actividad quinasa de la ASK1 se determinó usando un ensayo de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo [TR- FRET] que utiliza como el sustrato de proteína la proteína básica de la mielina biotinilada [biotina-MBP]. Se utilizó un robot manipulador de líquidos Beckman Biomek FX para colocar 2  $\mu$ L/pocillo de los compuestos en DMSO acuoso al 2,44% en placas de polipropileno de bajo volumen de 384 pocillos [Nunc, # 267460] para dar una concentración final de entre 100 $\mu$ M y 0,5nM de compuesto en el ensayo de quinasa. Se utilizó un manipulador de líquidos Deerac Fluidics Ecuator para dispensar 3  $\mu$ L/pocillo de 0,667ng/ $\mu$ L [Upstate Biotechnologies, #14-606, o la proteína equivalente de elaboración propia] y 0,1665 ng/mL de biotina-MBP [Upstate Biotechnologies, #13-111] en tampón (MOPS 85mM, pH 7,0, acetato de Mg 8,5 mM, glicerol al 5%, NP-40 al 0,085%, DTT 1,7 mM y BSA1,7 mg/mL) en las placas que contenían los compuestos.

La enzima se dejó pre-incubar con el compuesto durante 20 minutos antes de iniciar la reacción de la quinasa con la adición de 5  $\mu$ L/pocillo de ATP 300  $\mu$ M en tampón (MOPS 50 mM, pH 7,0, acetato de Mg 5 mM, DTT 1 mM, DMSO 5%) usando el manipulador de líquidos Deerac Fluidics Ecuator. Se dejó que se desarrollaran las reacciones de quinasa durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se detuvieron con la adición de 5  $\mu$ L/pocillo de EDTA 25 mM utilizando el Deerac Fluidics Ecuator. A continuación, el Biomek FX se utilizó para transferir 1  $\mu$ L/pocillo de cada reacción de quinasa completada a los pocillos de una placa de poliestireno blanco OptiPlate-1536 [PerkinElmer, # 6004299] que contenían 5  $\mu$ L/pocillo de reactivos de detección (anticuerpo marcado anti-fosfotreonina Eu-W1024 1,11 nM [PerkinElmer, # AD0094] y estreptavidina-aloficocianina 55,56 nM [PerkinElmer, # CR130-100] en tampón de detección LANCE 1x [PerkinElmer, # CR97-100]). A continuación, la señal de TR-FRET se leyó en un lector de placas Perkin Elmer Envision después de incubar las placas a temperatura ambiente durante 2 horas.

Los pocillos de control de 100% de inhibición positiva se generaron mediante la conmutación del orden de adición de las soluciones de EDTA y ATP descritas

anteriormente. Estos pocillos y los pocillos de 0% de inhibición que contenían DMSO al 2,44% al comienzo del ensayo se usaron en el cálculo del % de inhibición de los compuestos de ensayo.

### Resultado

5 El compuesto de fórmula (I) inhibió la ASK1 con una  $CI_{50}$  de 3,0 nM. Estos datos sugieren que el compuesto de fórmula (I) es un potente inhibidor de ASK1 en presencia del ligando competitivo ATP.

En una versión actualizada del ensayo anterior, se examinó la actividad inhibitoria del compuesto de la invención contra ASK1 utilizando un ensayo TR-FRET para ASK1, el cual determinó la cantidad de fosfato transferido a un sustrato peptídico desde ATP.

10

### **Materiales y métodos**

#### **Reactivos**

La quinasa ASK1 humana recombinante desfosforilada se obtuvo de Gilead Sciences. La molécula pequeña inhibidora de quinasa estaurosporina (Catálogo # S6942) y ditioneitol (DTT, Catálogo #43815-5G) se obtuvieron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). El ATP (catálogo # 7724) se obtuvo de Affymetrix (Santa Clara, CA) y el compuesto de fórmula (I) se obtuvo de Gilead Sciences. El Kit HTRF KinEASE™-STK S3 se obtuvo de Cisbio (Bedford, Mass). Todos los demás reactivos fueron del mayor grado comercialmente disponible.

15

20

#### **Ensayos**

El ensayo mide el nivel de fosforilación de un sustrato peptídico biotinilado por la quinasa ASK1 usando detección por HTRF (6.1). Este es un inmunoensayo de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo (TR-FRET), realizado en base al manual de HTRF® KinEASE™-STK de Cisbio (6.1). El compuesto de prueba, sustrato peptídico STK3 1  $\mu$ M, y 4 nM de ASK1 quinasa se incubaron durante 30 minutos con tampón MOP 10 mM pH 7,0, que contiene acetato de

25

Mg 10 mM, NP-40 0,025%, DTT 1 mM, BSA 0,05% y glicerol al 1,5%, y luego se añadió ATP 100  $\mu$ M para iniciar la reacción de quinasa y se incubó durante 3 h. El anticuerpo peptídico marcado con criptato  $\text{Eu}^{3+}$  1x en tampón que contiene EDTA 10 mM y estreptavidina XL665 125 nM se añadió para detener la reacción y el sustrato peptídico fosforilado se detectó usando un lector Envision 2103 Multilabeled de PerkinElmer. La fluorescencia se midió a 615 nm (criptato) y 665 nm (XL665) y se calculó para cada pocillo una proporción de 665 nm /615 nm. El nivel de TR-FRET resultante (una razón de 665 nm/615 nm) es proporcional al nivel de fosforilación. Bajo estas condiciones de ensayo, el grado de fosforilación de sustrato peptídico fue lineal con el tiempo y la concentración de la enzima. El sistema de ensayo produjo resultados consistentes con respecto a  $K_m$  y las actividades específicas de la enzima. En los experimentos de inhibición (valores de  $\text{CI}_{50}$ ), las actividades se determinaron con concentraciones constantes de ATP, péptido y varias concentraciones fijas de inhibidores. Se utilizó como control positivo la estaurosporina, inhibidor no selectivo de la quinasa,. Todos los datos de la actividad de la enzima se informaron como un promedio de determinaciones en cuadruplicado.

### Análisis de Datos

Los valores de  $\text{CI}_{50}$  se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$y = \text{Rango } l / \{1 + (x / \text{CI}_{50})^s\} + \text{fondo}$$

donde x e y representan respectivamente la concentración de inhibidores y la actividad de la enzima. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de fosfato incorporado en el péptido sustrato desde ATP. El rango es el rango máximo en y (sin inhibidor, control DMSO) y s es un factor de pendiente (6.2).

### Resultados

El compuesto de fórmula (I) exhibió una  $\text{CI}_{50}$  de 3,2 nM bajo estas condiciones de prueba. Los datos demuestran que el compuesto de fórmula (I) es un potente inhibidor del receptor 1 de la ASK-1.

## Ensayo (determinación de CE50 celular) de ASK1 (Quinasa 1 Reguladora de la Señal de Apoptosis) basado en células 293

La potencia celular de los compuestos se analizó en células que expresan establemente un constructo de AP-1: reportero de luciferasa (células 293/AP1-Luc Panomics Inc., 6519 Dumbarton Circle, Fremont, CA). Las células fueron infectadas con un adenovirus que expresaba quinasa ASK1 activa (631-1381 de ADNc de ASK1 de rata), la que activará el factor de transcripción AP-1 y aumentará la expresión de la luciferasa. Los inhibidores de ASK1 disminuirán la actividad enzimática de ASK1 y por lo tanto disminuirán la actividad del factor de transcripción AP-1 y la expresión de la luciferasa.

### 1. MATERIALES NECESARIOS PARA ESTE PROTOCOLO

| Medios y Reactivos                                                                     | Compañía de Origen                    | Nº de Catálogo     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Línea Celular Estable 293 con AP-1 como reportero                                      | Panomics                              | Desconocido        |
| DMEM (con mucha glucosa, sin L-glutamina, con piruvato, con HEPES)                     | Media Tech                            | 15-018-CM          |
| DMEM (con mucha glucosa, sin L-glutamina, sin piruvato, sin HEPES, sin rojo fenol)     | Invitrogen                            | 31053-028          |
| HEPES, 1M                                                                              | Invitrogen                            | 15630-080          |
| Piruvato de Sodio, 100mM                                                               | Invitrogen                            | 11360-070          |
| Suero fetal bovino, "FBS"                                                              | Hyclone                               | SH30088.03         |
| Pen-Strep-Glut., "PSG"                                                                 | Invitrogen                            | 10378-016          |
| Higromicina B                                                                          | Calbiochem                            | 400052             |
| PBS de Dulbecco (estéril)                                                              | MediaTech                             | 21-030-CM          |
| Tripsina-EDTA (0,25%)                                                                  | Invitrogen                            | 25200-056          |
| Sistema de Ensayo de Luciferasa Steady-Glo                                             | Promega                               | E2550              |
|                                                                                        |                                       |                    |
| Material de Laboratorio                                                                | Origen                                | Nº de Catálogo     |
|                                                                                        |                                       |                    |
| Frascos (revestidos con poli-D-Lisina, 150 cm <sup>2</sup> , tapa ventilada)           | BD Biosciences                        | 356538             |
| Placas (revestidas con poli-D-Lisina, de 384 pocillos, blancas/claras, estériles, TCT) | Greiner ( a través de VWR Scientific) | 781944 (82051-354) |

|                                                                                                 |                |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------|
| Cinta de recubrimiento blanca                                                                   | PerkinElmer    | 6005199   |
| Filtros para cultivo celular (40 µm de nylon, anillo azul, se justan a viales cónicos de 50 mL) | VWR Scientific | 21008-949 |

## 2. MATERIALES DE REFERENCIA

Instructivo del producto línea celular estable 293/AP1-Luc de Panomics.

Instructivo del producto del Sistema de Ensayo de Luciferasa Steady-Glo de Promega.

## 5 3. MEDIOS NECESARIOS

Medio de cultivo completo, “CGM”

DMEM (MediaTech)

FBS al 10%

PSG al 1%

10 Higromicina B 100 µg/mL

Medio de Ensayo, “AM”

DMEM (Invitrogen)

HEPES 25 mM

Piruvato de Sodio 1 mM

15 PSG 1%

## 4. MÉTODOS

#### Mantenimiento:

Las células 293 se mantienen en el constructo 293/AP1-Luc según las instrucciones del vendedor; las células se cosecharon a una confluencia de ~80% en matraces T150 de la siguiente manera:

- 5 Aspirar el medio, lavar suavemente con ~12 mL de D-PBS estéril, aspirar.  
Añadir 5 ml de Tripsina-EDTA, ladear suavemente el frasco para recubrir, e incubar ~5 min a 37°C.  
No golpetear el frasco; añadir 5 ml de CGM, lavar frasco 4X con suspensión celular, transferir a un vial cónico de 50 mL, centrifugar 5 min a 1.200 rpm.
- 10 Aspirar el medio desde el pellet de células, añadir de 20 a 30 ml de CGM, resuspender el pellet pipeteando 6X, pasar a través de filtro de células para dispersar los agregados (si es necesario), y contar las células con un hemocitómetro.

#### Día 1 de Ensayo:

- 15 Cosechar las células como se describe anteriormente, excepto que no se resuspende el pellet de células.

Contar las células y diluir hasta  $1,5 \times 10^5$  células por mL; añadir adenovirus de tal manera que haya 5 unidades infecciosas formadoras por célula.

- 20 Cebiar las células (20 a 30 mL) y sembrar las células en placas Greiner de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina a  $1,2 \times 10^4$  células por pocillo usando BioTek uFill (80 µL por pocillo).

Inmediatamente dosificar las placas con 0,4 µL de una serie dosis del compuesto (en DMSO al 100%) incubar 24 horas en una incubadora humidificada (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>).

#### Día 2 de Ensayo:

- 25 Procesar las placas de proceso (según las instrucciones del fabricante) de la siguiente manera:

Colocar las placas en una campana de flujo laminar y exponerlas durante 30 minutos a temperatura ambiente para enfriar.

Retirar 60  $\mu$ L de AM de pocillos de ensayo

5 Añadir 20  $\mu$ L sustrato Firefly Steady-Glo por pocillo, dejar reposar durante 10-20 minutos a temperatura ambiente

Cubrir el fondo de las placas de ensayo con cinta de recubrimiento blanca.

Obtener datos con un lector de fluorescencia de placas

10 Los pocillos de control positivo de inhibición del 100% se generaron mediante la infección de células con un adenovirus que expresa ASK1 mutante catalíticamente inactiva con una mutación de lisina a arginina en el residuo 709.

### Resultado

El compuesto de fórmula (I) exhibe una  $CE_{50}$  de 2,0 nM.

### **Determinación de $K_d$**

#### Ensayos de Quinasa

15 Se prepararon cepas del fago T7 etiquetadas con quinasa en un hospedero *E. coli* derivado de la cepa BL21. Las cepas de *E. coli* se cultivaron hasta la fase de crecimiento logarítmico y se infectaron con fago T7 y se incubaron con agitación a 32 °C hasta que se produjo la lisis. Los lisados se centrifugaron y se filtraron para eliminar los residuos celulares. Las restantes quinasas se produjeron en células HEK-293 y posteriormente  
20 fueron etiquetadas con ADN para la detección por qPCR. Perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina fueron tratadas con ligandos de molécula pequeña biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para los ensayos de quinasa.

Las perlas con ligandos fueron bloqueadas con un exceso de biotina y se lavaron con tampón de bloqueo (SeaBlock (Pierce), 1% de albúmina de suero de bovino, 0,05% de Tween 20, DTT (ditiotreitól) 1 mM) para eliminar el ligando no unido y para reducir la unión no específica. Las reacciones de unión se montaron mediante la combinación de quinasas, perlas de afinidad con ligando, y los compuestos de ensayo en tampón de unión 1x (SeaBlock al 20%, PBS 0,17x, Tween 20 al 0,05%, DTT 6 mM). Todas las reacciones se llevaron a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos en un volumen final de 0,135 mL. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y las perlas de afinidad se lavaron con tampón de lavado (PBS lx, Tween 20 al 0,05%). Luego, las perlas se resuspendieron en tampón de elución (PBS lx, Tween 20 al 0,05%, ligando de afinidad no biotinilado 0,5  $\mu$ M) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de quinasa en los eluatos se midió mediante qPCR.

Las constantes de unión ( $K_d$ ) se calcularon con una curva de dosis-respuesta estándar usando la ecuación de Hill.

### Resultado

El compuesto de fórmula (I) exhibió una  $K_d$  de 0,24 nM. Estos datos sugieren que el compuesto de fórmula (I) se une potentemente al receptor de ASK1 en ausencia de ATP.

## **20 Determinación del Porcentaje de Compuesto unido al Plasma**

### Diseño Experimental:

En estos experimentos se utilizaron celdas de diálisis de Teflón de 1 mL de Harvard Apparatus (Holliston, Mass, EE.UU.). Antes del estudio, la membrana de diálisis se empapó durante alrededor de una hora en tampón de fosfato 0,133 M, pH 7,4. Una concentración nominal de 2  $\mu$ M del compuesto se añadió en 1 mL de plasma o 1 mL de medio de cultivo celular. El volumen total de líquido en cada lado de la célula fue de 1 mL. Después de 3 horas de equilibrio en un baño de agua a 37°C, las muestras de cada lado de la celda fueron alicuotadas en los viales adecuados que contenían, ya

sea, 1 mL de plasma humano (medio de cultivo celular), o tampón. Los viales de muestra se pesaron y se registraron. Una alícuota de 100 µL se retiró y se añadió a 400 µL de una solución de extinción (50% metanol, 25% de acetonitrilo, 25% de agua y el patrón interno). Las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 G. Se sacaron 200 µL del sobrenadante y se colocaron en una nueva placa de 96 pocillos. Se añadió un adicional de 200 µL de ACN: agua 1:1. Luego, la placa se agitó en vórtex y se sometió a análisis por LC-MS. El porcentaje no unido de un analito en plasma se calculó utilizando las siguientes ecuaciones

$$\% \text{ No unido} = 100 (C_f/C_t)$$

- 10 donde  $C_f$  y  $C_t$  son , respectivamente, las concentraciones en plasma y tampón después de diálisis.

### Resultados

El porcentaje no unido del compuesto de fórmula (I) medido en el plasma humano fue de 11,94%

### 15 **Determinación de la proporción de flujo de salida en células CACO-2**

#### Protocolo Experimental:

- Las células CACO-2 se mantuvieron en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con piruvato de sodio, Glutmax suplementado con 1 % penicilina/estreptomicina, 1% de NEAA y suero bovino fetal al 10% en una incubadora a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células CACO-2 entre el pasaje 62 y 72 fueron sembradas a 2.100 células/pocillo y se cultivaron hasta la confluencia durante al menos 21 días en una placa PET (polietileno-tereftalato) de 24 pocillos (BD Biosciences). El pocillo receptor contenía tampón HBSS (HEPES 10 mM, glucosa 15 mM con pH ajustado a pH 6,5) suplementado con 1% de BSA, el pH se ajustó a pH 7,4.
- 25 Después de un periodo de equilibrio inicial con tampón de transporte, se leyeron los valores de TEER para comprobar la integridad de membrana. Se añadió los tampones que contenían compuestos de prueba y desde el compartimiento receptor se tomaron 100 µL de la solución a las 1 y 2 horas. El tampón removido se sustituyó con tampón

fresco y se aplicó una corrección a todos los cálculos para tomar en cuenta el material retirado. El protocolo experimental se llevó a cabo por duplicado. Todas las muestras fueron inmediatamente recolectadas en 400  $\mu$ L de ácido acetonitrilo al 100% para precipitar la proteína y estabilizar los compuestos de prueba. Las células se dosificaron en el lado apical o basolateral para determinar la permeabilidad directa (de A a B) y reversa (de B a A). También se determinó la permeabilidad a través de un pocillo libre de células como una medida de la permeabilidad celular a través de la membrana sin unión específica. Para determinar la unión no específica y la inestabilidad del compuesto se determina el porcentaje de recuperación. Las muestras se analizaron mediante LC/MS/MS.

La permeabilidad aparente,  $P_{ap}$ , y el % de recuperación se calculó de la siguiente manera:

$$P_{ap} = (dR/dt) \times V_r / (A \times D_0)$$

$$\% \text{ Recuperación} = 100 \times ((V_r \times R_{120}) + (V_d \times D_{120})) / (V_d \times D_0)$$

en donde,

$dR/dt$  es la pendiente de la concentración acumulativa en el compartimento receptor versus el tiempo en  $\mu$ M/s en base a las concentraciones en el compartimento receptor medidas a los 60 y 120 minutos.

$V_r$  y  $V_d$  es, respectivamente, el volumen en el compartimento receptor y el volumen en el compartimento donante en  $\text{cm}^3$ .

$A$  es el área de la monocapa celular ( $0,33 \text{ cm}^3$ ).

$D_0$  y  $D_{120}$  es, respectivamente, la concentración en el compartimento donante medida al principio y al final del experimento.

$R_{120}$  es la concentración en el compartimento receptor al final del experimento (120 minutos).

### Absorción y Clasificación del Flujo de Salida:

|                                                                                                   |                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| $P_{ap} (A \rightarrow B) \geq 1,0 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$                                   | Alto                                  |
| $1,0 \times 10^{-6} \text{ cm/s} > P_{ap} (A \rightarrow B) \geq 0,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ | Medio                                 |
| $P_{ap} (A \rightarrow B) < 0,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$                                      | Bajo                                  |
| $P_{ap} (B \rightarrow A) / P_{ap} (A \rightarrow B) \geq 3$                                      | Flujo de Salida significativo         |
| % de recuperación < 20%                                                                           | Puede afectar la permeabilidad medida |
| $P_{ap}$ libre de células < 15                                                                    | Puede afectar la permeabilidad medida |

### Resultado

Se observó que el compuesto de fórmula (I) tenía un valor de A→B para células CACO de 27; y un valor de B→A para células CACO de 35 lo que da como resultado una proporción de flujo de salida (B→A)/(A→B) de 1,3.

### **Determinación de la Estabilidad Metabólica en la Fracción Microsomal Hepática:**

#### Protocolo Experimental:

La estabilidad metabólica se evaluó utilizando cofactores tanto para el metabolismo oxidativo (NADPH) como para la conjugación (ácido UDP glucurónico (UDPGA)). Se añadieron alícuotas por duplicado del compuesto de fórmula (I) (3 µL de stock de DMSO 0,5 mM) o de estándares de estabilidad metabólica (buspirona) a un stock de microsomas diluido con tampón de fosfato de potasio pH 7,4, para obtener una concentración de proteína de 1,0 mg/mL que contiene alameticina como un agente permeabilizante. Las reacciones metabólicas se iniciaron mediante la adición de sistema de regeneración de NADPH y el cofactor UDPGA. La composición final de cada mezcla de reacción fue: compuesto de prueba a 3 µM, 1 mg de proteína microsomal/mL, UDPGA 5 mM, 23,4 µg/mL de alameticina, NADP 1,25 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM, 0,4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y MgCl<sub>2</sub> 3,3 mM en tampón de fosfato de potasio 50 mM pH 7,4. Alícuotas de 25 µL de la mezcla de reacción se transfirieron a placas que contenían 250 µL de IS/Q (solución de extinción que contiene un patrón interno) a los 0, 2, 5, 10, 15, 30, 45, y 60 min. Después de la extinción de la reacción, las placas se centrifugaron a 3.000 x g durante 30 minutos, y alícuotas de 10 µL del sobrenadante fueron analizadas mediante LC/MS para obtener razones de área de pico de analito/patrón interno.

La estabilidad metabólica en las fracciones microsomales se determinó midiendo la velocidad de desaparición del compuesto de fórmula (I). Los datos (% remanente del compuesto original) se graficaron en una escala semi-logarítmica y se ajustaron usando un ajuste exponencial:

5  $C_t = C_0 \cdot e^{-K \cdot t}$  y  $T_{1/2} = \ln 2 / K$  en donde

$C_t$  % del compuesto original que queda en el tiempo = t

$C_0$  % del compuesto original que queda en el tiempo = 0

t tiempo (h)

10  $K$  constante de velocidad de eliminación de primer orden ( $h^{-1}$ )

$T_{1/2}$  vida media *in vitro* (h)

El aclaramiento hepático predicho se calculó como sigue {referencia 1}:

$$CL_{int} = K \cdot V \cdot Y_p / P \text{ o } CL_{int} = K \cdot V \cdot Y_H / H$$

15  $CL_h = (CL_{int} \cdot Q_h) / (CL_{int} + Q_h)$ , en donde

$CL_h$  aclaramiento hepático predicho (L/h/kg de peso corporal)

$CL_{int}$  aclaramiento hepático intrínseco (L/h/kg de peso corporal)

V volumen de incubación (L)

$Y_p$  producción de proteína en los microsomas (mg de proteína/kg de peso corporal)

20  $Y_H$  producción de hepatocitos (millones de células/kg de peso corporal)

P Masa de proteína en la incubación (mg)

$H$  Número de hepatocitos en la incubación (millones)

$Q_h$  Flujo sanguíneo hepático (L/h/kg de peso corporal)

- A continuación, se calculó la extracción hepática predicha mediante la comparación del aclaramiento hepático predicho con el flujo sanguíneo hepático. Un compuesto se consideró estable si la reducción de la concentración de sustrato fue <10% durante el transcurso de la incubación (lo que corresponde a una vida media extrapolada > 395 min en fracciones microsomales y > 39,5 horas en los hepatocitos).

Los valores utilizados para el cálculo del aclaramiento hepático predicho se muestran en las siguientes tablas:

10 **TABLA 1. Valores usados para el Cálculo del Aclaramiento Hepático Predicho en el Análisis de Estabilidad en Microsomas**

| Especies        | Microsomas Hepáticos |           |              | $Q_h$<br>(L/kg) |
|-----------------|----------------------|-----------|--------------|-----------------|
|                 | V<br>(L)             | P<br>(mg) | Y<br>(mg/kg) |                 |
| Rata            | 0,001                | 1,0       | 1.520        | 4,2             |
| Mono Cynomolgus | 0,001                | 1,0       | 684          | 1,6             |
| Mono Rhesus     | 0,001                | 1,0       | 1.170        | 2,3             |
| Perro           | 0,001                | 1,0       | 1.216        | 1,8             |
| Ser Humano      | 0,001                | 1,0       | 977          | 1,3             |

Resultado:

El aclaramiento hepático predicho en humanos determinado a partir de experimentos *in vitro* en fracciones microsomales es de 0,1 L/h/kg.

## 15 **Determinación CL y Vss en rata para los compuestos de prueba**

Farmacocinética de los Compuestos de Prueba después de una infusión IV de 1 mg/kg y una dosis VO de 5,0 mg/kg en ratas

Artículo de prueba y formulación

Para la administración IV, el compuesto de prueba se formuló en PEG 400: agua en proporción 60:40 con 1 equivalente de HCl a 0,5 mg/mL. La formulación se preparó en forma de solución.

5 Para la administración VO (oral), el compuesto de prueba se formuló en etanol/PG/Solutol/agua en proporción 5/75/10/10 a 2,5 mg/mL. La formulación se preparó en forma de solución.

### Animales utilizados

10 Cada uno de los grupos de dosificación IV y VO estuvo compuesto de 3 ratas SD macho. Al momento de la dosificación, en general los animales pesaron entre 0,317 y 0,355 kg. Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche anterior a la administración de la dosis y hasta 4 horas después de la dosificación.

### Dosificación

15 En el caso del grupo de infusión IV, el compuesto de prueba se administró mediante infusión intravenosa durante 30 minutos. La velocidad de infusión se ajustó de acuerdo con el peso corporal de cada animal para suministrar una dosis de 1 mg/kg a 2 mL/kg. En el caso del grupo de dosificación oral, el artículo de prueba se administró mediante sonda oral a 2 mL/kg para una dosis de 5,0 mg/kg.

### Toma de muestras

20 Se tomaron muestras de sangre venosa en serie (alrededor de 0,4 ml cada una) en puntos específicos de tiempo después de la dosificación de cada animal. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutainer™ (Becton-Disckinson Corp, New Jersey, USA) que contenían EDTA como anticoagulante y se colocaron inmediatamente en hielo húmedo en espera de ser centrifugadas para obtener el plasma.

### Determinación de las concentraciones del Compuesto de Fórmula (I) en el plasma

25 Se utilizó un método LC/MS/MS para medir la concentración del compuesto de prueba en plasma.

## Cálculos

Se realizó un análisis farmacocinético no compartimental de los datos de concentración en plasma/tiempo.

## Resultados

- 5 El compuesto de fórmula (I) mostró un CL de 0,09 L/h/kg; una biodisponibilidad oral del 75%;  $t_{1/2}$  de 5,07 horas y un Vss de 0,55 L/kg en ratas.

## **Ensayo de inhibición de Cyp**

### Objetivo

- 10 Evaluar el potencial del compuesto de prueba para inhibir las principales isoformas del citocromo P450, CYP1A, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 (2 sustratos).

Determinación de  $CI_{50}$  para la inhibición del citocromo P450 (8 isoformas, 9 sustratos)

### Resumen del Protocolo

- 15 El compuesto de prueba (0,1  $\mu$ M - 25  $\mu$ M) se incuba con microsomas hepáticos humanos y NADPH en presencia de un sustrato de sondeo específico para una isoforma de citocromo P450. Para las reacciones específicas de CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4, los metabolitos son monitoreados por espectrometría de masas. La actividad CYP1A se monitorea midiendo la formación de un metabolito fluorescente. Para calcular un valor de  $CI_{50}$  (concentración de compuesto de prueba que  
20 produce una inhibición del 50%) se utiliza la disminución en la formación del metabolito en comparación con el control tratado con vehículo.

### Requisitos de Ensayo

500  $\mu$ L de una solución de compuesto de prueba 10 mM en DMSO

## Procedimiento Experimental

### Inhibición de CYP1A

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,3%) con microsomas hepáticos humanos (0,25 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo etoxiresorufina (0,5  $\mu$ M) durante 5 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP1A, la alfa-naftoflavona.

### Inhibición de CYP2B6

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,3%) con microsomas hepáticos humanos (0,1 mg/mL) en presencia del sustrato de sondeo bupropión (110  $\mu$ M) durante 5 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP2B6, la ticlopidina.

### Inhibición de CYP2C8

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,3%) con microsomas hepáticos humanos (0,25 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo paclitaxel (7,5  $\mu$ M) durante 30 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP2C8, la ticlopidina .

### Inhibición de CYP2C9

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,25%) con microsomas hepáticos humanos (1 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo tolbutamida (120  $\mu$ M) durante 60 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP2C9, el sulfafenazol.

### Inhibición de CYP2C19

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,25%) con microsomas hepáticos humanos (0,5 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo mefenitoína (25  $\mu$ M) durante 60 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP2C19, la tranilcipromina.

#### Inhibición de CYP2D6

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,25%) con microsomas hepáticos humanos (0,5 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo dextrometorfano (5  $\mu$ M) durante 5 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP2D6, la quinidina.

#### Inhibición de CYP3A4 (Midazolam)

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,26%) con microsomas hepáticos humanos (0,1 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo midazolam (2,5  $\mu$ M) durante 5 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP3A4, el ketoconazol.

#### Inhibición de CYP3A4 (testosterona)

Se incuban seis concentraciones de compuesto de prueba (0,1; 0,25; 1; 2,5; 10; 25  $\mu$ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,275%) con microsomas hepáticos humanos (0,5 mg/mL) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato de sondeo testosterona (50  $\mu$ M) durante 5 min a 37°C. Como control positivo se analiza junto con los compuestos de prueba el inhibidor selectivo de CYP3A4, el ketoconazol.

Para las incubaciones CYP1A, las reacciones se terminaron con metanol, y la formación del metabolito, resorufina, se monitoriza mediante fluorescencia (longitud de onda de excitación = 535 nm, longitud de onda de emisión = 595 nm). Para las incubaciones de CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, las reacciones se terminaron con metanol. A continuación, las muestras fueron centrifugadas y se

combinaron los sobrenadantes para el análisis simultáneo de 4-hidroxitolbutamida, 4-hidroximefenitoína, dextrofan, y 1-hidroximidazolam mediante LC-MS/MS.

Hidroxibupropión, 6 $\alpha$ -hidroxipaclitaxel y 6 $\beta$ -hidroxitestosterona se analizaron mediante LC-MS/MS por separado. Antes del análisis se añadió a la muestra final ácido fórmico

- 5 en agua desionizada (concentración final = 0,1%), el que contenía un patrón interno. Para calcular un valor de CI<sub>50</sub> (concentración de compuesto de prueba que produce una inhibición del 50%) se utiliza la disminución en la formación de los metabolitos en comparación con el control tratado con vehículo.

### Resultados

| Isoforma de CYP40 | Sustrato         | Metabolito                      | CI50 calculada ( $\mu$ M) |
|-------------------|------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1A                | Etoxi-resorufina | Resorufina                      | > 25 $\mu$ M              |
| 1A2               | Fenacetina       | Acetaminofeno                   | > 25 $\mu$ M              |
| 2B6               | Bupropión        | Hidroxibupropión                | 19,2 $\mu$ M              |
| 2C8               | Paclitaxel       | 6 $\alpha$ -Hidroxipaclitaxel   | 21,6 $\mu$ M              |
| 2C9               | Tolbutamida      | 4-Hidroxitolbutamida            | > 25 $\mu$ M              |
| 2C19              | S-mefenitoína    | 4-Hidroximefenitoína            | > 25 $\mu$ M              |
| 2D6               | Dextrometorfán   | Dextrofan                       | 17,7 $\mu$ M              |
| 3A4               | Midazolam        | Hidroximidazolam                | 2,7 $\mu$ M               |
| 3A4               | Testosterona     | 6- $\beta$ -Hidroxitestosterona | 10,5 $\mu$ M              |

### 10 **Diseño general del estudio de fibrosis renal mediante el modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU) en ratas.**

- Se alimentaron ratas Sprague-Dawley macho con pienso normal, se las alojó bajo condiciones estándar, y se dejaron aclimatar durante al menos 7 días antes de la cirugía. Al comienzo del estudio, las ratas se colocaron en grupos de acuerdo a su peso,
- 15 y se les administró vehículo a través de sonda oral (2 mL/kg VO b.i.d.), y uno de cuatro niveles de dosis de los compuestos (1, 3, 10, o 30 mg/kg). Las ratas se anestesiaron con isoflurano a través de un cono nasal, y luego se realizó una laparotomía. A las ratas se les realizó una obstrucción completa del uréter derecho (OUU) usando instrumentos esterilizados por calor y una técnica quirúrgica aséptica. A las ratas se les administró 50
- 20  $\mu$ L de penicilina G (i.m.) inmediatamente después de la operación. Se dejó que las ratas se recuperaran en una jaula limpia y temperada antes de ser devueltas a las condiciones normales del terrario. A las ratas se les administró compuestos a las dosis anteriormente descritas dos veces al día (a intervalos de 12 horas) durante los 7 días posteriores. En el

día 7 después de la cirugía, las ratas se anestesiaron con isoflurano y se recolectó suero, plasma, y orina. Luego, los animales fueron sacrificados, se recolectaron los riñones y se tomaron biopsias de la corteza renal para análisis morfológicos, histológicos y bioquímicos. Todos los tejidos destinados a análisis bioquímico fueron congelados d  
5 manera instantánea en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C, los tejidos destinados a análisis histológico se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%.

La fibrosis renal se evaluó midiendo la cantidad de colágeno IV en el riñón mediante un método de ELISA y mediante el estudio de la acumulación de miofibroblastos positivos para alfa-actina de músculo liso en el riñón mediante análisis  
10 inmunohistoquímico. Para realizar el primer estudio, se transfirió un pequeño pedazo de la corteza renal congelada homogenizado en RIPA buffer, luego se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó en tubos pre-enfriados y se determinó la concentración de proteínas. Una cantidad equivalente de proteína total se sometió a un ensayo de ELISA Col IV (de Exocell) de acuerdo con las instrucciones del  
15 fabricante.

Tejido renal fijado en formalina y embebido en parafina fue teñido con una alfa-actina de músculo liso, como se describe anteriormente (Stambe *et al.*, The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Renal Fibrosis *J Am Soc Nephrol* 15: 370-379, 2004).

## 20 Resultados:

Se encontró que el compuesto de fórmula (I) redujo significativamente la inducción de Colágeno IV en el riñón de (Figura 1) y la acumulación de miofibroblastos musculares positivos para alfa-actina de músculo liso (figura 2) a dosis de 3 a 30 mg/kg.

## 25 Datos Comparativos del Compuesto de Fórmula (I) y los Compuestos de Referencia

La siguiente tabla proporciona los resultados comparativos del compuesto de fórmula (I) y los compuestos de referencia A y B divulgados en la Publicación de

Patente de EE.UU. N ° 2001/00095410A1, publicada el 13 de enero de 2011. Los solicitantes hacen notar que los experimentos cuyos resultados se comparan a continuación se realizaron en condiciones similares, pero no necesariamente de forma simultánea.

|                                                                         | Compuesto de<br>Fórmula (I) | Compuesto A | Compuesto B |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| CI <sub>50</sub> (nM)                                                   | 3                           | 5           | 6,5         |
| CE <sub>50</sub> (nM)                                                   | 2                           | 3,4         | 18 (9X)     |
| CE <sub>50</sub> - ajUP                                                 | 17                          | 71 (4X)     | 563 (33X)   |
| CACO (A/B, B/A)                                                         | 27/35                       | 3,1/18,5    | 0,26/4      |
| Proporción de Flujo de Salida<br>(B/A)/(A/B)                            | 1,3                         | 6,0         | 15,45       |
| fu                                                                      | 12                          | 4,8         | 3,2         |
| CI <sub>50</sub> para CYP3A4 en presencia<br>de testosterona (TST) (μM) | 11                          | 1,1 (10X)   | 4 (2,8X)    |
| CI <sub>50</sub> / CE <sub>50</sub> - ajUP para CYP3A4                  | 647                         | 15 (43X)    | 7 (92X)     |
| V <sub>ss</sub> (L/Kg) en ratas                                         | 0,55                        | 0,17 (3,2X) | 0,54        |
| CL (L/h/kg) en ratas                                                    | 0,11                        | 0,30 (2,7X) | 0,39 (3,6X) |
| %F en ratas                                                             | 75                          | 11 (6,8X)   | 50 (1,5X)   |
| t <sub>1/2</sub> en ratas (h)                                           | 5,07                        | 0,59 (8,6X) | 1,3 (3,9X)  |

- 5     () los valores entre paréntesis representan el número de veces que el compuesto de fórmula (I) muestra una mejora sobre el compuesto indicado para el parámetro indicado.

De los datos comparativos anteriores, se puede deducir lo siguiente:

El compuesto de fórmula (I) tiene una CE<sub>50</sub> que es comparable a la del Compuesto A.

- 10    El compuesto de fórmula (I) tiene una CI<sub>50</sub> funcional que es comparable a las CI<sub>50</sub> de los compuestos A y B.

El compuesto de fórmula (I) tiene una CE<sub>50</sub> ajustada en función de la unión a proteínas que es 4 veces menor que la del compuesto A y 33 veces menor que la del compuesto B.

- 15    El compuesto de fórmula (I) es un inhibidor de CYP3 A4 más débil en comparación con compuestos A y B.

El compuesto de Fórmula (I) tiene un valor de  $CI_{50}$  para CYP3A4/  $CE_{50}$ - ajUP que es 43 veces más alto que el del compuesto de fórmula A, y 92 veces mayor que el del compuesto de fórmula B.

5 El compuesto de fórmula (I) tiene un valor de CL de rata que es 2,7 veces menor que el del compuesto de fórmula A, y 3,6 veces menor que el del compuesto de fórmula B.

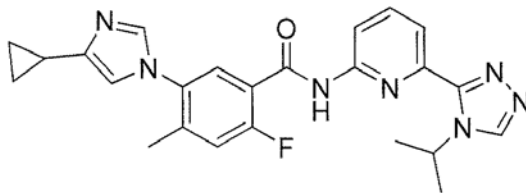
El compuesto de fórmula (I) tiene un porcentaje de biodisponibilidad en ratas que es 6,8 veces mayor que el del compuesto A y 1,5 veces mayor que el del compuesto B.

10 El compuesto de fórmula (I) tiene una vida media en ratas que es 8,6 veces más larga que la del compuesto A y 3,9 veces más larga que la del compuesto B.

Los datos anteriores sugieren claramente que el compuesto de fórmula (I) tiene propiedades inesperadas y ventajosas en comparación con los compuestos de fórmula A y B; y que el compuesto de fórmula (I) es un mejor candidato para ser sometido a mayor  
15 desarrollo en el tratamiento de la enfermedad crónica del riñón, fibrosis pulmonar y/o renal, y/o enfermedades cardiorrenales.

Lo que se reivindica es:

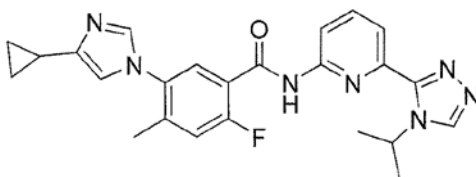
1. Un compuesto de fórmula (I)



(I)

- 5 a saber, 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-2-fluoro-4-metilbenzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

2. El compuesto de fórmula (I)



10

(I)

a saber, 5-((4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridina-2-il)-4-metilbenzamida.

3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Un método para tratar la enfermedad renal crónica que comprende la
- 20 administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de acuerdo

con la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

6. Un método para tratar la nefropatía diabética que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

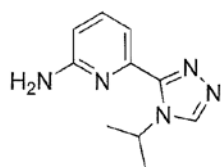
7. Un método para tratar la fibrosis renal, fibrosis hepática, o fibrosis pulmonar que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1, a un paciente en necesidad del mismo.

10 8. Un método para tratar la enfermedad renal diabética, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1, a un paciente en necesidad del mismo.

9. Uso de un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

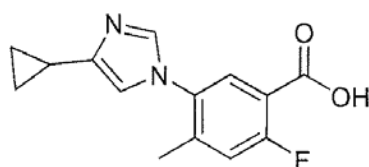
15 10. Uso de un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 en terapia.

11. Un compuesto intermedio de fórmula:



a saber, 2-amino,5-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il) piridina, o una sal o una forma protegida del mismo.

20 12. Un compuesto intermedio de fórmula:



a saber, ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico, una sal o una forma protegida del mismo.

## RESUMEN

La presente invención se relaciona con un compuesto de fórmula (I): El compuesto tiene  
5 actividad inhibidora sobre la quinasa reguladora de la señal de apoptosis (“ASK 1”), y  
es por lo tanto útil en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedad renal,  
nefropatía diabética y fibrosis renal.

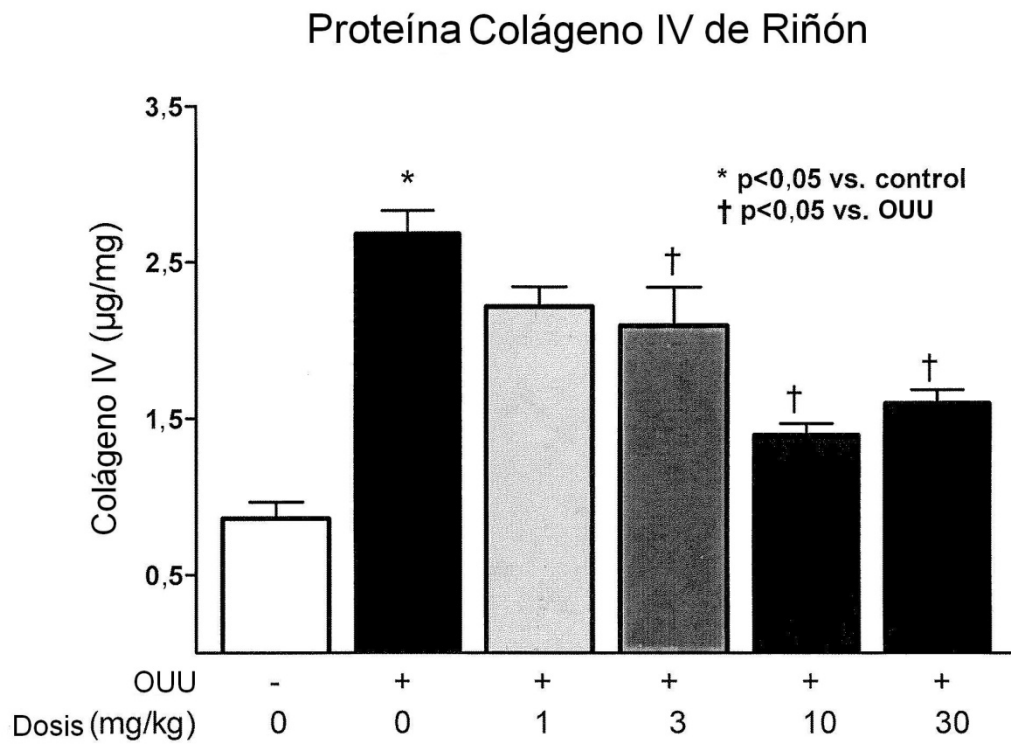
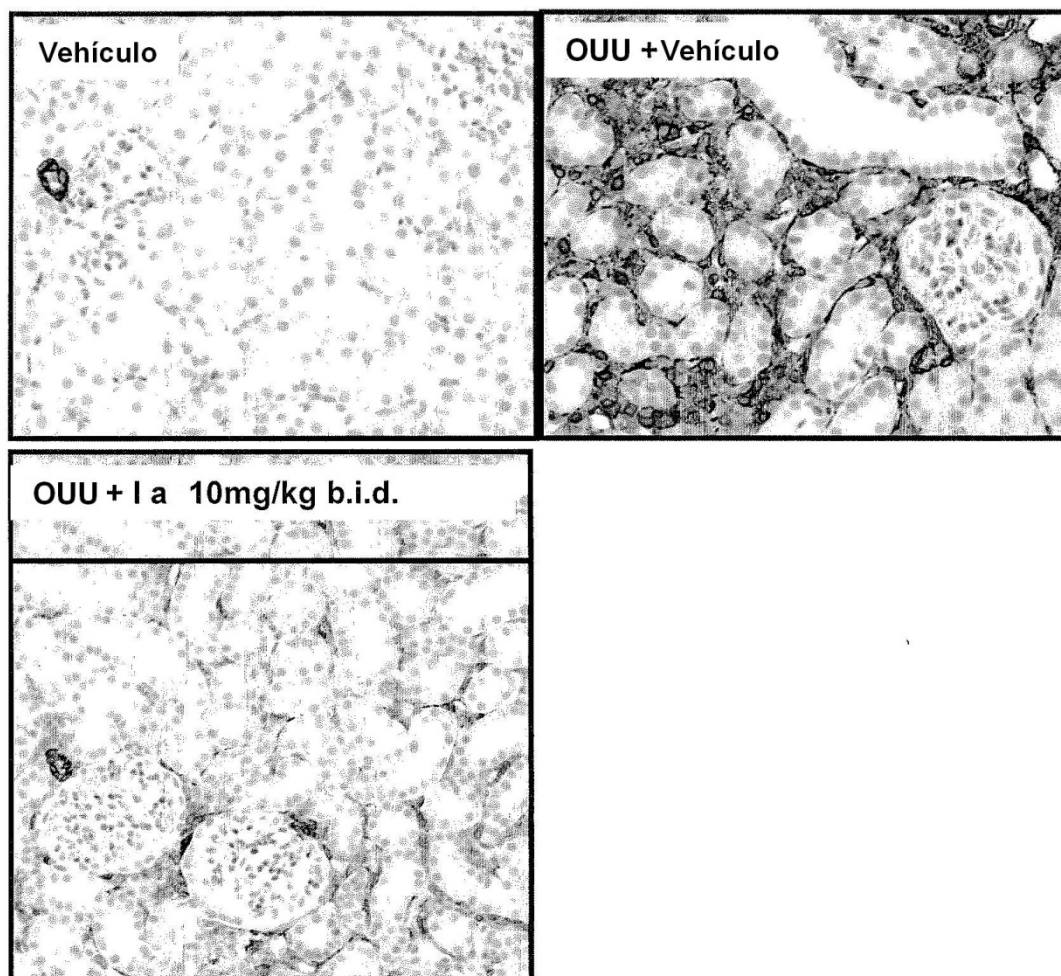
**Figura 1**

**Figura 2**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 August 2013 (01.08.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2013/112741 A1**

(51) International Patent Classification:

C07D 233/56 (2006.01) A61K 31/4436 (2006.01)  
C07D 401/04 (2006.01) A61K 31/4164 (2006.01)  
C07D 401/14 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2013/022997

(22) International Filing Date:

24 January 2013 (24.01.2013)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/591,710 27 January 2012 (27.01.2012) US

(71) Applicant: GILEAD SCIENCES, INC. [US/US]; 333  
Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(72) Inventor: NOTTE, Gregory; 21 Otay Avenue, San  
Mateo, CA 94403 (US).

(74) Agents: ECK, Steven, R. et al.; Gilead Sciences, Inc., 333  
Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

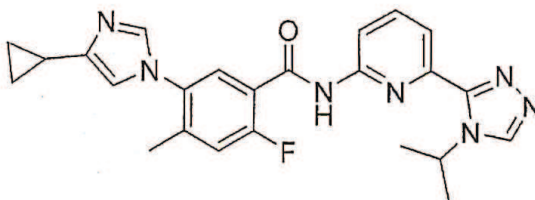
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,  
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: APOPTOSIS SIGNAL-REGULATING KINASE INHIBITOR



(I)

(57) Abstract: The present invention relates to a compound of formula (I): The compound has apoptosis signal-regulating kinase ("ASK 1") inhibitory activity, and is thus useful in the treatment of diseases such as kidney disease, diabetic nephropathy and kidney fibrosis.

WO 2013/112741 A1



COLOMBIA  
Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

| PODER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | POWER OF ATTORNEY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yo (nosotros), abajo firmante(s)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | I (we), the undersigned                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | legal representative(s) of                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| GILEAD SCIENCES, INC.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | GILEAD SCIENCES, INC.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | an organization existing under the laws of                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | and in present execution of its business activity, domiciled at 333 Lakeside Drive Foster City, CA 94404, United States of America.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| por el presente instrumento confiero (confirimos) poder especial a favor de SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ, con Cédula de Ciudadanía No. 22.468.787 de Barranquilla, y tp. 147463 y CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO, con Cédula de Ciudadanía No. 66.783.790 de Palmira Valle, y tp. 141563 con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en la referente a los siguientes asuntos:                                                     | do hereby grant POWER OF ATTORNEY to SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ, identification card No. 22.468.787 of Barranquilla, and tp. 147463 and CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO, identification card No. 66.783.790 of Palmira Valle, and tp. 141563 residing in Bogotá Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:                                                                                                  |
| 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutela y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) demandante o en contra el (ella). | 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him. |
| 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 5) To register domain names before the competent entity.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistír, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 7) Ratificar o no la agencia oficina.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 7) To ratify or not the officious agency.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

Dado y firmado en

a los días de

Granted and signed at FOSTER CITY, CALIFORNIA, USA

on this 17th day of JULY of 2013

Firma / signature

J. Elin Hartum  
Associate General Counsel, IP

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



## RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0087599

Bogotá D.C., Agosto 14 de 2014 - 13:49:23

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 20233216 | 14/08/2014 | 27.232.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr. LUNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 515.000.00     | 515.000.00   |
|       |                         |                                            |                | \$515.000.00 |

=====

SON: \*\*QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Agosto 14 de 2014 - 13:49:31

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



## RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0058714

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 09:25:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO     | CUENTA | No. PAGO   | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------|--------|------------|------------|---------------|
| RECIBO DE CA | 999999999 | 58593  | 04/06/2014 |            | 31.561.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                                        | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|--------------|
| 2     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA<br>ADICIONAL A LAS 10 INIC | 31.000.00     | 62.000.00    |
|       |                         |                                                                 |               | \$62.000.00  |

SON: \*\*SESENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Junio 4 de 2014 - 09:25:19