

**DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE
LOS MISMOS, PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INFLAMATORIOS**

CAMPO DE LA INVENCION

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

invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las Janus cinasas (JAK, por sus siglas en inglés) son tirosina cinasas citoplasmáticas que transducen la
5 señalización de citocinas de receptores de membrana a factores de transcripción STAT. Se describen cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Tras la unión de la citocina a su receptor, los miembros de la familia JAK se auto- y/o transfosforilan entre sí, seguido por la
10 fosforilación de STAT que después migran al núcleo para modular la transcripción. La transducción de señal intracelular JAK-STAT sirve a los interferones, la mayoría de las interleucinas, así como también una variedad de citocinas y factores endocrinos, como EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTF,
15 GM-CSF y PRL.(Vainchenker et al., 2008)

La combinación de modelos genéticos y la investigación de los inhibidores de JAK de molécula pequeña reveló el potencial terapéutico de varias JAK. JAK3 es validado por el ratón y la genética humana como un blanco de
20 inmunosupresión. (O'Shea et al., 2004) Los inhibidores de JAK3 se tomaron con éxito en el desarrollo clínico, inicialmente para el rechazo del trasplante de órganos, pero más tarde también en otras indicaciones inmunoinflamatorias como la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés),
25 la psoriasis y la enfermedad de Crohn

(<http://clinicaltrials.gov/>).

TYK2 es un blanco potencial para las enfermedades
inmunoinflamatorias, siendo validado por la genética humana y
estudios de ratón en los que se ha bloqueado la expresión del
5 gen.(Levy y Loomis, 2007)

JAK1 es un blanco en el área de las enfermedades
inmunoinflamatorias. Heterodimeriza JAK1 con las demás JAK
para la transducción de la señalización impulsada por
citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, la inhibición de
10 JAK1 es de interés para las enfermedades inmunoinflamatorias
con citocinas asociadas con patologías que utilizan la
señalización JAK1, como IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, o IFNgamma,
así como también para otras enfermedades impulsadas por la
transducción de señales mediadas por JAK.

15 La degeneración de los cartílagos es el sello de
diversas enfermedades, entre las cuales la artritis
reumatoide y la osteoartritis son las más destacadas.
La artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés) es una
enfermedad degenerativa crónica de las articulaciones,
20 caracterizada por la inflamación y la destrucción de las
estructuras articulares. Cuando la enfermedad no es
controlada, conduce a una discapacidad sustancial y un dolor
por la pérdida de funcionalidad de las articulaciones e
incluso la muerte prematura. El objetivo de la terapia de la
25 RA, por lo tanto, no es sólo frenar la enfermedad, sino

lograr una remisión con el fin de detener la destrucción de las articulaciones. Además de la gravedad de la evolución de la enfermedad, la alta prevalencia de la RA (~ 0.8% de los adultos se ven afectados en todo el mundo) significa un
5 impacto socioeconómico alto. (Choy y Panayi, 2001; Firestein, 2003; Lee y Weinblatt, 2001; O'Dell, 2004; Smolen y Steiner, 2003).

JAK1 y JAK2 están implicadas en la transducción de señales intracelulares para muchas citocinas y hormonas.
10 Las patologías asociadas a cualquiera de estas citocinas y hormonas se pueden mejorar por los inhibidores de JAK1 y JAK2. Por lo tanto, varias afecciones alérgicas o inflamatorias y enfermedades autoinmunes se pueden beneficiar del tratamiento con los compuestos descritos en esta
15 invención, que incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en ingles), fibrosis de tejidos, inflamación eosinofílica, eosofagitis, enfermedades
20 intestinales inflamatorias (por ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), trasplantes, rechazo inverso (enfermedad de injerto contra hospedero), psoriasis, miositis, esclerosis múltiple. (Kopf et al., 2010)

La osteoartritis (también denominada como OA, o
25 artritis de desgaste y desgarró) es la forma más común de

artritis y se caracteriza por la pérdida de cartílago articular, a menudo asociada con hipertrofia de los huesos y dolor. (Wieland et al., 2005)

La osteoartritis es difícil de tratar. En la actualidad, no hay cura disponible y el tratamiento se centra en aliviar el dolor y prevenir que la articulación afectada se deforme. Los tratamientos comunes incluyen el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID, por sus siglas en inglés). Si bien los suplementos dietéticos como la condroitina y sulfato de glucosamina se han defendido como opciones seguras y eficaces para el tratamiento de la osteoartritis, un ensayo clínico reciente reveló que ambos tratamientos no redujeron el dolor asociado con la osteoartritis. (Clegg et al., 2006)

La estimulación de los procesos anabólicos, el bloqueo de los procesos catabólicos, o una combinación de estos dos, pueden dar lugar a la estabilización del cartílago, y tal vez incluso la remisión de los daños, y por lo tanto evitar el avance de la enfermedad. Los métodos terapéuticos para la corrección de las lesiones de los cartílagos articulares que aparecen durante la enfermedad artrósica se han desarrollado, pero hasta el momento ninguno de ellos ha sido capaz de mediar en la regeneración del cartílago articular *in situ* e *in vivo*. Tomados en conjunto, no hay fármacos modificadores artrósicos disponibles.

Vandeghinste *et al.* (Vandeghinste *et al.*, 2005) descubrió JAK1 como un blanco cuya inhibición puede tener relevancia terapéutica para varias enfermedades que incluyen OA. El bloqueo del gen JAK1 en ratones demostró que JAK1
5 desempeña funciones esenciales y no redundantes durante el desarrollo: Los ratones con JAK1-/- murieron en las siguientes 24 horas después del nacimiento y desarrollo de los linfocitos fue gravemente afectado. Por otra parte, las células con JAK1-/- no eran, o menos, reactivas que las
10 citocinas que utilizan receptores de citocinas de clase II, los receptores de citocinas que utilizan la subunidad gamma-c para la señalización y la familia de receptores de citocinas que utilizan la subunidad gp130 para la señalización.(Rodig *et al.*, 1998)

15 Varios grupos han implicado la señalización de JAK-STAT en la biología de los condrocitos. Li *et al.* (Li *et al.*, 2001) mostró que la oncostatina M induce la expresión génica de MMP y TIMP3 en condrocitos primarios por la activación de JAK/STAT y las vías de señalización de MAPK.
20 Osaki *et al.* (Osaki *et al.*, 2003) mostró que la inhibición mediada por interferón-gamma de colágeno II en los condrocitos implica la señalización JAK-STAT. IL1-beta induce el catabolismo del cartílago por medio de la reducción de la expresión de componentes de la matriz, y por medio de la
25 inducción de la expresión de las colagenasas y óxido nítrico

sintasa inducible (NOS2), que media la producción de óxido nítrico (NO). Otero *et al.* (Otero *et al.*, 2005) mostró que la leptina y la IL-1-beta induce sinérgicamente la producción de NO o la expresión de NOS2 ARNm en condrocitos, y que fue
5 bloqueado por un inhibidor de JAK. Legendre *et al.* (Legendre *et al.*, 2003) mostró que el receptor de IL6/IL6 indujo la regulación a la baja de genes de la matriz de colágeno del cartílago específica II, el núcleo de agregano y de la proteína de enlace en condrocitos articulares bovinos, y que
10 esto fue mediado por la señalización de JAK/STAT. Por lo tanto, estas observaciones sugieren un papel para la actividad de la cinasa JAK en la homeostasis del cartílago y oportunidades terapéuticas para los inhibidores de la cinasa JAK.

15 Los miembros de la familia JAK se han implicado en afecciones adicionales, que incluyen trastornos mieloproliferativos (O'Sullivan *et al.*, 2007), donde se han identificado mutaciones en JAK2. Esto indica que los inhibidores de JAK, en particular, JAK2 también pueden ser de
20 uso en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Además, la familia JAK, en particular, JAK1, JAK2 y JAK3, se ha relacionado con cánceres, leucemias, en particular *por ej.*, leucemia mieloide aguda (O'Sullivan *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008), y la leucemia linfoblástica aguda (Mullighan *et al.*, 2009) o tumores sólidos *por ej.*, leiomiomas uterino
25

(Constantinescu et al., 2008), cáncer de próstata (Tam et al., 2007). Estos resultados indican que los inhibidores de JAK, en particular de JAK1 y/o JAK2, también pueden tener utilidad en el tratamiento de cánceres (tumores sólidos y leucemias *por ej.*, leiomioma uterino, cáncer de próstata).

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

Las terapias actuales no son satisfactorias y por lo tanto sigue existiendo la necesidad de identificar compuestos adicionales que puedan ser de uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones. Por consiguiente, la presente invención proporciona compuestos, métodos para su fabricación y

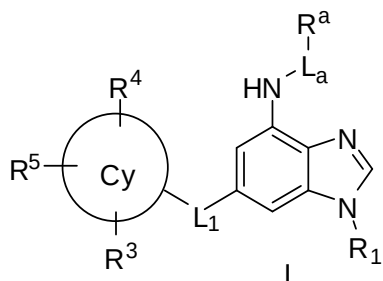
composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención junto con un portador farmacéutico adecuado. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento
5 para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades
10 asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los compuestos de la invención son capaces de actuar
15 como inhibidores de JAK y que son útiles para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones
20 congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones. En un aspecto específico, los compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2. La presente invención también proporciona métodos para la producción de estos compuestos,
25 composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y

métodos para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones por medio de la administración de un compuesto de la invención.

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



donde

R^1 es H o Me;

L_1 es $-NR^2-$; $-O-$, o $-CH_2-$;

Cy es fenilo, o un heteroarilo monocíclico de 5 a 9 miembros o bicíclico condensado que comprende de 1 a 4 heteroátomos seleccionados en forma independiente entre N, O, y S;

R^2 es H, o alquilo C_{1-4} ;

R^3 es H, halo, alquilo C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o más halo, o alcoxi C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o más halo;

R^4 es H, o halo;

5 R^5 es -CN, halo, o es $-L_2-R^6$

$-L_2$ está ausente, o es $-C(=O)-$, $-C(=O)NR^7-$, $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^7-$, o $-NR^7SO_2-$;

R^6 es H, o alquilo C_{1-6} sustituido en forma opcional con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente;

10 R^7 es H, o alquilo C_{1-4} ;

R^8 es OH, CN, halo, o alcoxi C_{1-4} ,

L_a está ausente, o es $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$, o $-C(=O)NH-$;

R^a es:

15 H,

alquilo C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o más R^b seleccionados en forma independiente,

cicloalquilo monocíclico C_{3-7} sustituido en forma opcional con uno o más R^c seleccionados en forma
20 independiente, o

heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N, y S, o

heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que
25 comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma

independiente de O, N y S;

R^b es

halo,

CN,

5 OH,

alcoxi C_{1-4} ,

cicloalquilo C_{3-7} ,

heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros

que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma

10 independiente de O, N, y S (el heterocicloalquilo está
sustituido en forma opcional con uno o más halo u oxo
seleccionados en forma independiente),

alquilo $-SO_2-C_{1-4}$, o

$-C(=O)NR^{b1}R^{b2}$

15 R^c es

halo,

CN,

OH,

alquilo C_{1-4} ,

20 $-C(=O)OH$, o

$-C(=O)NR^{c1}R^{c2}$; y

cada R^{b1} , R^{b2} , R^{c1} y R^{c2} se selecciona en forma
independiente entre H, y alquilo C_{1-4} .

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

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que los compuestos de la invención pueden exhibir una importante actividad *in vitro* en comparación con los análogos estrechamente relacionados.

5 Además, en un aspecto particular, los compuestos de la invención pueden mostrar una estabilidad mejorada *in vitro*, cuando se compara a los análogos estrechamente relacionados. Esta mejora puede dar lugar *in vivo* a una dosis menor del fármaco que se requiera, y por lo tanto puede dar
10 lugar a una disminución de la toxicidad y/o interacción fármaco-fármaco.

 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, y un portador, excipiente o
15 diluyente farmacéutico. Además, los compuestos de la invención, útiles en las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento descritos en esta descripción, son aceptables para uso farmacéutico de acuerdo con lo preparado y utilizado. En este aspecto de la invención, la composición
20 farmacéutica puede comprender en forma adicional componentes activos adicionales adecuados para su uso en combinación con los compuestos de la invención.

 En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de la invención o una composición farmacéutica
25 que comprende un compuesto de la invención para su uso como

un medicamento. En una modalidad específica, la composición farmacéutica comprende además un componente activo adicional.

En un aspecto adicional de la invención, esta invención proporciona un método de tratamiento de un mamífero susceptible de padecer o que padece una afección entre las enumeradas en esta descripción, y en particular, esta afección puede estar asociada con la actividad aberrante de JAK, *por ej.*, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones, método el cual comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o compuesto de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción. En una modalidad específica, la afección está asociada con una actividad aberrante de JAK1 y/o TYK2.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección seleccionada entre las enumeradas en esta descripción, en particular estas afecciones pueden estar asociadas con la actividad aberrante de JAK, *por ej.*, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades

proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de
5 interferones.

En otro aspecto del método de tratamiento, esta invención proporciona un método para tratar a un mamífero susceptible o que padece una afección que está causalmente relacionada con la actividad anormal de JAK de acuerdo con lo
10 mostrado en esta descripción, y comprende administrar una cantidad eficaz para el tratamiento o para la prevención de la afección de la composición farmacéutica o un compuesto de la invención descrita en esta descripción. En un aspecto específico, la afección está causalmente relacionada con una
15 actividad anormal de JAK1 y/o TYK2.

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

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

En aspectos adicionales, la presente invención
25 proporciona métodos para sintetizar los compuestos de la

invención, con protocolos de síntesis representativos y las vías descritas más adelante en esta descripción.

En consecuencia, un objetivo principal de esta invención es proporcionar compuestos novedosos, que puedan
5 modificar la actividad de JAK y de ese modo prevenir o tratar cualquier afección que pueda estar causalmente relacionada con estas actividades. En un aspecto específico, los compuestos de la invención modulan la actividad de JAK1 y/o TYK2.

10 Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar compuestos que pueden tratar o aliviar afecciones o síntomas de la misma, por ej., enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de
15 trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones, que pueden estar relacionadas causalmente con la actividad de JAK, en
20 particular, JAK1 y/o TYK2.

Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica que se puede utilizar en el tratamiento o la profilaxis de una variedad de afecciones, que incluyen enfermedades asociadas con la
25 actividad de JAK, por ej., enfermedades alérgicas,

enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o
5 enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones. En una modalidad específica, la enfermedad se asocia con la actividad de JAK1 y/o TYK2.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

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

Al describir la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen a los compuestos y métodos de uso de los compuestos y
20 composiciones, los siguientes términos, si están presentes, tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. También se debe entender que cuando se describe en esta descripción cualquiera de los restos definidos a continuación puede estar sustituido con una variedad de
25 sustituyentes, y que las respectivas definiciones están

destinadas a incluir los restos sustituidos dentro de su alcance de acuerdo con lo establecido a continuación. A menos que se indique lo contrario, el término "sustituido" se define de acuerdo con lo indicado a continuación. Se debe
5 entender además que los términos "grupos" y "radicales" se pueden considerar intercambiables cuando se utilizan en esta descripción.

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

El término "alquilo" significa un hidrocarburo alifático lineal o ramificado con el número de átomos de
15 carbono especificados. Los grupos alquilo particulares tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Más particular es el alquilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Un grupo particular adicional tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos de cadena lineal representativos incluyen metilo,
20 etilo, n-propilo y n-butilo. El término "ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferiores como metilo, etilo, propilo o butilo se encuentra junto a una cadena de alquilo lineal, los grupos de cadena ramificada representativos incluyen isopropilo, iso-butilo, t-butilo e
25 isoamilo.

El término "alcoxi" se refiere al grupo $-OR^{26}$, en el que R^{26} es alquilo con el número de átomos de carbono especificados. Los grupos alcoxi particulares son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, terbutoxi, 5 sec-butoxi, n-pentoxi, n-hexoxi y 1,2-dimetilbutoxi. Los grupos alcoxi particulares son alcoxi inferior, es decir, con entre 1 y 6 átomos de carbono. Otros grupos alcoxi particulares tienen entre 1 y 4 átomos de carbono.

El término "alquenilo" se refiere a grupos 10 hidrocarbonados monovalentes olefínicamente (insaturados) con el número de átomos de carbono especificados. Un alquenilo particular tiene de 2 a 8 átomos de carbono, y más en particular, de 2 a 6 átomos de carbono, que pueden ser de cadena lineal o ramificada y que tienen por lo menos 1 y en 15 particular de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. Los grupos alquenilo particulares incluyen etenilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), n-propenilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), isopropenilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$) y similares.

El término "amino" se refiere al $-\text{NH}_2$ radical.

20 El término "arilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático de origen. En particular, "arilo" se refiere a una estructura de anillo 25 aromático, monocíclico o policíclico condensado, con el

número de átomos en el anillo especificados. En forma específica, el término incluye grupos que incluyen de 6 a 10 miembros en el anillo. Cuando el grupo arilo es un sistema de anillo monocíclico, preferentemente contiene 6 átomos de carbono. Los grupos particulares arilo incluyen fenilo y naftilo.

El término "cicloalquilo" se refiere a una estructura de anillo hidrocarbilo no aromático, monocíclico, policíclico fusionado, con puente policíclico, o espirocíclico, con el número de átomos en el anillo especificados. Un cicloalquilo puede tener de 3 a 12 átomos de carbono, en particular de 3 a 10, y más en particular de 3 a 7 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo individuales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y cicloheptilo.

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

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

El término "hetero" cuando se utiliza para describir un compuesto o un grupo presente en un compuesto significa que uno o más átomos de carbono en el compuesto o grupo han sido reemplazados por un heteroátomo de nitrógeno, oxígeno o azufre. Hetero se puede aplicar a cualquiera de los

grupos hidrocarbilo descritos con anterioridad, como alquilo, *por ej.*, heteroalquilo, cicloalquilo, *por ej.*, heterocicloalquilo, arilo, *por ej.*, heteroarilo, y similares que tiene de 1 a 4, y en particular de 1 a 3 heteroátomos, en
5 forma más típica 1 ó 2 heteroátomos, por ejemplo un único heteroátomo.

El término "heteroarilo" significa una estructura de anillo aromático, monocíclico o policíclico fusionado, que incluye uno o más heteroátomos seleccionados en forma
10 independiente de O, N y S, y el número de átomos en el anillo especificados. En particular, la estructura de anillo aromático puede tener de 5 a 9 miembros de anillo. El grupo heteroarilo puede ser, por ejemplo, uno de cinco miembros o de seis miembros de anillo monocíclico o bicíclico condensado
15 de una estructura formada a partir de condensados de cinco y seis eslabones o dos anillos de seis miembros fusionados o, a modo de ejemplo adicional, dos anillos condensados de cinco eslabones. Cada anillo puede contener hasta cuatro heteroátomos normalmente seleccionados de nitrógeno, azufre y
20 oxígeno. En forma típica, el anillo de heteroarilo contiene hasta 4 heteroátomos, en forma más típica de hasta 3 heteroátomos, más normalmente de hasta 2, por ejemplo un único heteroátomo. En una modalidad, el anillo de heteroarilo contiene por lo menos un átomo de nitrógeno del anillo.
25 Los átomos de nitrógeno en los anillos de heteroarilo pueden

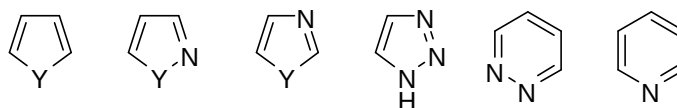
ser básicos, como en el caso de un imidazol o piridina, o esencialmente no básicos como en el caso de un nitrógeno de indol o pirrol. En general, el número de átomos de nitrógeno básicos presentes en el grupo heteroarilo, que incluyen
5 cualquier sustituyente de grupo amino del anillo, será inferior a cinco.

Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de cinco miembros incluyen, pero no se limitan a grupos pirrolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, furazanilo,
10 oxazolilo, oxadiazolilo, oxatriazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, triazolilo y tetrazolilo.

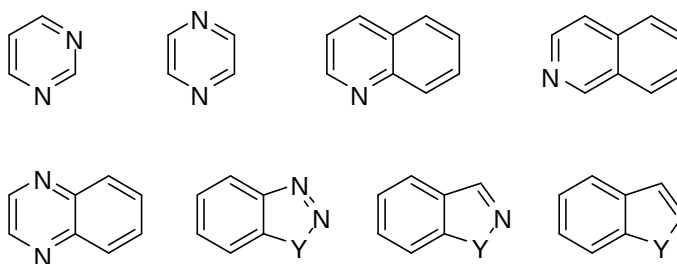
Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico de seis miembros incluyen, pero no se limitan a piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo y triazinilo.
15 Los ejemplos particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen un anillo de cinco miembros fusionado a otro anillo de cinco miembros incluyen, pero no se limitan a imidazotiazolilo e imidazoimidazolilo. Los ejemplos
20 particulares de grupos heteroarilo bicíclicos que contienen un anillo de seis miembros fusionado a un anillo de cinco miembros incluyen, pero no se limitan a benzofuranilo, benzotiofenilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, isobenzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotiazolilo,
25 bencisotiazolilo, isobenzofuranilo, indolilo, isoindolilo,

indolizinilo, purinilo (por ej., grupos adenina, guanina),
indazolilo, pirazolopirimidinilo, triazolopirimidinilo, y
pirazolopiridinilo. Los ejemplos particulares de grupos
heteroarilo bicíclicos que contienen dos anillos de seis
5 miembros fusionados incluyen, pero no se limitan a grupos
quinolinilo, isoquinolinilo, piridopiridinilo, quinoxalinilo,
quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, y
pteridinilo. Los grupos heteroarilo particulares son aquellos
derivados de tiofenilo, pirrolilo, benzotiofenilo,
10 benzofuranilo, indolilo, piridinilo, quinolinilo,
imidazolilo, oxazolilo y pirazinilo. Los ejemplos de
heteroarilos representativos incluyen los siguientes:

15



20



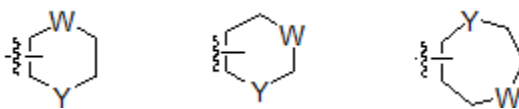
donde cada Y se selecciona de $>C(=O)$, NH, O y S.

El término "heterocicloalquilo" significa una
estructura no aromática de anillo saturado por completo,
monocíclico, policíclico condensado, espiro, o policíclico
puenteado, que incluye uno o más heteroátomos seleccionados
25

en forma independiente de O, N y S, y el número de átomos en el anillo especificados. La estructura de anillo heterocicloalquilo puede tener de 4 a 12 miembros en el anillo, en particular, de 4 a 10 miembros de anillo y más en particular de 4 a 7 miembros del anillo. Cada anillo puede 5 contener hasta cuatro heteroátomos normalmente seleccionados de nitrógeno, azufre y oxígeno. En forma típica, el anillo heterocicloalquilo contendrá hasta 4 heteroátomos, en forma más típica de hasta 3 heteroátomos, más por lo general hasta 10 2, por ejemplo un único heteroátomo. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero no están limitados a azetidinilo, oxetanilo, tietanilo, pirrolidinilo (por ej., 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo y 3-pirrolidinilo), morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrofuranilo, 15 tetrahidrotiofenilo, imidazolinilo, oxazolinilo, tiazolinilo, piperidinilo (por ej., 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo y 4-piperidinilo), piranilo, dioxanilo, tetrahidropiranilo (por ej., 4-tetrahidropiranilo), 2-pirazolinilo, pirazolidinilo, o piperazinilo.

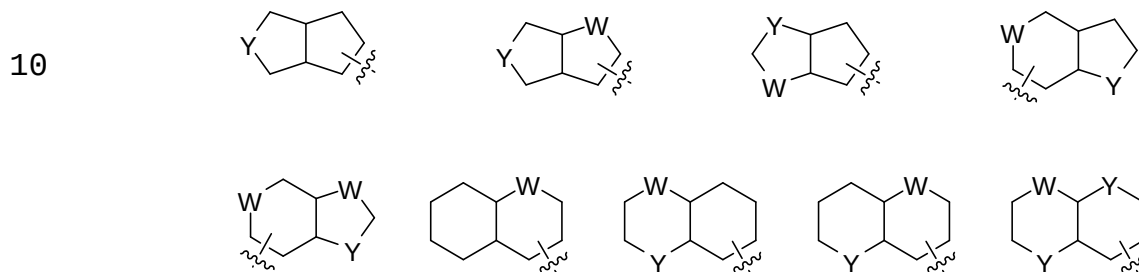
20 Los ejemplos particulares de grupos heterocicloalquilo monocíclicos se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:





en donde cada W e Y se seleccionan en forma
5 independiente de CH_2 , NH, O y S.

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



15 en donde cada W e Y se seleccionan en forma
independiente de CH_2 , NH, O y S.

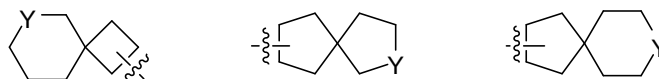
Los ejemplos particulares de grupos
heterocicloalquilo bicíclicos puenteados se muestran en los
siguientes ejemplos ilustrativos:



en donde cada W e Y se selecciona en forma
independiente de CH_2 , NH, O y S, y Z es N o CH.

25 Los ejemplos particulares de grupos

heterocicloalquilo espirocíclicos se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:



5 donde cada Y se selecciona de NH, O y S.

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

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

El término "sustituido" se refiere a un grupo en el que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno reemplazados en forma independiente con el mismo o diferente sustituyente.

El término "sulfo" o "ácido sulfónico" se refiere a un radical como p. ej. -SO₃H.

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

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "sustituido con uno o más" se refiere a uno a cuatro sustituyentes. En una modalidad se refiere a uno a tres sustituyentes. En otras modalidades se refiere a uno o dos sustituyentes. En una modalidad adicional se refiere a un sustituyente.

20 El término "tioalcoxi" se refiere al grupo -SR²⁶ donde R²⁶ tiene el número de átomos de carbono especificado y en particular alquilo C₁-C₈. Los grupos tioalcoxi particulares son tiometoxi, tioetoxi, n-tiopropoxi, isotiopropoxi, n-tiobutoxi, terttiobutoxi, sec-tiobutoxi, n-tiopentoxi, 25 n-tiohexoxi, y 1,2-dimetiltiobutoxi. Los grupos tioalcoxi

particulares son tioalcoxi inferiores, es decir, con entre 1 y 6 átomos de carbono. Otros grupos alcoxi particulares tienen entre 1 y 4 átomos de carbono.

5 Aquéllos con experiencia en la técnica de la síntesis orgánica reconocerán que el número máximo de heteroátomos en un anillo heterocíclico estable, químicamente factible, ya sea aromático o no aromático, está determinado por el tamaño del anillo, el grado de insaturación y la valencia de los heteroátomos. En general, un anillo
10 heterocíclico puede tener de uno a cuatro heteroátomos, con la condición de que el anillo heteroaromático sea químicamente factible y estable.

La expresión "aceptable para uso farmacéutico" significa aprobado o susceptible de aprobación por una
15 agencia reguladora del gobierno federal o estatal o la agencia correspondiente en países distintos de los Estados Unidos, o que aparece en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea reconocida por lo general para su uso en animales, y más en particular, en los seres humanos.

20 La expresión "sal aceptable para uso farmacéutico" se refiere a una sal de un compuesto de la invención que es aceptable para uso farmacéutico y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. En particular, las sales no son tóxicas y pueden ser sales de adición de
25 ácidos inorgánicos u orgánicos y sales de adición de base.

En forma específica, las sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos como p. ej. ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con
5 ácidos orgánicos por ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico,
10 ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico,
15 ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terbutilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico,
20 ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto de origen es reemplazado por un ión metálico, *por ej.*, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ión de aluminio; o se
25 coordina con una base orgánica por ej., etanolamina,

dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. Las sales incluyen en forma adicional, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando el compuesto
5 contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, por ej., clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. El término "catión aceptable para uso farmacéutico" se refiere a un contraión catiónico de un grupo funcional ácido
10 aceptable. Estos cationes son ejemplificados por sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, cationes de tetraalquilamonio, y similares.

La expresión "vehículo aceptable para uso farmacéutico" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra un compuesto
15 de la invención.

El término "fármacos precursores" se refiere a compuestos, que incluyen derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos escindibles y se convierten por
20 solvólisis o en condiciones fisiológicas los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, derivados de éster de colina y similares, ésteres de N-alquilmorfolina y similares.

25 El término "solvato" se refiere a las formas del

compuesto que se asocian con un disolvente, por lo general por medio de una reacción de solvólisis. Esta asociación física incluye enlaces de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, EtOH, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención se pueden preparar *por ej.*, en forma cristalina y puede ser solvatada o hidratada. Los solvatos adecuados incluyen solvatos aceptables para uso farmacéutico, por ej., hidratos, y además incluyen tanto solvatos estequiométricos y solvatos no estequiométricos. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. El término "solvato" abarca tanto la fase de solución y solvatos aislables. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

El término "sujeto" incluye a los humanos. Los términos "humano", "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente en esta descripción.

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

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

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

El término "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una modalidad, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, la detención de la enfermedad o la reducción de la manifestación, la extensión o gravedad de por lo menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra modalidad "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar por lo menos un parámetro

físico, que puede no ser perceptible por el sujeto. En aún otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (por ej., estabilización de un síntoma discernible),
5 fisiológicamente, (por ej., la estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una modalidad adicional, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retardar la progresión de la enfermedad.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el
10 término "enfermedades alérgicas" se refiere al grupo de afecciones caracterizadas por un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmunitario que incluyen, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma, rinitis), sinusitis, eccema y urticaria, así como también
15 alergias a los alimentos o alergias al veneno de los insectos.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "asma", de acuerdo con lo utilizado en esta descripción, se refiere a cualquier trastorno de los pulmones
20 que se caracterizan por variaciones en el flujo de gas pulmonar asociada a la constricción de las vías respiratorias de cualquier causa (intrínseca, extrínseca, o ambos; alérgica o no alérgica). El término asma se puede utilizar con uno o más adjetivos para indicar la causa.

25 De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el

término "enfermedades inflamatorias" se refiere al grupo de afecciones que incluyen, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma, rinitis), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés), enfermedades inflamatorias del intestino (por ej., la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), estados de enfermedad accionados por endotoxinas (por ej., complicaciones después de la cirugía de bypass o estados de endotoxinas crónicas que contribuyen a *por ej.*, insuficiencia cardíaca crónica), y las enfermedades relacionadas que involucran los cartílagos, por ej., la de las articulaciones. En particular, el término se refiere a la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés) y enfermedades inflamatorias del intestino. Más en particular, el término se refiere a la artritis reumatoide, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés) y enfermedades inflamatorias del intestino.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "enfermedades autoinmunes" se refiere al grupo de enfermedades que incluyen la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, que incluyen afecciones como COPD, asma

(por ej., asma intrínseca, asma extrínseca, asma por polvo, asma infantil) en particular asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hiperreactividad de las vías respiratorias), bronquitis, que incluyen asma bronquial, lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés), lupus eritematoso cutáneo, nefritis por lupus, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad del ojo seco, la diabetes mellitus de tipo I y las complicaciones asociadas con la mismo, eccema atópico (dermatitis atópica), tiroiditis /tiroiditis de Hashimoto, torioditis autoinmune), dermatitis de contacto y además dermatitis eccematosa enfermedad inflamatoria del intestino, (por ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), la aterosclerosis y la esclerosis lateral amiotrófica. En particular, el término se refiere a COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y la enfermedad inflamatoria intestinal. De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "enfermedades proliferativas" se refiere a afecciones como el cáncer (por ej., leiomiomasarcoma uterino o cáncer de próstata), trastornos mieloproliferativos (por ej., policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis), leucemia (por ej., leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y crónica), mieloma múltiple, psoriasis, reestenosis, esclerodermia o fibrosis. En particular, el término se refiere a cáncer,

leucemia, mieloma múltiple y psoriasis.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "cáncer" se refiere a un crecimiento maligno o benigno de células en la piel o en los órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, de mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o el intestino. Un cáncer tiende a infiltrarse en el tejido adyacente y propagarse (metastatizarse) a órganos distantes, por ejemplo, al hueso, hígado, pulmón o cerebro. De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término cáncer incluye ambos tipos de células tumorales metastásicas (que incluyen, pero no se limitan a, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y mastocitoma) y tipos de carcinoma de tejidos (que incluyen, pero no se limitan a, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer primario de hígado, cáncer de ovario, cáncer de próstata y leiomiosarcoma uterino). En particular, el término "cáncer" se refiere a la leucemia aguda linfoblástica, leucemia mieloide aguda, carcinoma de la corteza suprarrenal, cáncer anal, cáncer del apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso (osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno), glioma del tronco cerebral,

tumores cerebrales, tumores cerebrales y de la médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo de células T, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, la familia de tumores del sarcoma de Ewing, cáncer ocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), tumor de células del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales, glioma, tricoleucemia, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer de la hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, tricoleucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma, macroglobulinemia de Waldenstrom, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma,

mesotelioma, cáncer de boca, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide, mieloma múltiple, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno óseo, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales del ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, papilomatosis, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la hipófisis, neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (riñón), retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de la glándula salival, sarcoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer microcítico de pulmón, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumor de Wilms. En otra modalidad

particular, el término "cáncer" se refiere al cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), cáncer de mama, o cáncer de colon.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el
5 término "leucemia" se refiere a las enfermedades neoplásicas de la sangre y los órganos hematopoyéticos. Estas enfermedades pueden provocar una disfunción en la médula ósea y el sistema inmunológico, lo que hace al anfitrión altamente susceptible a infecciones y hemorragias. En particular, el
10 término "leucemia" se refiere a la leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés), y leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés) y leucemia linfoblástica crónica (CLL, por sus siglas en inglés). En otra modalidad particular, el término "leucemia" se
15 refiere a leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), o linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés).

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el
20 término "rechazo de trasplantes" se refiere al rechazo agudo o crónico de las células, tejido u órgano sólido alo- o xenoinjertos de, por ej., islotes pancreáticos, las células madre, la médula ósea, la piel, los músculos, el tejido de la córnea, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón
25 combinado, riñón, hígado, intestino, páncreas, la tráquea o

el esófago, o enfermedades del injerto contra el huésped.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción el término "enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos" incluye afecciones por ej., osteoartritis, 5 artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, artritis gotosa, artritis septicémica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze o condritis costal, fibromialgia, osteocondritis, artritis neurogénica o neuropática, artropatía, formas 10 endémicas de la artritis como por ej., osteoartritis endémica deformante, enfermedad de Meleni y enfermedad de Handigodu; degeneración resultante de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y espondilitis anquilosante.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el 15 término "malformación congénita de los cartílagos" incluye afecciones como por ej., condrolisis hereditaria, condrodisplasias y pseudocondrodisplasias, en particular, pero sin limitación, microtia, anotia, condrodisplasia metafisaria, y trastornos relacionados.

20 De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6" incluye afecciones como la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple, psoriasis, sarcoma de Kaposi y/o glomerulonefritis mesangial proliferativa.

25 De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el

término "enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones" incluye afecciones como lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis por lupus, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis reumatoide.

5 La expresión "los compuestos de la invención", y expresiones equivalentes, pretende abarcar los compuestos de las fórmulas de acuerdo con lo mostrado en esta descripción, la expresión incluye las sales aceptables para uso farmacéutico, y los solvatos, *por ej.*, hidratos y los
10 solvatos de las sales aceptables para uso farmacéutico cuando el contexto lo permita. Del mismo modo, la referencia a intermedios, estén o no ellos mismos reivindicados, pretende abarcar sus sales, y solvatos, cuando el contexto así lo permita.

15 Cuando se mencionan intervalos en esta descripción, por ejemplo, pero sin limitación, alquilo C₁₋₈, la cita de un intervalo se debe considerar como una representación de cada miembro del intervalo.

 Otros derivados de los compuestos de esta invención
20 tienen actividad tanto en sus formas ácidas y ácidos derivados, sino en la forma sensible a los ácidos que a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular, o liberación retardada en el organismo mamífero (Bundgaard, 1985). Los fármacos precursores incluyen
25 derivados de ácido muy conocidos para aquéllos con

experiencia en la técnica, como, por ejemplo, ésteres preparados por medio de la reacción del ácido de origen con un alcohol adecuado, o amidas preparadas por medio de la reacción del compuesto ácido de origen con una amina
5 sustituida o no sustituida, o ácido anhídridos, o anhídridos mixtos. Los ésteres alifáticos o aromáticos simples, amidas y anhídridos derivados de grupos ácidos colgante en los compuestos de esta invención son fármacos precursores útiles en particular. En algunos casos es deseable preparar fármacos
10 precursores de tipo éster doble como por ej., ésteres de alquil(aciloxi) o ((alcoxycarbonil)oxi)alquil ésteres. Los fármacos precursores particulares son el alquilo C₁₋₈, alquenilo C₂₋₈, arilo C₆₋₁₀ sustituido en forma opcional, y (aril C₆₋₁₀)-(alquilo C₁₋₄) ésteres de los compuestos de la
15 invención.

De acuerdo con lo utilizado en esta descripción, el término "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen estos compuestos. Por ejemplo,
20 una "variante isotópica" de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos, como por ejemplo, deuterio (²H o D), carbono-13 (¹³C), nitrógeno (¹⁵N), o similares. Se entenderá que, en un compuesto en el que se lleva a cabo la sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando están presentes,
25 pueden variar, de modo que por ejemplo, cualquier hidrógeno

puede ser $^2\text{H}/\text{D}$, cualquier carbono puede ser ^{13}C , o cualquier nitrógeno puede ser ^{15}N , y que la presencia y la colocación de estos átomos se pueden determinar dentro de la experiencia de la técnica. Del mismo modo, la invención puede incluir la
5 preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, en el caso por ejemplo, cuando los compuestos resultantes se pueden utilizar para estudios de fármacos y/o de distribución en tejidos de sustrato. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son útiles en
10 particular para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios rápidos de detección. Además, se pueden preparar compuestos que están sustituidos con isótopos emisores de positrones, como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , y sería útil en estudios de tomografía por emisión de positrones (PET, por
15 sus siglas en inglés) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.

Todas las variantes isotópicas del compuestos proporcionados en esta descripción, radiactivas o no, están destinadas a estar abarcadas dentro del alcance de la
20 invención.

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

sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros".

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

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

y nitro- del fenilnitrometano, que se forman igualmente por tratamiento con ácido o base.

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

Los compuestos de la invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; por lo tanto, estos compuestos pueden ser producidos como (R)- o (S)- estereoisómeros o como mezclas de los mismos.

A menos que se indique lo contrario, la descripción o denominación de un compuesto particular en la especificación y reivindicaciones pretende incluir ambos enantiómeros individuales y mezclas, racémicas o no, de los mismos. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros son muy conocidos en la técnica.

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

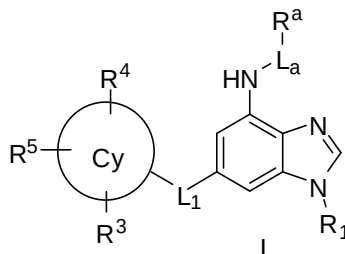
20 LA INVENCION

La presente invención se basa en la identificación de que los compuestos de la invención son inhibidores de JAK y que son útiles para el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de

trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones. En una modalidad específica los
5 compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2.

La presente invención también proporciona métodos para la producción de los compuestos de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención y métodos para el tratamiento de enfermedades
10 alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de
15 interferones por medio de la administración de un compuesto de la invención. En una modalidad específica los compuestos de la invención son inhibidores de JAK1 y/o TYK2.

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



donde

R^1 es H o Me;

L_1 es $-NR^2-$; $-O-$, o $-CH_2-$;

Cy es fenilo, o un heteroarilo monocíclico de 5 a
5 9 miembros o bicíclico condensado que comprende de 1 a
4 heteroátomos seleccionados en forma independiente entre N,
O, y S;

R^2 es H, o alquilo C_{1-4} ;

R^3 es H, halo, alquilo C_{1-4} sustituido en forma
10 opcional con uno o más seleccionados en forma independiente
halo, o alcoxi C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o más
halo seleccionado en forma independiente;

R^4 es H, o halo;

R^5 es $-CN$, halo, o es $-L_2-R^6$;

15 $-L_2$ está ausente, o es $-C(=O)-$, $-C(=O)NR^7-$,
 $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^7-$, o $-NR^7SO_2-$;

R^6 es H, o alquilo C_{1-6} sustituido en forma opcional
con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente;

R^7 es H, o alquilo C_{1-4} ;

20 R^8 es OH, CN, halo, o alcoxi C_{1-4} ;

L_a está ausente, o es $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$,
o $-C(=O)NH-$;

R^a es:

H,

25 alquilo C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o

más R^b seleccionados en forma independiente,

cicloalquilo C₃₋₇ monocíclico sustituido en forma
opcional con uno o más R^c seleccionados en forma
independiente,

5 heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros
que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma
independiente de O, N, y S, o

heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que
comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma
10 independiente de O, N y S;

R^b es

halo,

CN,

OH,

15 alcoxi C₁₋₄,

cicloalquilo C₃₋₇,

heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros
que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma
independiente de O, N, y S (heterocicloalquilo el cual está
20 sustituido en forma opcional con uno o más halo u oxo
seleccionados en forma independiente),

-SO₂-alquilo C₁₋₄, o

-C(=O)NR^{b1}R^{b2};

R^c es

25 halo,

CN,

OH,

alquilo C₁₋₄,

-C(=O)OH, o

5 -C(=O)NR^{c1}R^{c2}; y

cada R^{b1}, R^{b2}, R^{c1} y R^{c2} se selecciona en forma independiente entre H, y alquilo C₁₋₄.

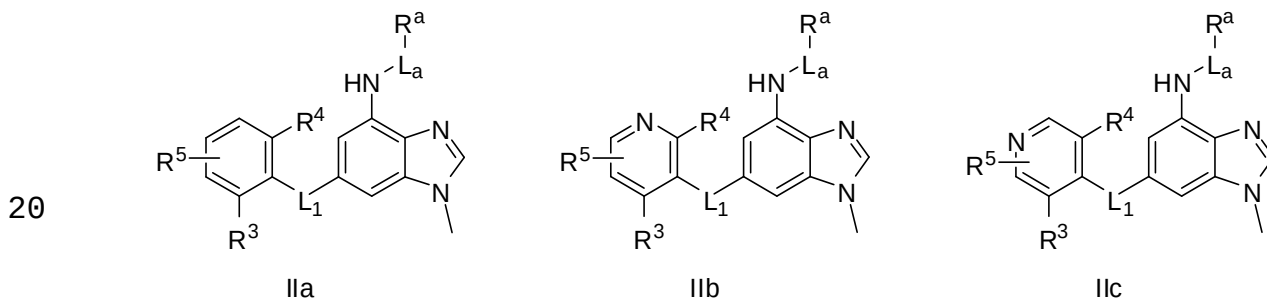
En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula I, en la que R¹ es Me.

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

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

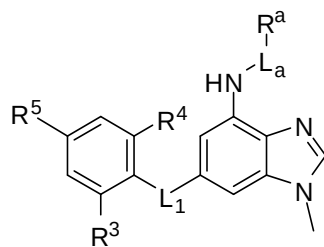
En otra modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula I, en la que Cy es una heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos seleccionados en forma independiente entre N, O y S. Sin embargo, en otra modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula I, en donde Cy es un heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados en forma independiente de N, O y S. En una modalidad particular, Cy es pirazolilo, pirrolilo, imidazolilo, furanilo, tiofenilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, tiadiazolilo, u oxadiazolilo. En otra modalidad particular, Cy es piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo o piridazolilo. En una modalidad más particular, Cy es piridilo.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula IIa, IIb, o IIc:

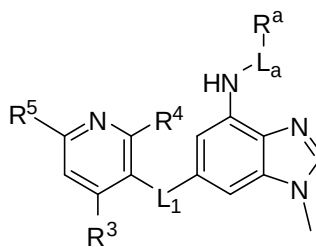


en la que L_1 , R^3 , R^4 , L_a , R^a y R^5 están de acuerdo con lo descrito en cualquiera de las modalidades anteriores.

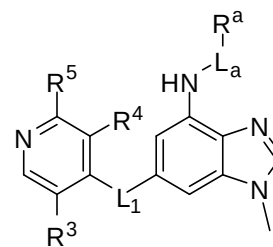
En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula IIIa, IIIb, o IIIc:



IIIa



IIIb



IIIc

5

en la que L_1 , R^3 , R^4 , L_a , R^a y R^5 están de acuerdo con lo descrito en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IIIc, en la que L_1 es $-\text{CH}_2-$.

10

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IIIc, en la que L_1 es $-\text{O}-$.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IIIc, en la que L_1 es $-\text{NR}^2-\text{Y}$ R^2 está de acuerdo con lo descrito en cualquiera de las modalidades anteriores.

15

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IIIc, en la que L_1 es $-\text{NR}^2-$, en el que R^2 es H.

20

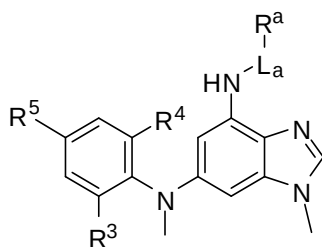
En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IIIc, en la que L_1 es $-\text{NR}^2-$, en el que R^2 es alquilo C_{1-4} . En una modalidad particular, R^2 es Me, Et, o iPr. En una modalidad más particular, R^2 es Me. En otra modalidad más particular,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

25

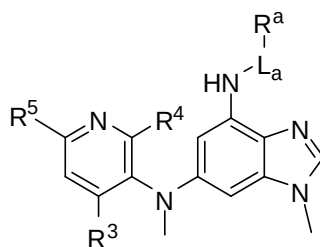
es Et.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula IVa, IVb, IVc, IVd, IVe o IVf:

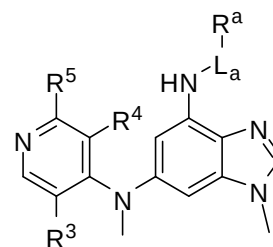
5



IVa

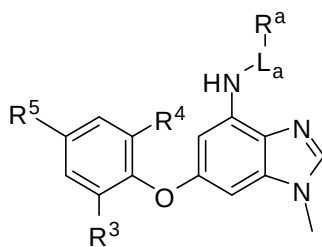


IVb

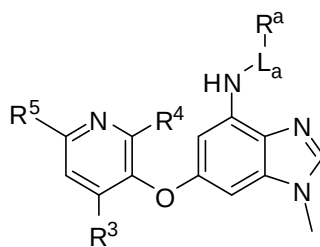


IVc

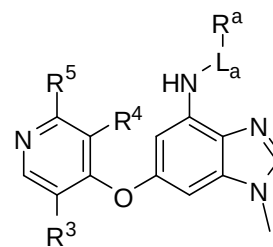
10



IVd



IVe



IVf

15

en la que R³, R⁴, R⁵, L_a, y R^a son de acuerdo con lo descrito en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IVf, en la que L_a está ausente.

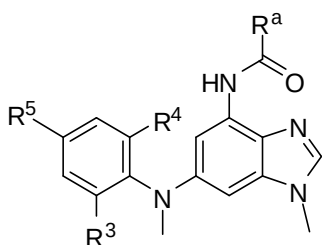
20

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

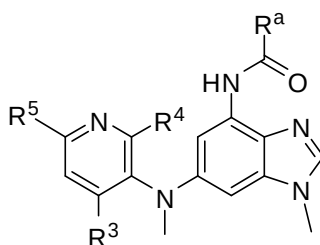
25

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula Va, Vb, Vc, Vd, Ve o Vf:

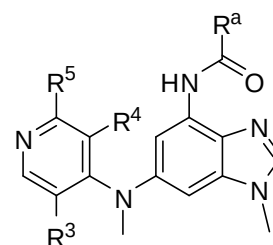
5



Va

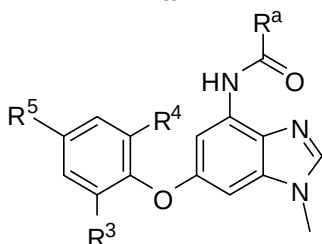


Vb

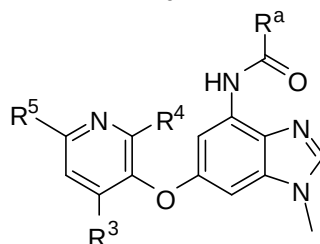


Vc

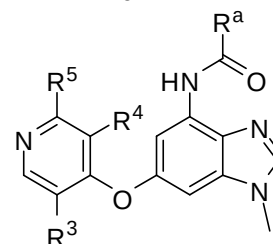
10



Vd



Ve



Vf

en las que R^3 , R^4 , R^5 , y R^a están de acuerdo con lo descrito en cualquiera de las modalidades anteriores.

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

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^3 es H.

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

En una modalidad, un compuesto de la invención está

de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^3 es alquilo C_{1-4} . En una modalidad particular, R^3 es Me, Et, o *n*-Pr. En más de modalidad particular, R^3 es Me o Et. En una modalidad más particular, los R^3 es Et. En otra modalidad más particular R^3 es Me.

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

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

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

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^5 es CN.

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

5 En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^5 es $-L_2-R^6$, R^6 está de acuerdo con lo descrito con anterioridad, L_2 es $-C(=O)NR^7-$, $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2NR^7-$, o $-NR^7SO_2-$, y R^7 está de acuerdo con lo definido en cualquiera
10 de las modalidades anteriores. En una modalidad particular, R^7 es H. En otra modalidad particular, R^7 es alquilo C_{1-4} . En una modalidad más particular, R^7 es Me, o Et. En una modalidad más particular, R^7 es Me.

 En una modalidad, un compuesto de la invención está
15 de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^5 es $-L_2-R^6$, L_2 está de acuerdo con lo descrito con anterioridad, y R^6 es H.

 En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que
20 R^5 es $-L_2-R^6$, L_2 está de acuerdo con lo descrito con anterioridad, y R^6 es alquilo C_{1-6} . En una modalidad particular, R^6 es Me, Et, iPr, o tBu. En una modalidad más particular, R^6 es Me, o Et.

 En una modalidad, un compuesto de la invención está
25 de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que

R^5 es $-L_2-R^6$, L_2 está de acuerdo con lo descrito con anterioridad, y R^6 es alquilo C_{1-6} sustituido con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente. En otra modalidad, R^6 es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales
5 está sustituido con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente. En una modalidad particular, R^6 es alquilo C_{1-6} sustituido con uno, dos o tres grupos seleccionados en forma independiente R^8 . En otra modalidad particular, R^6 es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales
10 está sustituido con uno, dos o tres grupos seleccionados en forma independiente R^8 . En una modalidad más particular, R^6 es alquilo C_{1-6} sustituido con un grupo R^8 . En otra modalidad particular, R^6 es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con un grupo R^8 .

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

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

En una modalidad, un compuesto de la invención está
25 de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que

R^5 es $-L_2-R^6$, L_2 es $-C(=O)NR^7-$, $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2NR^7-$,
o $-NR^7SO_2-$, R^6 y R^7 son de acuerdo con lo definido en
cualquiera de las modalidades anteriores. En una modalidad
particular, R^7 es H, Me, o Et, y R^6 está de acuerdo con lo
5 definido en cualquiera de las modalidades anteriores. En otra
modalidad particular, R^7 está de acuerdo con lo definido en
cualquiera de las modalidades anteriores, y R^6 es H. En otra
modalidad particular, R^7 está de acuerdo con lo definido en
cualquiera de las modalidades anteriores, y R^6 es C_{1-6} alquilo
10 sustituido en forma opcional con uno o más seleccionado en
forma independiente de OH, CN, halo, o alcoxi C_{1-4} . En una
modalidad más particular, R^7 es H, Me, o Et, y R^6 es H. En
otra modalidad más particular, R^7 es H, Me, o Et, y R^6 es Me,
Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido en
15 forma opcional con uno o más seleccionado en forma
independiente de OH, CN, halo, o alcoxi C_{1-4} . En aún otra
modalidad más particular, R^7 es H, Me, o Et, y R^6 es Me, Et,
iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido en forma
opcional con uno o más seleccionado en forma independiente de
20 OH, CN, F, Cl, OMe, u OEt. En una modalidad más particular,
 R^5 es $-C(=O)NH_2$, o $-SO_2NH_2$.

En una modalidad, un compuesto de la invención está
de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que
 R^a es H.

25 En una modalidad, un compuesto de la invención está

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

5 En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es alquilo C_{1-4} sustituido con uno o más R^b seleccionado en forma independiente. En otra modalidad, R^a es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más
10 seleccionados en forma independiente de R^b . En una modalidad particular, R^a es C_{1-4} sustituido con alquilo con uno, dos, o tres seleccionados en forma independiente de R^b . En otra modalidad particular, R^a es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos, o tres seleccionados
15 en forma independiente de R^b . En una modalidad más particular, R^a es C_{1-4} sustituido con alquilo con un R^b . En otra modalidad más particular, R^a es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con un R^b .

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

 En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que
25 R^b es alcoxi C_{1-4} . En una modalidad particular, R^b es OMe, OEt,

u OiPr. En una modalidad más particular, R^b es OMe.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^b es cicloalquilo C₃₋₇. En una modalidad particular, R^b es
5 ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo. En una modalidad más particular, R^b es ciclopropilo.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^b es un heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que
10 comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N y S. En una modalidad particular, R^b es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydropyranilo, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, o tiomorfolino.

15 En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^b es un heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N, y S, sustituido con uno o más
20 seleccionados en forma independiente de halo u oxo. En una modalidad particular, R^b es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydropyranilo, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, o tiomorfolino, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más halo u oxo seleccionados
25 en forma independiente. En otra modalidad particular, R^b es

un heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N, y S, sustituido con uno o más F, Cl, u oxo seleccionados en forma independiente. En una modalidad más particular, R^b es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidino, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más F, Cl, u oxo seleccionados en forma independiente. En una modalidad más particular, R^b es un heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N, y S, sustituido con uno, dos o tres seleccionados en forma independiente F, Cl, u oxo. En otra modalidad más particular, R^b es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidino, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos o tres seleccionados en forma independiente F, Cl, u oxo.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^b es $-SO_2$ -alquilo C_{1-4} . En una modalidad particular, R^b es $-SO_2CH_3$, o $-SO_2CH_2CH_3$.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que

R^b es $-C(=O)NR^{b1}R^{b2}$, en donde cada R^{b1} , o R^{b2} se selecciona en forma independiente de H, y alquilo C_{1-4} . En una modalidad particular, cada R^{b1} , o R^{b2} se selecciona en forma independiente entre H, $-CH_3$, y $-CH_2CH_3$. En una modalidad más particular, R^b es $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NMeH$, o $-C(=O)NMe_2$.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es cicloalquilo C_{3-7} monocíclico. En una modalidad particular, R^a es ciclopropilo, ciclobutilo, o ciclopentilo.

10 En una modalidad más particular, R^a es ciclopropilo.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es cicloalquilo C_{3-7} monocíclico sustituido con uno o más grupos seleccionados en forma independiente de R^c . En otra modalidad, R^a es ciclopropilo, ciclobutilo, o ciclopentilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más grupos seleccionados en forma independiente de R^c . En una modalidad particular, R^a es cicloalquilo C_{3-7} monocíclico sustituido con uno, dos o tres grupos seleccionados en forma independiente de R^c . En otra modalidad particular, R^a es ciclopropilo, ciclobutilo, o ciclopentilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno, dos o tres grupos seleccionados en forma independiente de R^c . En una modalidad más particular, R^a es un cicloalquilo C_{3-7} monocíclico substituido con un grupo R^c . En otra modalidad particular, R^a es ciclopropilo, ciclobutilo, o ciclopentilo, cada uno de los cuales está

15

20

25

sustituido con un grupo R^c .

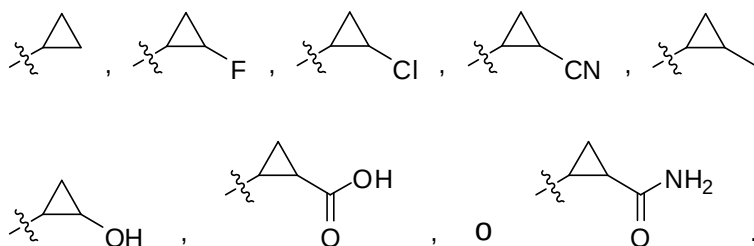
En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^c es halo, CN, u OH. En una modalidad particular, R^c es F, Cl, CN, u
5 OH. En una modalidad más particular, R^c es F.

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

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^c es -
10 $C(=O)OH$.

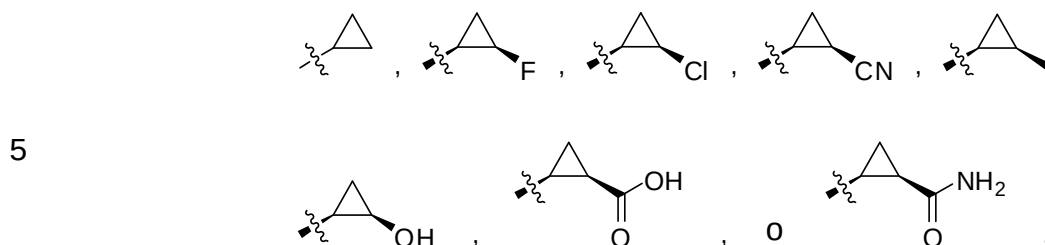
En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^c es -
 $C(=O)NR^{c1}R^{c2}$, en la que cada R^{c1} , o R^{c2} se selecciona en forma
15 independiente entre H, y alquilo C_{1-4} . En una modalidad particular, cada R^{c1} , o R^{c2} se selecciona en forma independiente entre H, -CH₃, y -CH₂CH₃. En una modalidad más particular, R^c es -C(=O)NH₂, -C(=O)NMeH, o -C(=O)NMe₂.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es:
20



25 En una modalidad, un compuesto de la invención está

de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es:



En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N y S. En una modalidad particular, R^a es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropiraniilo, azetidiniilo, pirrolidiniilo, piperidiniilo, piperaziniilo, morfoliniilo, o tiomorfoliniilo.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a Vf, en la que R^a es heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N y S. En una modalidad particular, R^a es furanilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tetrazol, piridinilo, pirazinilo o pirimidiniilo.

En una modalidad, un compuesto de la invención está de acuerdo con la Fórmula I, en donde el compuesto se

selecciona de:

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

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

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

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

10 6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo,

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

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

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

20 fluorociclopropanocarboxamida,

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

25 (1R,2R)-N-[6-(4-ciano-2-etil-fenoxi)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

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

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

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

10 (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-2-fluoro-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

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

15 (1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida,

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

20 il]ciclopropanocarboxamida,

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

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

25 (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-

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

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

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

10 5-((4-(ciclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-
benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)-4-etilpicolinamida,
4-etil-5-((4-((1R,2R)-2-
fluorociclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-
il)(metil)amino)picolinamida,

15 (1R,2R)-N-[6-(N,2-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-
1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida,

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

20 5-(7-amino-3-metil-bencimidazol-5-il)oxi-4-metil-
piridina-2-carbonitrilo,

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

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

25 N-[6-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilamino)-1-

metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida, y

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

En una modalidad, un compuesto de la invención está
5 de acuerdo con la Fórmula I, en la que el compuesto se
selecciona de

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

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

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

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

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

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

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

fluoro-ciclopropanocarboxamida.

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

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

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

1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.

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

5 En un aspecto está presente como la base libre de un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las modalidades descritas en esta descripción.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las modalidades descritas en esta descripción es una sal aceptable para uso farmacéutico.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las modalidades descritas en esta descripción es un solvato del compuesto.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las modalidades descritas en esta descripción es un solvato de una sal aceptable para uso farmacéutico de un compuesto.

Si bien los grupos especificados para cada modalidad por lo general se han enumerado con anterioridad por separado, un compuesto de la invención incluye uno en el que varias o cada modalidad en la fórmula anterior, así como también otras fórmulas presentadas en esta descripción, se selecciona de uno o más de los miembros o grupos designados respectivamente, para cada variable. Por lo tanto, esta invención pretende incluir todas las combinaciones de las

modalidades dentro de su alcance.

Si bien los grupos especificados para cada modalidad por lo general se han enumerado con anterioridad por separado, un compuesto de la invención puede ser uno para
5 el cual una o más variables (por ej., grupos R) se selecciona de uno o más modalidades de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas enumeradas con anterioridad. Por lo tanto, la presente invención pretende incluir todas las combinaciones de variables a partir de cualquiera de las modalidades
10 descritas dentro de su alcance.

En forma alternativa, la exclusión de una o más de las variables especificadas de un grupo o una modalidad, o combinaciones de los mismos también es contemplada por la presente invención.

15 En ciertos aspectos, la presente invención proporciona fármacos precursores y derivados de los compuestos de acuerdo con las fórmulas anteriores. Los fármacos precursores son derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos metabólicamente escindibles y
20 se convierten por solvólisis o en condiciones fisiológicas los compuestos de la invención, que son farmacéuticamente activos, *in vivo*. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, derivados de éster de colina y similares, ésteres de N-alquilmorfolina y similares.

25 Otros derivados de los compuestos de esta invención

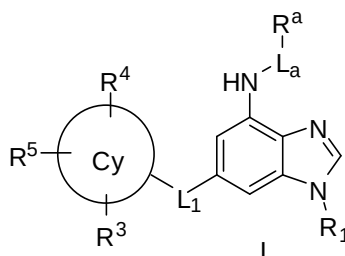
tienen actividad tanto en sus formas de ácido y derivado de ácido, pero la forma sensible a los ácidos a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular, o liberación retardada en el organismo de mamífero (Bundgard, H, 1985).

5 Los fármacos precursores incluyen derivados de ácido muy conocidos por aquéllos con experiencia de la técnica, como, por ejemplo, ésteres preparados por medio de la reacción del ácido de origen con un alcohol adecuado, o amidas preparadas por medio de la reacción del compuesto ácido de origen con
10 una amina sustituida o no sustituida, o ácido anhídridos, o anhídridos mixtos. Los ésteres alifáticos o aromáticos simples, amidas y anhídridos derivados de grupos ácidos pendientes en los compuestos de esta invención son fármacos precursores preferidos. En algunos casos es deseable preparar
15 fármacos precursores de tipo éster doble como por ej., ésteres de (aciloxi)alquilo o ((alcoxycarbonil)oxi)alquilésteres. En particular son útiles los ésteres de alquilo C₁ a C₈, alqueno C₂-C₈, arilo, arilo C₇-C₁₂ sustituido, y arilalquilo C₇-C₁₂ de los compuestos de la
20 invención.

CLÁUSULAS

1) Un compuesto de acuerdo con la Fórmula I:

5



donde

10

R^1 es H o Me;

L_1 es $-NR^2-$; $-O-$, o $-CH_2-$;

15

Cy es fenilo, o un heteroarilo monocíclico de 5 a 9 miembros o bicíclico condensado que comprende de 1 a 4 heteroátomos seleccionados en forma independiente entre N, O, y S;

R^2 es H, o alquilo C_{1-4} ;

20

R^3 es H, halo, alquilo C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o más seleccionado en forma independiente de halo, o alcoxi C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o más halo seleccionados en forma independiente;

R^4 es H, o halo;

R^5 es $-CN$, halo, o es $-L_2-R^6$;

$-L_2$ está ausente, o es $-C(=O)-$, $-C(=O)NR^7-$, $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^7-$, o $-NR^7SO_2-$;

25

R^6 es H, o alquilo C_{1-6} sustituido en forma opcional

con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente;

R^7 es H, o alquilo C_{1-4} ;

R^8 es OH, CN, halo, o alcoxi C_{1-4} ;

L_a está ausente, o es $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$,

5 o $-C(=O)NH-$;

R^a es:

H,

alquilo C_{1-4} sustituido en forma opcional con uno o
más R^b seleccionados en forma independiente,

10 cicloalquilo C_{3-7} monocíclico sustituido en forma
opcional con uno o más R^c seleccionados en forma
independiente,

heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros
que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma
15 independiente de O, N, y S, o

heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que
comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma
independiente de O, N y S;

R^b es

20 halo,

CN,

OH,

alcoxi C_{1-4} ,

cicloalquilo C_{3-7} ,

25 heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros

que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N, y S (heterocicloalquilo el cual está sustituido en forma opcional con uno o más halo u oxo seleccionados en forma independiente),

- 5 -SO₂-alquilo C₁₋₄, o
 -C(=O)NR^{b1}R^{b2};
 R^c es
 halo,
 CN,
10 OH,
 alquilo C₁₋₄,
 -C(=O)OH, o
 -C(=O)NR^{c1}R^{c2}; y
 cada R^{b1}, R^{b2}, R^{c1} y R^{c2} se selecciona en forma
15 independiente entre H y alquilo C₁₋₄;

 o una sal aceptable para uso farmacéutico, o un solvato, o un solvato de las sales aceptables para uso farmacéutico.

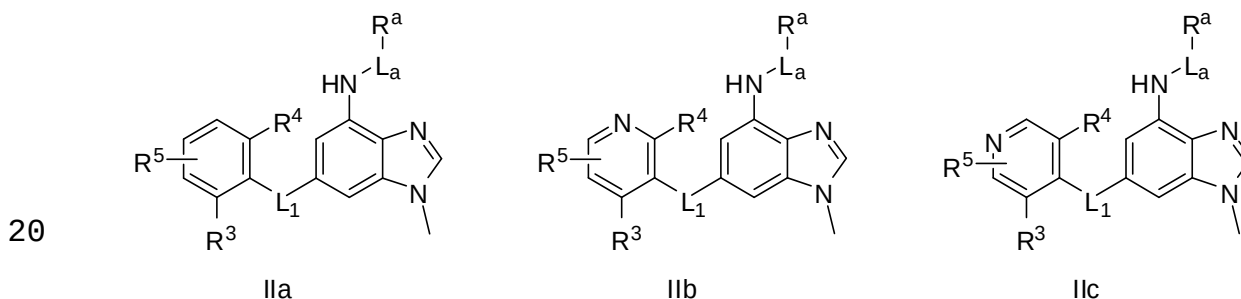
- 2) Un compuesto o una sal aceptable para uso
20 farmacéutico de acuerdo con la cláusula 1, en el que R¹ es Me.

3) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 2, en el que Cy es fenilo.

- 25 4) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico

del mismo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 2, en el que Cy es un heteroarilo monocíclico de 5 a 9 miembros o bicíclico condensado que comprende de 1 a 4 heteroátomos seleccionados en forma independiente entre N, O, y S.

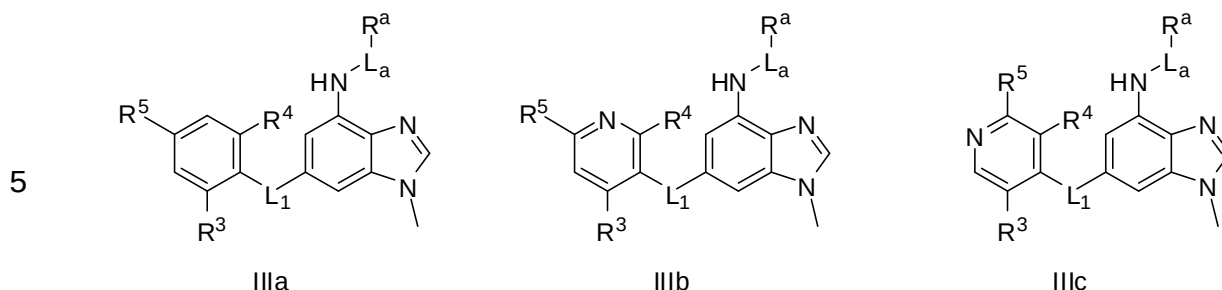
- 5 5) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico del mismo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 2, en donde un heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que comprende de 1 a 4 heteroátomos seleccionados en forma independiente entre N, O, y S.
- 10 6) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 2, en el que Cy es piridilo.
- 7) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1, en el que el
- 15 compuesto está de acuerdo con Fórmula IIa, IIb o IIc:



en las que L₁, R³, R⁴, L_a, R^a y R⁵ están de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1.

- 8) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico
- 25 de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1, en el que el

compuesto está de acuerdo con Fórmula IIIa, IIIb, o IIIc:



en las que L_1 , R^3 , R^4 , L_a , R^a y R^5 están de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1.

10 9) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en el que L_1 es $-\text{CH}_2-$.

10) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en el que L_1 es O.

11) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en el que L_1 es $-\text{NR}^2-$.

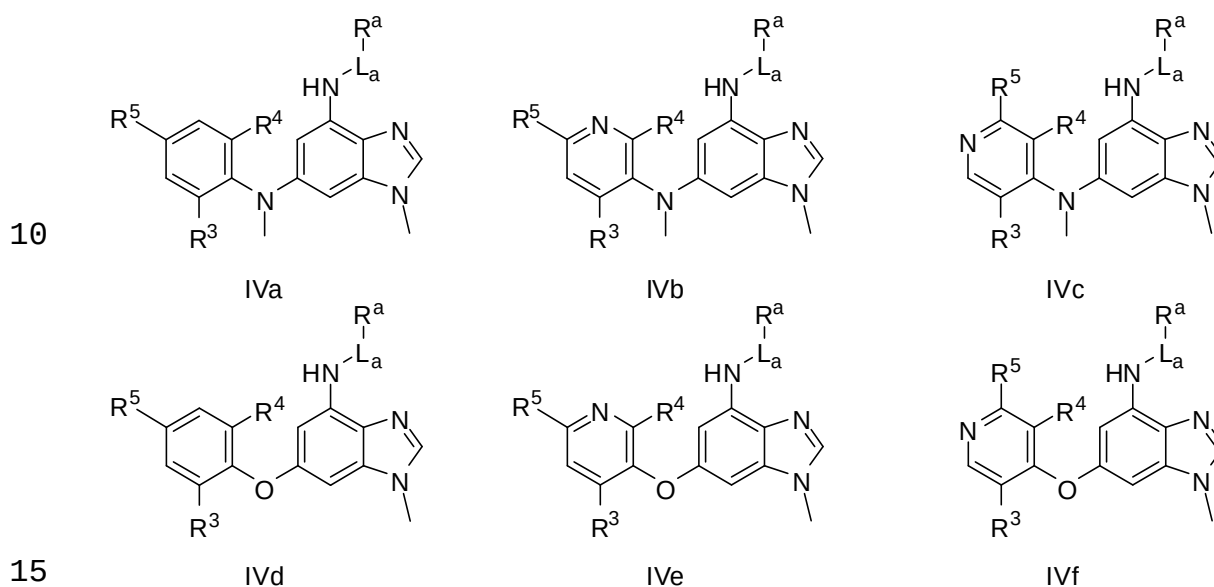
12) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 11, en el que R^2 es H.

13) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 11, en el que R^2 es alquilo C_{1-4} .

14) Un compuesto o una sal aceptable para uso

farmacéutico de acuerdo con la cláusula 11, en el que R^2 es Me.

15) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1, en el que el
5 compuesto está de acuerdo con Fórmula IVa, IVb, IVc, IVd, IVe o IVf:



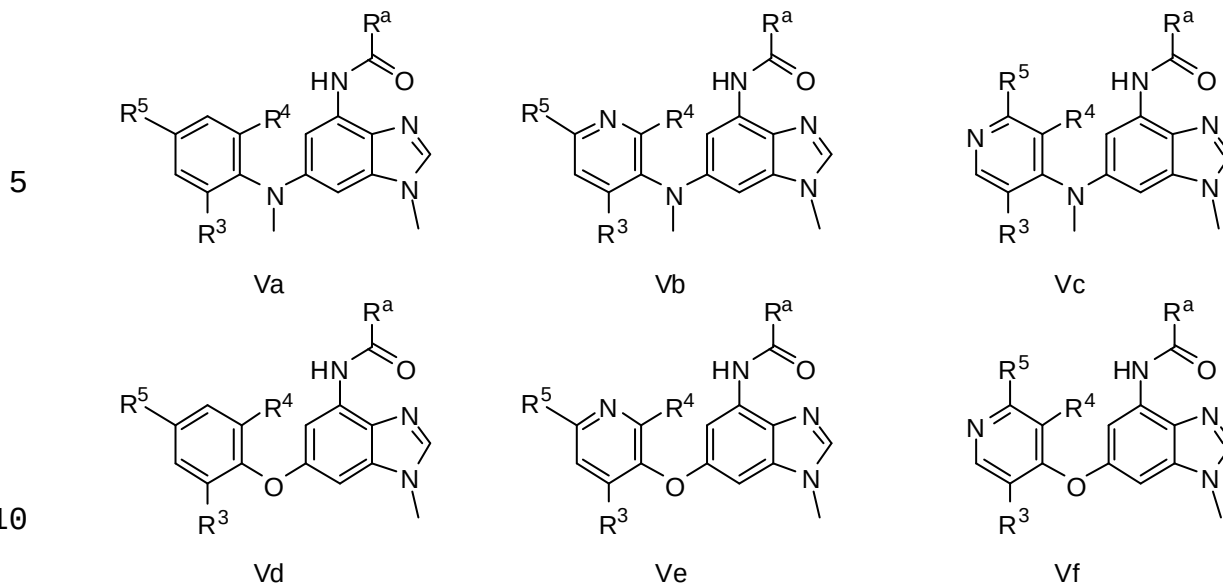
en las que R^3 , R^4 , R^5 , L_a , y R^a están de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1.

16) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 15, en el que
20 L_a está ausente.

17) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 15, en el que L_a es $-C(=O)-$.

18) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico
25 de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1, en el que el

compuesto está de acuerdo con Fórmula Va, Vb, Vc, Vd, Ve y Vf:



en las que R^3 , R^4 , R^5 , L_a , y R^a están de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1.

19) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 18, en el que R^4 es H.

20) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 18, en el que R^4 es F o Cl.

21) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 18, en el que R^3 es H.

22) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 18, en el que R^3 es alquilo C_{1-4} .

23) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 22, en el que R^3 es Me o Et.

24) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico
5 de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que R^5 es CN.

25) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que R^5 es halo.

10 26) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 25, en el que R^5 es F, o Cl.

27) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que
15 R^5 es $-L_2-R^6$, R^6 está de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1 y L_2 es $-C(=O)NR^7-$, $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2NR^7-$, o $-NR^7SO_2-$.

28) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 27, en la que R^7 es H.

20 29) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que R^5 es $-L_2-R^6$, L_2 está de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1, y R^6 es H.

30) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico
25 de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 26, en el que

R^5 es- L_2 - R^6 , L_2 está de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1, y R^6 es alquilo C_{1-6} .

31) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 30, en el que R^6 es Me.

32) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que R^5 es- L_2 - R^6 , L_2 está de acuerdo con lo descrito en la cláusula 1, y R^6 es alquilo C_{1-6} sustituido con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente.

33) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 32, en el que R^6 es Me, Et, iPr, o tBu, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más grupos R^8 seleccionados en forma independiente.

34) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 33, en el que R^8 es OH, CN, F, Cl, -OMe, o -OEt.

35) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que R^5 es- L_2 - R^6 , en la que L_2 es -C(=O)-, o -SO₂-, y R^6 es alquilo C_{1-6} .

36) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 35, en el que R^5 es -C(=O)Me, -C(=O)Et, -SO₂Me o -SO₂Et.

37) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico

de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en el que R^5 es $-L_2-R^6$, en la que L_2 es $-C(=O)NR^7-$, $-NR^7C(=O)-$, $-SO_2NR^7-$ o $-NR^7SO_2-$, en el que R^7 es H, Me o Et, y R^6 es Me, Et, iPr o tBu, cada uno de los cuales está sustituido en forma opcional con uno o más seleccionados en forma independiente de OH, CN, halo, o alcoxi C_{1-4} .

38) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 37, en el que R^5 es $-C(=O)NH_2$, o $-SO_2NH_2$.

10 39) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es alquilo C_{1-4} .

40) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 39, en el que R^a es Me o Et.

41) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es alquilo C_{1-4} sustituido con uno o más R^b seleccionado en forma independiente.

20 42) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41, en el que R^a es Me, Et, iPr, o tBu.

43) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es F, Cl, CN u OH.

44) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es OMe, OEt u OiPr.

45) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

46) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo o tiomorfolinilo.

47) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, azetidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo, cada uno de los cuales está sustituido con uno o más halo u oxo seleccionados en forma independiente.

48) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es -SO₂CH₃, o -SO₂CH₂CH₃.

49) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 41 ó 42, en el que R^b es -C(=O)NH₂, -C(=O)NMeH, o -C(=O)NMe₂.

50) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico

de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es cicloalquilo C_{3-7} monocíclico.

51) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es cicloalquilo C_{3-7} monocíclico sustituido con uno o más grupos seleccionados en forma independiente de R^c .

52) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 50 ó 51, en el que R^a es ciclopropilo, ciclobutilo o ciclopentilo.

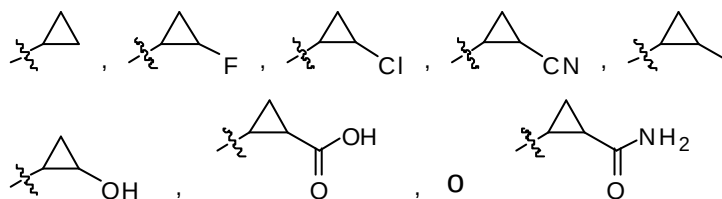
53) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 51, en el que R^c es F, Cl, CN u OH.

54) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 51, en el que R^c es -Me, -Et o iPr.

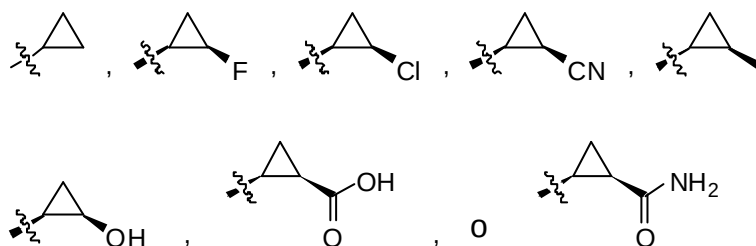
55) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 51, en el que R^c es $-C(=O)OH$.

56) Un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 51, en el que R^c es $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NMeH$, o $-C(=O)NMe_2$.

57) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es:



- 5 58) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es:



10

- 59) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es heterocicloalquilo monocíclico de 4 a 7 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente de O, N y S.

- 60) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 59, en el que R^a es oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydropiranilo, azetidino, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiomorfolinilo.

- 61) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en el que R^a es heteroarilo monocíclico de 5 a 6 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados en forma independiente

de O, N y S.

- 62) Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo con la cláusula 61, en el que R^a es furanilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tetrazol, piridinilo, pirazinilo o pirimidinilo.
- 63) Un compuesto, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto se selecciona de la Tabla I.
- 64) Un compuesto, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.
- 65) Un compuesto, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en el que el compuesto no es (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida.
- 66) Un compuesto, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en donde el compuesto es (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.
- 67) Un compuesto, o una sal aceptable para uso

farmacéutico del mismo, de acuerdo con la cláusula 1, en el que el compuesto no es (1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida.

5 68) Una composición farmacéutica que comprende un portador aceptable para uso farmacéutico y una cantidad eficaz para uso farmacéutico de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 67.

69) La composición farmacéutica de acuerdo con la
10 cláusula 68 que comprende un agente terapéutico adicional.

70) El compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 67, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 68 a 69, para su uso en medicina.

15 71) Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 67, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 68 a 69, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes,
20 enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.

25 72) Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las

cláusulas 1 a 67, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 68 a 69, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades proliferativas.

73) Un compuesto de acuerdo con la cláusula 72, en el
5 que las enfermedades proliferativas se seleccionan de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en inglés), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en
10 inglés), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

74) Un método para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias,
15 enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones,
20 que comprende administrar una cantidad de compuesto de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 67, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 68 a 69, suficiente para efectuar el tratamiento o profilaxis.

25 75) Un método para el tratamiento o la profilaxis de

enfermedades proliferativas, que comprende administrar una cantidad de compuesto de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 67, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 68 a 69, suficiente para
5 efectuar el tratamiento o profilaxis.

76) Un método de tratamiento de acuerdo con la cláusula 76, en el que las enfermedades proliferativas se seleccionan de mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en inglés), mieloma múltiple, leucemia
10 linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

15 77) El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 75 a 77, en el que el compuesto de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 67, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 68 a 69, administrado en combinación con un agente terapéutico
20 adicional.

78) La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 69, o el método de acuerdo con la cláusula 78, en el que el agente terapéutico adicional es un agente para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades alérgicas,
25 enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes,

enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la
5 hipersecreción de interferones.

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

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Cuando se emplea como un producto farmacéutico, un compuesto de la invención se administra en forma típica en
20 forma de una composición farmacéutica. Estas composiciones se pueden preparar de una manera muy conocida en la técnica farmacéutica y comprenden por lo menos un compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I. En general, un compuesto de la invención se administra en una cantidad
25 eficaz para uso farmacéutico. La cantidad de compuesto de la

invención realmente administrada será determinada en forma típica por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real de la invención se
5 administra, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por una variedad de vías que incluyen
10 oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intra-articular, intravenosa, intramuscular e intranasal. Dependiendo de la vía prevista de entrega, un compuesto de la invención se formula con preferencia en forma de composiciones inyectables u orales o ya sea como pomadas, como lociones o como todos
15 los parches para la administración transdérmica.

Las composiciones para administración oral pueden tomar la forma de soluciones líquidas a granel o suspensiones, o polvos a granel. Más comúnmente, sin embargo, las composiciones se presentan en formas de dosificación
20 unitaria para facilitar la dosificación exacta. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para
25 producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un

excipiente, vehículo o portador farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringas previamente llenadas y medidas, de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de las composiciones sólidas. En estas composiciones, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I por lo general es un componente menor (de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50% en peso o con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 40% en peso) siendo el resto diversos vehículos o portadores y ayudas de procesamiento útiles para la formación de la forma de dosificación deseada.

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

naranja.

Las composiciones inyectables se basan en forma típica en solución salina amortiguada inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros portadores inyectables conocidos en la técnica. Como antes, el compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I en las composiciones en forma típica es un componente menor, siendo a menudo de aproximadamente 0.05 a 10% en peso, siendo el resto el portador inyectable y similares.

Las composiciones transdérmicas se formulan en forma típica como una pomada o crema tópica que contiene los componentes activos, por lo general en una cantidad que oscila entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 20% en peso, con preferencia entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 20% en peso, con preferencia entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 10% en peso, y más con preferencia entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 15% en peso. Cuando se formula como una pomada, los componentes activos en forma típica se combinarán con una base de pomada parafínica o miscible en agua. En forma alternativa, los componentes activos se pueden formular en una crema con, por ejemplo una base de crema de aceite en agua. Las formulaciones transdérmicas son muy conocidas en la técnica y por lo general incluyen componentes adicionales para mejorar la penetración dérmica de la estabilidad de los

componentes activos o la formulación. Todas estas formulaciones e componentes transdérmicos conocidos están incluidos dentro del alcance de esta invención.

Un compuesto de la invención también se puede
5 administrar por medio de un dispositivo transdérmico. En consecuencia, la administración transdérmica se puede llevar a cabo por el uso de un parche o bien del tipo depósito o membrana porosa o de una variedad de matriz sólida.

10 Los componentes descritos con anterioridad para composiciones administrables por vía oral, inyectables o administrables por vía tópica son meramente representativos. Otros materiales, así como también las técnicas de procesamiento y similares se establecen en la Parte 8 de
15 Remington Pharmaceutical Sciences, 17^a edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, que se incorpora como referencia en esta descripción.

Un compuesto de la invención también se puede administrar en formas de liberación sostenida o desde
20 sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. Una descripción de materiales de liberación sostenida representativos se puede encontrar en Remington Pharmaceutical Sciences.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran
25 composiciones farmacéuticas representativas que se pueden

preparar de acuerdo con esta invención. La presente invención, sin embargo, no se limita a las siguientes composiciones farmacéuticas.

Formulación 1 - Comprimidos

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

Formulación 2 - Cápsulas

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

Formulación 3 - Líquido

20 Un compuesto de la invención de acuerdo con la
Fórmula I (125 mg), se puede mezclar con sacarosa (1.75 g) y
goma de xantano (4 mg) y la mezcla resultante se puede
mezclar, pasarse a través de un tamiz de malla US Núm. 10. y
25 después mezclarse con una solución previamente preparada de

celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio (11:89, 50 mg) en agua. El benzoato de sodio (10 mg), el sabor, y el color se pueden diluir con agua y añadirse con agitación. Entonces se puede añadir suficiente agua con agitación. Se puede añadir suficiente agua adicional para producir entonces un volumen total de 5 ml.

Formulación 4 - Comprimidos

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

Formulación 5 - Inyección

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

Formulación 6 - Tópica

Alcohol estearílico (250 g) y un petrolato blanco (250 g) se puede fundir a aproximadamente 75°C y después una mezcla de un compuesto A de la invención de acuerdo con la

Fórmula I (50 g) metilparabeno (0.25 g), propilparabeno (0.15 g), lauril sulfato de sodio (10 g), y propilenglicol (120 g) disuelto en agua (aproximadamente 370 g) se pueden añadir y la mezcla resultante se puede agitar hasta que se
5 congela.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Un compuesto de la invención se puede utilizar como un agente terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos que son causalmente relacionadas o atribuibles a la
10 actividad aberrante de JAK. En particular, las afecciones relacionadas con la actividad aberrante de JAK1 y/o TYK2. En consecuencia, los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención encuentran uso como agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar enfermedades alérgicas, enfermedades
15 inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de
20 interferones en mamíferos que incluyen seres humanos.

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

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona

un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento.

En aún otro aspecto, la presente invención
5 proporciona un método de tratamiento de un mamífero que tiene, o está en riesgo de tener una enfermedad descrita en esta descripción, el método comprende administrar una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o
10 los compuestos de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción. En un aspecto particular, la presente invención proporciona un método de tratamiento de un mamífero que tiene, o está en riesgo de tener enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes,
15 enfermedades proliferativas, rechazo de trasplantes, enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, malformaciones congénitas de los cartílagos, y/o enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6 o la hipersecreción de interferones.

20 En un aspecto de los métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible a, o que sufre de una reacción alérgica, el método comprende administrar una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de
25 una o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos

de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción. En una modalidad específica, la reacción alérgica se selecciona de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias, sinusitis, eccema y urticaria, alergias alimentarias y alergias al veneno de los insectos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de una reacción alérgica. En una modalidad específica, la reacción alérgica se selecciona de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias, sinusitis, eccema y urticaria, alergias alimentarias y alergias al veneno de los insectos.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una reacción alérgica. En una modalidad específica, la reacción alérgica se selecciona de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias, sinusitis, eccema y urticaria, alergias alimentarias y alergias al veneno de los insectos.

En el método adicional de los aspectos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible a, o que sufre de una afección inflamatoria. Los métodos

comprenden la administración de una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción.

5 En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y enfermedades inflamatorias del intestino.

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

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el
20 tratamiento y/o la profilaxis de una afección inflamatoria. En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias (por ej., asma) y enfermedades inflamatorias del intestino.

25 En el método adicional de los aspectos de

tratamiento, esta invención proporciona métodos de
tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible a, o
que sufre de una enfermedad autoinmune. Los métodos
comprenden la administración de una cantidad eficaz de
5 tratamiento de la afección o prevención de la afección de una
o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos de
la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción.
En una modalidad específica, la enfermedad autoinmune se
selecciona de COPD, asma, lupus eritematoso sistémico,
10 diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria
intestinal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona
un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento
y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmune. En una
15 modalidad específica, la enfermedad autoinmune se selecciona
de COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus
de tipo I y enfermedad inflamatoria intestinal. En una
modalidad más específica, la enfermedad autoinmune es lupus
eritematoso sistémico.

20 En aún otro aspecto, la presente invención
proporciona un compuesto de la invención, o una composición
farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para
su uso en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmune.
25 En una modalidad específica, la enfermedad autoinmune se

selecciona de COPD, asma, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I y enfermedad inflamatoria intestinal.

En aspectos de método de tratamiento adicionales, esta invención proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible de padecer o que padece una enfermedad proliferativa, los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción. En una modalidad específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer (por ej., tumores sólidos como leiomiomas uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ej., AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y psoriasis. En una modalidad más específica, la enfermedad proliferativa se selecciona entre mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en inglés), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento

y/o la profilaxis de una enfermedad proliferativa. En una modalidad específica, la enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer (por ej., tumores sólidos como leiomiomasarcoma uterino o cáncer de próstata), leucemia
5 (por ej., AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y psoriasis. En una modalidad más específica, la enfermedad proliferativa se selecciona entre mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en inglés), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas
10 en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de colon.

En aún otro aspecto, la presente invención
15 proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad proliferativa. En una modalidad específica, la enfermedad
20 proliferativa se selecciona de cáncer (por ej., tumores sólidos como leiomiomasarcoma uterino o cáncer de próstata), leucemia (por ej., AML, ALL o CLL), mieloma múltiple y psoriasis. En una modalidad más específica, la enfermedad proliferativa se selecciona entre mielofibrosis, leucemia
25 linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en

inglés), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón, cáncer de mama, y
5 cáncer de colon.

En aspectos de método de tratamiento adicionales, esta invención proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible o que sufre de rechazo
10 de trasplantes, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción. En una modalidad específica, el rechazo de
15 trasplantes es el rechazo del trasplante de órganos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis del rechazo de trasplantes. En una modalidad específica, el rechazo de trasplantes es el rechazo
20 del trasplante de órganos.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el
25 tratamiento y/o la profilaxis del rechazo de trasplantes.

En una modalidad específica, el rechazo de trasplantes es el rechazo del trasplante de órganos.

En un aspecto de método de tratamiento, esta invención proporciona un método de tratamiento y/o profilaxis
5 en un mamífero susceptible de padecer o que padece enfermedades que implican un deterioro del recambio de los cartílagos, el método comprende administrar una cantidad eficaz para uso terapéutico de un compuesto de la invención, o una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en
10 esta descripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades que implican deterioro del recambio de los cartílagos.

15 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades que implican
20 deterioro del recambio de los cartílagos.

La presente invención también proporciona un método de tratamiento y/o profilaxis de las malformaciones congénitas de los cartílagos, el método comprende administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones
25 farmacéuticas o los compuestos de la invención descritos en

esta descripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de malformaciones congénitas de los
5 cartílagos.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el
10 tratamiento y/o la profilaxis de las malformaciones congénitas de los cartílagos.

En aspectos del método de tratamiento adicionales, esta invención proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible a, o que sufre de
15 enfermedades asociadas con la hipersecreción de IL6, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de una o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción.
20 En una modalidad específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6 se selecciona de la enfermedad de Castleman y glomerulonefritis mesangial proliferativa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento
25 y/o la profilaxis de enfermedades asociadas con la

hipersecreción de IL6. En una modalidad específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6 se selecciona de la enfermedad de Castleman y glomerulonefritis mesangial proliferativa.

5 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades asociadas con
10 la hipersecreción de IL6. En una modalidad específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de IL6 se selecciona de la enfermedad de Castleman y glomerulonefritis mesangial proliferativa.

 En aspectos de método de tratamiento adicionales,
15 esta invención proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero susceptible o que sufre de enfermedades asociadas con la hipersecreción de interferones, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de tratamiento de la afección o prevención de la afección de una
20 o más de las composiciones farmacéuticas o los compuestos de la invención de acuerdo con lo mostrado en esta descripción. En una modalidad específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones se selecciona entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis por lupus,
25 dermatomiositis, síndrome de Sjögren, psoriasis, y artritis

reumatoide.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades asociadas con la
5 hipersecreción de interferones. En una modalidad específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones se selecciona entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis por lupus, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, psoriasis, y artritis reumatoide.

10 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades asociadas con
15 la hipersecreción de interferones. En una modalidad específica, la enfermedad asociada con la hipersecreción de interferones se selecciona entre lupus eritematoso sistémico y cutáneo, nefritis por lupus, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, psoriasis, y artritis reumatoide.

20 Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de la invención para su uso como un producto farmacéutico en especial en el tratamiento y/o la profilaxis de las afecciones y enfermedades mencionadas con anterioridad. También se proporcionan en esta descripción el
25 uso de los presentes compuestos en la fabricación de un

medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una de las afecciones y enfermedades mencionadas con anterioridad.

Un régimen particular del presente método comprende la administración a un sujeto que sufre de una enfermedad que
5 implica una inflamación, de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir el nivel de inflamación en el sujeto, y con preferencia terminar el proceso responsable de la inflamación. Una modalidad especial del método comprende
10 administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un sujeto paciente que sufre de o es susceptible al desarrollo de artritis reumatoide, durante un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la inflamación en las articulaciones del paciente, y con
15 preferencia terminar, los procesos responsables de la inflamación.

Un régimen particular adicional del presente método comprende la administración a un sujeto que padece un estado de enfermedad caracterizado por la degradación de los
20 cartílagos o articulaciones (por ej., artritis reumatoide y/o osteoartritis) de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención durante un período de tiempo suficiente para reducir y con preferencia terminar los procesos de autoperpetuación responsables de la degradación.
25 Una modalidad particular del método comprende administrar una

cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un sujeto paciente que sufre de o es susceptible al desarrollo de la osteoartritis, por un período de tiempo suficiente para reducir o prevenir, respectivamente, la degradación del cartílago en las articulaciones del paciente, y con preferencia terminar, los procesos de auto-perpetuación responsables del deterioro. En una modalidad particular, el compuesto puede exhibir anabólicos del cartílago y/o propiedades anti-catabólicas.

10 Los niveles de dosis de inyección oscilan entre aproximadamente 0.1 mg/kg/h de por lo menos 10 mg/kg/h, todo durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 h y en especial 24 a 96 h. Un bolo de precarga de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más también se puede
15 administrar para lograr niveles de estado estacionario adecuados. No se espera que la dosis total máxima exceda de aproximadamente 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

 Para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades
20 a largo plazo, como por ej., las enfermedades degenerativas, el régimen de tratamiento por lo general se extiende a lo largo de muchos meses o años, por lo que se prefiere la administración oral para la comodidad y la tolerancia del paciente. Con la dosificación oral, de uno a cinco y en
25 especial dos a cuatro y en forma típica tres dosis orales por

día son regímenes representativos. Por el uso de estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de un compuesto de la invención, las dosis particulares
5 proporcionan cada una de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg y en especial de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg.

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

Cuando se utiliza para prevenir la aparición de una afección, un compuesto de la invención se administra a un paciente en riesgo de desarrollar la afección, en forma
15 típica en el consejo y bajo la supervisión de un médico, en los niveles de dosificación descritos con anterioridad. Los pacientes con riesgo de desarrollar una afección particular incluyen por lo general aquellos que tienen antecedentes familiares de la enfermedad, o aquellos que han
20 sido identificados por las pruebas genéticas o de selección como susceptibles en particular a desarrollar la afección.

Un compuesto de la invención se puede administrar como el único agente activo o se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, que incluyen
25 otros compuestos que demuestran la misma o una actividad

terapéutica similar y que están determinados como seguros y eficaces para esta administración combinada. En una modalidad específica, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite una dosis significativamente más baja de cada uno para ser utilizado, para reducir de ese modo los efectos secundarios observados.

En una modalidad, un compuesto de la invención o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención se administra como un medicamento. En una modalidad específica, la composición farmacéutica comprende además un componente activo adicional.

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

En una modalidad, un compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de la artritis (por ej., artritis reumatoide); los agentes particulares incluyen pero

no se limitan a analgésicos, medicamentos no esteroides antiinflamatorios (NSAID, por sus siglas en inglés), esteroides, DMARDS sintéticos (por ej., pero sin limitación metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofin, 5 aurotiomalato de sodio, penicilamina, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina y ciclosporina), y DMARDS biológicos (por ej., pero sin limitarse a infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab y abatacept).

En una modalidad, un compuesto de la invención se 10 administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos proliferativos; los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: metotrexato, leukovorin, adriamicina, prednisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, 15 docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anti- anticuerpo monoclonal HER2 (por ej., Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ej., lressa®, Tarceva™, Erbitux™), 20 inhibidores del VEGF (por ej., Avastin™), inhibidores de proteasoma (por ej., Velcade™), Glivec® y los inhibidores de HSP90 (por ej., 17-AAG). Además, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con otras terapias, que incluyen, pero no se limitan a, la radioterapia o cirugía.

25 En una modalidad específica, el trastorno proliferativo se

selecciona de cáncer, enfermedades mieloproliferativas y leucemia.

En una modalidad, un compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunes, los agentes particulares incluyen pero no se limitan a: glucocorticoides, agentes citostáticos (por ej., análogos de purina), agentes alquilantes (por ej., mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino, y otros), antimetabolitos (por ej., metotrexato, azatioprina y mercaptopurina), antibióticos citotóxicos (por ej., antraciclinas dactinomicina, mitomicina C, bleomicina y mitramicina), anticuerpos (por ej., anti-CD20. anti-CD25 o anti-CD3 (OTK3) anticuerpos monoclonales, Atgam® y Thymoglobuline®), ciclosporina, tacrolimus, rapamicina (sirolimus), interferones (por ej., IFN- β), proteínas de unión a TNF (por ej., infliximab (Remicade™), etanercept (Enbrel™), o adalimumab (Humira™)), micofenolato, fingolimod y Myriocin.

En una modalidad, un compuesto de la invención se co-administra con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis del rechazo de trasplantes, los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de la calcineurina (por ej., ciclosporina o tacrolimus (FK506)), inhibidores de mTOR (por ej., sirolimus, everolimus),

antiproliferativos (por ej., azatioprina, ácido micofenólico), corticosteroides (por ej., prednisolona, hidrocortisona), anticuerpos (por ej., anticuerpos monoclonales de receptores anti-IL-2R α , basiliximab, 5 daclizumab), anticuerpos anti-células T policlonales (por ej., globulina anti-timocitos (ATG), globulina anti-linfocitos (ALG)).

En una modalidad, un compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para 10 el tratamiento y/o la profilaxis de asma y/o rinitis y/o COPD, los agentes particulares incluyen pero no se limitan a: agonistas beta2-adrenérgicos (por ej., salbutamol, levalbuterol, terbutalina y bitolterol), epinefrina (inhalado o comprimidos), anticolinérgicos (por ej., bromuro de 15 ipratropio), glucocorticoides (orales o inhalados), agonistas β 2 de acción prolongada (por ej., salmeterol, formoterol, bambuterol y albuterol oral de liberación sostenida), combinaciones de esteroides inhalados y broncodilatadores de acción prolongada (por ej., fluticasona/salmeterol, 20 budesonida/formoterol), antagonistas de leucotrienos e inhibidores de la síntesis (por ej., montelukast, zafirlukast y zileutón), inhibidores de la liberación de mediadores (por ej., cromoglicato y ketotifeno), los reguladores biológicos de la respuesta de IgE (por ej., omalizumab), 25 antihistamínicos (por ej., ceterizina, cinarizina,

fexofenadina) y vasoconstrictores (por ej., oximetazolina, xilometazolina, nafazolina y tramazolina).

Además, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con terapias de emergencia para el
5 asma y/o la COPD, las terapias incluyen oxígeno o la administración de heliox, salbutamol nebulizado o terbutalina (en forma opcional combinado con un anticolinérgico (por ej., ipratropio), esteroides sistémicos (oral o intravenosa, por ej., prednisona, prednisolona, metilprednisolona,
10 dexametasona o hidrocortisona), salbutamol intravenoso, beta-agonistas no específicos, inyectados o inhalados (por ej., epinefrina, isoetarina, isoproterenol, metaproterenol), anticolinérgicos (IV o nebulizados, por ej., glucopirrolato, atropina, ipratropio), metilxantinas (teofilina, aminofilina,
15 bamifilina), anestésicos inhalatorios que tienen un efecto broncodilatador (por ej., isoflurano, halotano, enflurano), ketamina y sulfato de magnesio intravenoso.

En una modalidad, un compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para
20 el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD, por sus siglas en inglés), los agentes particulares incluyen, pero no se limitan a: glucocorticoides (por ej., prednisona, budesonida) modificador sintético de enfermedades, agentes
25 inmunomoduladores (por ej., metotrexato, leflunomida,

sulfasalazina, mesalazina, azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) y modificadores biológicos de la enfermedad, agentes inmunomoduladores (infliximab, adalimumab, rituximab y abatacept).

5 En una modalidad, un compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de SLE, los agentes particulares incluyen pero no se limitan a: fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad (DMARD, por sus
10 siglas en inglés) como antimaláricos (por ej., plaquenil, hidroxicloroquina), inmunosupresores (por ej., metotrexato y azatioprina), ciclofosfamida y ácido micofenólico; fármacos inmunosupresores y analgésicos, como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, opiáceos (por ej.,
15 dextropropoxifeno y co-codamol), opiáceos (por ej., hidrocodona, oxicodona, MS Contin o metadona) y el parche transdérmico de fentanilo Duragesic^{MR}.

 En una modalidad, un compuesto de la invención se administra en forma conjunta con otro agente terapéutico para
20 el tratamiento y/o la profilaxis de la psoriasis, los agentes particulares incluyen pero no se limitan a: tratamientos tópicos, por ej., soluciones de baño, cremas hidratantes, cremas y ungüentos medicinales que contienen alquitrán de hulla, ditranol (Antralina), corticosteroides como
25 desoximetasona (TopicortTM), fluocinonida, vitamina D3

análogos (por ej., calcipotriol), aceite de argán y retinoides (etretinato, acitretina, tazaroteno), tratamientos sistémicos por ej., metotrexato, ciclosporina, retinoides, tioguanina, hidroxiurea, sulfasalazina, micofenolato mofetil, azatioprina, tacrolimus, ésteres de ácido fumárico o biológicos, por ej., Amevive™, Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ y ustekinumab (un bloqueador de IL-12 e IL-23). Además, un compuesto de la invención se puede administrar en combinación con otras terapias, que incluyen, pero no se limitan a fototerapia, o fotoquimioterapia (por ej., fototerapia de psoraleno y ultravioleta A (PUVA, por sus siglas en inglés)).

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

Por coadministración se incluye cualquier medio de administración de dos o más agentes terapéuticos para el paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, de

acuerdo con lo evidente para aquéllos con experiencia. Si bien los dos o más agentes se pueden administrar de forma simultánea en una sola formulación, esto no es esencial. Los agentes se pueden administrar en diferentes formulaciones y en diferentes momentos.

PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA

General

Los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de materiales de partida con facilidad disponibles por el uso de los siguientes métodos y procedimientos generales. Se apreciará que, cuando se dan las condiciones del proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), otras condiciones del proceso también se pueden utilizar a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes particulares utilizados, pero estas condiciones pueden ser determinadas por aquéllos con experiencia en la técnica por medio de procedimientos de optimización de rutina.

Además, de acuerdo con lo evidente para aquéllos con experiencia en la técnica, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para prevenir que determinados grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo

funcional particular, así como también las condiciones adecuadas para la protección y desprotección son muy conocidas en la técnica (Greene, TW; Wuts, P G M;, 1991).

Los siguientes métodos se presentan con detalles en cuanto a la preparación de un compuesto de la invención de acuerdo con lo definido con anterioridad en esta descripción y los ejemplos comparativos. Un compuesto de la invención se puede preparar a partir de materiales y reactivos de partida conocidos o comercialmente disponibles por aquéllos con experiencia en la técnica de la síntesis orgánica.

Todos los reactivos fueron de grado comercial y se utilizaron tal como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron disolventes anhidros comercialmente disponibles para las reacciones llevadas a cabo bajo atmósfera inerte. Se utilizaron disolventes de grado reactivo en todos los demás casos, a menos que se especifique lo contrario. La cromatografía en columna se llevó a cabo sobre gel de sílice 60 (35 a 70 μm). La cromatografía de capa fina se llevó a cabo por el uso de placas F-254 pre-recubiertas con gel de sílice (espesor 0.25 mm). Los espectros de RMN H^1 se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker DPX 400 (400 MHz) o un espectrómetro de RMN Bruker Advance 300 (300 MHz). Los cambios químicos (δ) para los espectros de RMN de H^1 se presentan en partes por millón (ppm) con relación a

tetrametilsilano (δ 0.00) o el pico de disolvente residual adecuado, es decir, CHCl_3 (δ 7.27), como referencia interna. Las multiplicidades se dan como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (q), quintuplete (quin), multiplete (m) y amplio (br). Se obtuvieron los espectros de electropulverización MS en un espectrómetro de plataforma LC/MS Waters o con un UPLC H-Class Waters Acquity acoplado a un espectrómetro de detector de Masa Waters 3100. Columnas utilizadas: Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 mm ID x 50 mm L, Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 mm ID x 30 mm L, o Waters Xterra MS 5 μm C18, 100 x 4.6 mm. Los métodos utilizan ya sea gradientes de MeCN/ H_2O (H_2O contiene ya sea TFA al 0.1% o NH_3 al 0.1%) o gradientes MeOH/ H_2O (H_2O contiene TFA al 0.05%). El calentamiento por microondas se llevó a cabo con un Biotage Initiator.

Las purificaciones de HPLC preparativas se llevaron a cabo con un sistema de auto-purificación dirigida por masas acoplada con un único espectrómetro de masas cuadrupolo ZQ. Todas las purificaciones de HPLC se llevaron a cabo con un gradiente de H_2O (diferentes pH)/MeCN. Las separaciones por medio de HPLC preparativa en condiciones básicas se llevaron a cabo normalmente por el uso de una precolumna BEH C18 XBrigde (5 μm , 19 x 5 mm) y una BEH C18 XBrigde (5 μm , 19 x 100 mm). Las separaciones en condiciones ácidas se llevaron a cabo por lo general por el uso de una precolumna CSH Select

C18 (5 μ m, 19 x 5 mm) y una CSH Select C18 (5 μ m, 19 x 100 mm). El gradiente centrado era de x% a x + 25% de acetonitrilo en agua en 5 min con un tiempo de ciclo de 10 min. La tasa de flujo de la columna fue de 20 ml/min.

5 El volumen de inyección varió desde 200 hasta 750 μ l. Un divisor capilar se utilizó para desviar el flujo después de la separación en columna para el espectrómetro de masas que se diluyó por 1 ml/min de flujo de ajuste. El flujo de ajuste es ácido fórmico al 0.1% en metanol. Todas las
10 muestras se purificaron por medio de una colección de fracción de masa Waters dirigida.

Tabla 1

Lista de abreviaturas utilizadas en la sección experimental:

15

20

25

Abreviatura	Definición
AcOH	ácido acético
ATP	trifosfato de adenosina
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
br s	singulete ancho
Brettphos	2-(díciclohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenil
BSA	albúmina de suero bovino
C'ial	disponible comercialmente
Conc.	concentrado
Cpd.	compuesto
DCM	diclorometano
DMF	dimetil formamida

5

10

15

20

25

Abreviatura	Definición
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DPPA	difenilfosforilazida
Dsc'd	plenamente descrito con anterioridad
TDT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido tetraacético etilenglicol
Et ₂ O	éter dietílico
Et ₃ B	trietilborano
Et ₃ N	trietilamina
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FBS	suero bovino fetal
g	gramo
h	hora
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
Int	intermedio
iPrOH	iso-propanol
m	multiplete
M	masa
MC	metilcelulosa
MeCN	acetonitrilo
Mel	yodometano
MeNH ₂	metilamina
MeOH	metanol
mg	miligramo
min	minuto

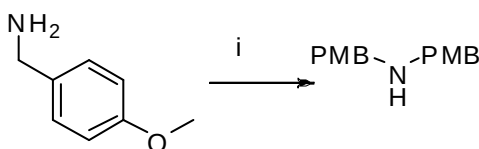
	Abreviatura	Definición
	ml	mililitro
	mmol	milimoles
	MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
5	MS Ms'd	espectrometría de masa medida de peso molecular
	Mtd	método
	MW	peso molecular
	NCS	N-clorosuccinimida
	NMP	N-metil-pirrolidona
	MRN	resonancia magnética nuclear
10	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	pBSK	fagémido pBluescript
	Pd(OAc) ₂	acetato de paladio (II)
	Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0)
	Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibencilidenacetona) dipaladio (0)
15	PdCl ₂ (dppf). DCM	complejo [1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno]dicloropaladio (II), con diclorometano
	PDX	xenoinjertos derivados del paciente
	PET	topografía por emisión de positrones
	PMB	para-metoxibencilo
	ppm	partes por millón
	p-TsOH.H ₂ O	monohidrato de ácido para-toluenosulfónico
	rt	temperatura ambiente
20	s	singulete
	sat	saturado
	SiO ₂	sílice
	SM	material de partida
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
25	Xantphos	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

Abreviatura	Definición
XPhos	2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-bifenilo

PREPARACIÓN SINTÉTICA DEL COMPUESTO DE LA INVENCIÓN

Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos intermedios de la invención

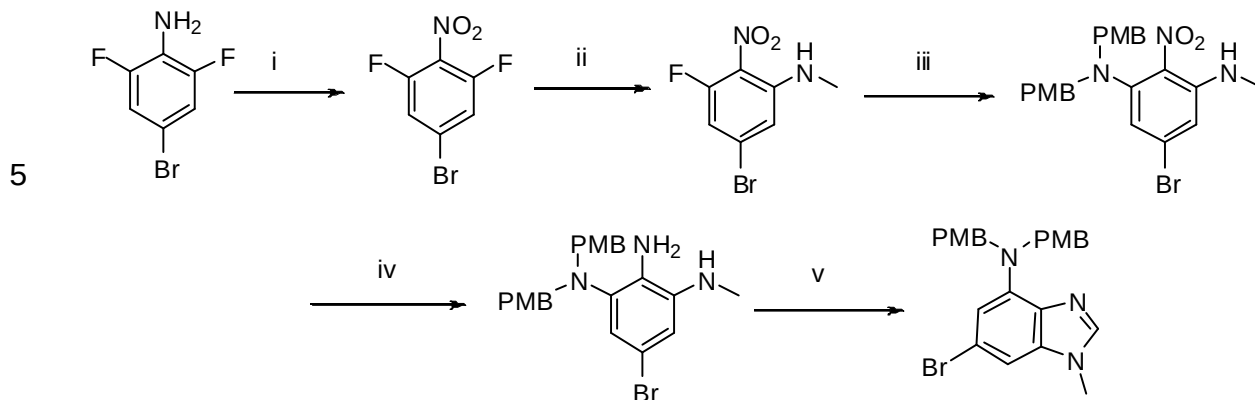
1.1 Síntesis de bis-(4-metoxi-bencil)-amina (Int. 1)



p-Anisaldehído (411 mmol), 4-metoxibencilamina (411 mmol) y tolueno (500 ml) se combinaron en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador y una trampa Dean-Stark. La reacción se calentó a reflujo durante 1 h durante la cual se eliminó el agua de la mezcla de reacción. La reacción se enfrió y se concentró. El residuo se disolvió en MeOH (120 ml). La mezcla se enfrió a 5 °C y NaBH₄ (205 mmol) se añadió en porciones durante 45 min. La reacción se calentó lentamente a reflujo. Después de 2 h a reflujo, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó (3 x H₂O y salmuera), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar el producto deseado.

1.2. Síntesis de (6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il)bis-

(4-metoxi-bencil)-amina (Int. 2)



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

Se añadió una solución de 4-bromo-2,6-difluoroanilina (240 mmol) en AcOH (150 ml) gota a gota a una suspensión de NaBO₃·4 H₂O (325 mmol) en AcOH (450 ml) a 70 °C durante 30 min. Otros 2.080 mmol de NaBO₃·4 H₂O se añadieron durante más de 5 h a la mezcla. Durante este periodo, la mezcla se agitó a 70 °C. La mezcla se vertió en agua y se extrajo con Et₂O. La capa orgánica se combinó con otra solución de Et₂O obtenido de otra reacción por el uso de las mismas condiciones descritas con anterioridad. La mezcla se concentró. Se formó un precipitado y se separó por filtración. El filtrado se concentró para dar el producto deseado después de la cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, éter de petróleo).

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

Se añadió 2 M MeNH₂ en THF (82 ml) gota a gota a una solución de 5-bromo-1,3-difluoro-2-nitrobenceno (164 mmol) y Cs₂CO₃ (197 mmol) en THF (1 L). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h y después a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se repartió entre EtOAc y H₂O. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentraron para proporcionar el producto deseado.

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

Una mezcla de bis-(4-metoxi-bencil)-amina (346 mmol), 5-bromo-3-fluoro-N-metil-2-nitroanilina (297 mmol) y Et₃N (891 mmol) se agitó a 120 °C durante 16 h. Después, la mezcla se enfrió. El producto en bruto se combinó con otro obtenido siguiendo el mismo procedimiento descrito con anterioridad. La mezcla resultante se diluyó en EtOAc y se lavó (2 x 0.2 M HCl, H₂O y NaHCO₃ sat.). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

1.2.4. Paso iv: *5-Bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N''-metil-benceno-1,2,3-triamina*

Una mezcla de 5-bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N'-metil-2-nitro-benceno-1,3-diamina (170 mmol), NH₄Cl

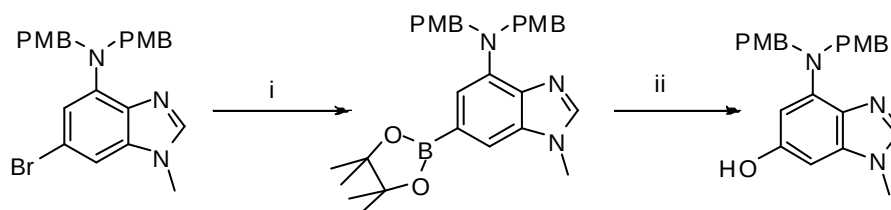
(2.038 mmol) y Zn (2.034 mmol) en 1:1 MeOH/THF (1 l) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió a 0 °C y HCOOH (20 ml) se añadió lentamente. La mezcla se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla se filtró y se combinó con otra obtenida siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad. La mezcla resultante se concentró. El residuo se disolvió en DCM. La mezcla orgánica se lavó (NH₄Cl sat.), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

10 1.2.5. Paso v: (6-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il)bis-(4-metoxi-bencil)-amina

5-Bromo-N,N-bis-(4-metoxi-bencil)-N''-metil-benceno-1,2,3-triamina (170 mmol) se disolvió en una mezcla de HC(OEt)₃ (100 mol) y MeCN (500 ml). La mezcla se agitó a 15 85 °C durante 0.5 h y después a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. La mezcla se combinó con otra que se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito con anterioridad. La mezcla resultante se concentró y el residuo se purificó por medio de cromatografía en columna 20 ultrarrápida (SiO₂, 15:85 a 60:40 EtOAc/éter de petróleo) para obtener el producto deseado.

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

5



10 1.3.1. Paso i: Bis-(4-metoxi-bencil)-[1-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol-4-il]-amina

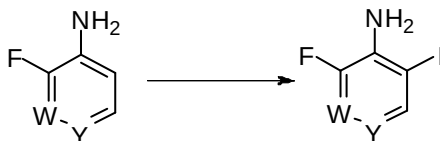
Una mezcla de (6-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-4-il)bis-(4-metoxi-bencil)-amina (54 mmol), bis(pinacolato)diboro (81 mmol), PdCl₂(dppf), DCM (2.71 mmol) y KOAc (162.5 mmol) en DMF (150 ml) se sonicaron durante 5 min bajo una corriente de nitrógeno. Después, la mezcla se agitó a 110 °C en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador durante 1 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc y la capa orgánica se lavó (H₂O), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

25 1.3.2. Paso ii: 5-{7-[Bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-iloxi}-4-metil-piridin-2-

carbonitrilo

H₂O₂ 30% en peso en H₂O (20 ml) se añadió a una solución de N,N-bis(4-metoxibencil)-1-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-4-
5 amina (58.5 mmol) en DMF (600 ml) y la mezcla se agitó durante aproximadamente 16 h a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió con Na₂SO₃ acuoso al 5%. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó (H₂O), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el producto deseado.

10 1.4. Método general: yodación orto-dirigida



15 Donde W puede ser: -N=, -CH=, -C(Cl)=; Y puede ser: -N=, -C(CN)=

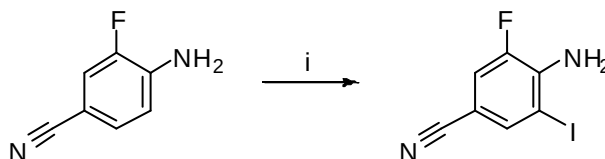
1.4.1. Método A1

Una mezcla del material de partida aminoaromático o heteroaromático (1 eq), Ag₂SO₄ (1 eq) e I₂ (1 eq) en EtOH se
20 agita a temperaturas que van desde temperatura ambiente hasta 50 °C durante un periodo que puede variar de 1 h a aproximadamente 16 h. La mezcla se filtró, se concentró y se diluyó en un disolvente orgánico. La mezcla orgánica se somete a tratamiento acuoso. El disolvente se eliminó a
25 presión reducida y el residuo se purifica por medio de

cromatografía en columna ultrarrápida para dar el producto deseado.

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

5



Una mezcla de 4-amino-3-fluorobenzonitrilo
10 (147 mmol), I₂ (147 mmol) y Ag₂SO₄ (147 mmol) en EtOH (700 ml)
se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La mezcla se
filtró y se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc y se
lavó (Na₂S₂O₃ x 3 sat.). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se
concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía
15 en columna ultrarrápida (SiO₂, 95:5 a 70:30 de
ciclohexano/EtOAc) para dar el producto deseado.

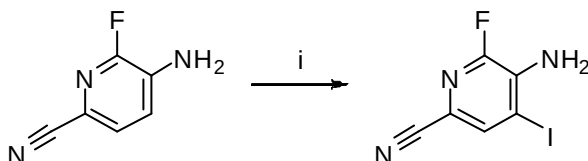
1.4.3. *Método A2*

Una mezcla del material de partida aminoaromático o
heteroaromático (1 eq), Ag₂SO₄ (3 a 4 eq) e I₂ (de 3 a 4 eq)
20 en EtOH se agita a 70 °C durante 16 h. Más equivalentes de I₂
y Ag₂SO₄ se pueden añadir para aumentar la conversión.
La mezcla se filtró y se concentró. El residuo se purifica
por medio de cromatografía en columna ultrarrápida para dar
el producto deseado.

25

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

5



Una mezcla del Int. 11 (3.62 mmol), I₂ (14.5 mmol) y Ag₂SO₄ (14.5 mmol) en EtOH (200 ml) se agitó a 70 °C durante 16 h. Se añadieron 5 equivalentes más de I₂ y Ag₂SO₄ y la
10 reacción se agitó a 70 °C durante otras 72 h. La mezcla se filtró, se concentró y se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 20:80 a 40:60 de EtOAc/ciclohexano) para producir el producto deseado.

1.6. *Método general: introducción de grupo nitrilo por medio de la reacción de Negishi*
15



En la que R_A puede ser arilo o heteroarilo; y X
20 puede ser Cl, Br o I.

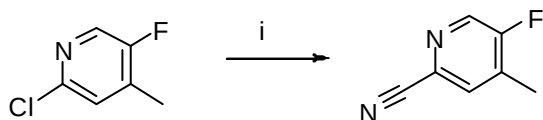
1.6.1. *Método B*

Una mezcla de haluro de arilo/heteroarilo (1 eq), cianuro de cinc (de 1 a 3 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.1 a 0.2 eq) en DMF se calienta a 150 °C en un aparato de microondas durante un
25 período que osciló entre 5 min y 0.5 h. La mezcla se filtró y

se concentró. El residuo se diluye con un disolvente orgánico. La mezcla orgánica se somete a un diagnóstico y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se tritura o se purifica por medio de cromatografía en columna ultrarrápida para dar el producto deseado.

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

10



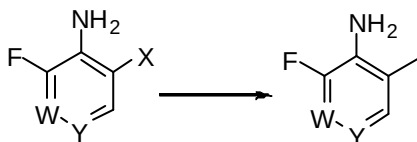
15

20

Un tubo de microondas se cargó con 2-cloro-5-fluoro-4-metilpiridina (5.5 mmol), $\text{Zn}(\text{CN})_2$ (16.6 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1.1 mmol) en DMF (20 ml). La mezcla se agitó a 150 °C durante 5 min en un reactor de microondas. La mezcla se combinó con otros productos crudos obtenidos siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad. La mezcla resultante se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó (NH_4Cl sat.), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2 , 5:95 a 15:85 EtOAc/éter de petróleo) para dar el producto deseado.

25

1.7. Método general: Suzuki con ácido borónico de metilo



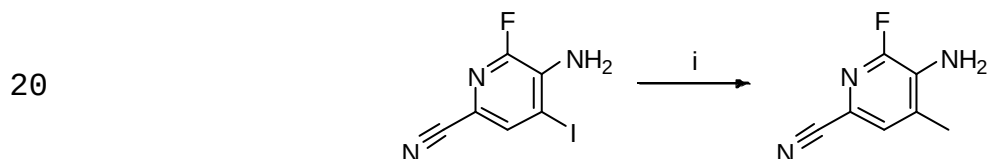
5

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

1.7.1. Método C

Una mezcla del haluro aromático/heteroaromático
10 (1 eq), ácido metilborónico (1.3 a 3 eq), Pd(dppf)Cl₂.DCM (0.11 a 0.2 eq) y Cs₂CO₃ (3 a 5 eq) en 1,4-dioxano se agita a 100 °C. La mezcla se diluye con un disolvente orgánico. La mezcla orgánica se somete a tratamiento acuoso y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se
15 purifica por medio de cromatografía en columna ultrarrápida para dar el producto deseado.

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



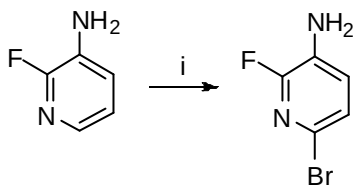
20

Una mezcla del Int. 5 (3 mmol), ácido metilborónico (9.1 mmol), Pd(dppf)Cl₂.DCM (0.32 mmol) y Cs₂CO₃ (15.2 mmol) en 1,4-dioxano (8 ml) se agitó a 105 °C durante 5 h.
25 La mezcla se diluyó (EtOAc), se lavó (NaHCO₃ sat.), se secó

(Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 10:90 a 50:50 EtOAc/éter de petróleo) para dar el producto deseado.

1.8. Síntesis de 6-bromo-2-fluoro-piridin-3-ilamina

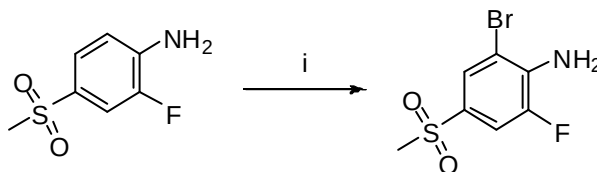
5 **(Int. 15)**



Una mezcla de 2-fluoropiridin-3-amina (44.6 mmol) y
10 KOAc (44.6 mmol) en AcOH se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió a 0 °C y se le añadió gota a gota C y Br₂ (44.6 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min. La mezcla se concentró y el residuo se disolvió en EtOAc/MeOH. La solución orgánica se lavó (NaHCO₃ sat., Na₂S₂O₃
15 sat.), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 80:20 éter de petróleo/EtOAc) para dar el producto deseado.

1.9. Síntesis de 2-bromo-6-fluoro-4-metanosulfonil-fenilamina

20 **(Int. 16).**

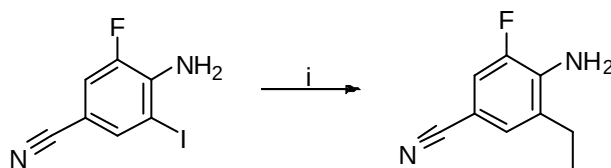


25 Una mezcla de 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina

(22.76 mmol) y KOAc (22.7 mmol) en AcOH se agitó a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió Br₂ (22.7 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó durante 30 min a 0 °C. La mezcla se concentró y el residuo se recolectó en EtOAc. La mezcla orgánica se lavó (NaHCO₃ sat., Na₂S₂O₃ sat.), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar el producto deseado.

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

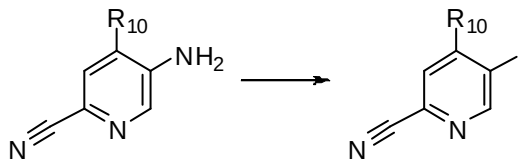
10



Una mezcla de Cs₂CO₃ (46 mmol) y Pd(dppf)Cl₂.DCM (0.76 mmol) se suspendió en DMF (35 ml) y se degasificó con nitrógeno. H₂O (400 l), 1 M de Et₃B en THF (11.5 ml) y una solución del Int. 4 (7.63 mmol) en DMF (5 ml) se añadieron a la mezcla y la reacción se agitó a 60 °C durante 30 min. La mezcla se concentró y el residuo se recolectó en EtOAc, se lavó (NaHCO₃ sat., H₂O), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 95:5 éter de petróleo/EtOAc) para dar el producto deseado.

25

1.11. Método general: conversión de NH_2 en yoduro



5

En donde R_{10} puede ser Me o Et.

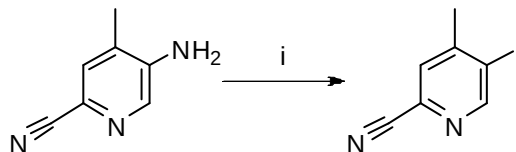
1.11.1. Método D

Se añadió gota a gota HCl Conc. (6 eq) a una mezcla del compuesto amino aromático/heteroaromático (1 eq) en H_2O a 0 °C. Una solución de NaNO_2 (1.05 eq) en H_2O se añade gota a gota. La mezcla resultante se agita a 0 °C durante 15 min. Se añade gota a gota una solución de KI (1.05 eq) en H_2O . La mezcla se agita a 0 °C durante 15 min y durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla se extrae con un disolvente orgánico. Después de un tratamiento acuoso y la eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo puede sufrir trituración o cromatografía para dar el producto deseado.

15

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

20

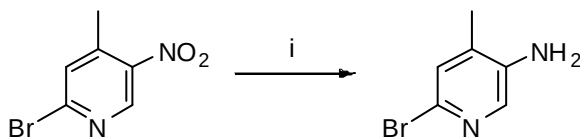


25

Se añadió HCl Conc. (0.9 ml) gota a gota a una mezcla del Int. 8 (1.88 mmol) en H_2O (10 ml) a 0 °C seguido

por la adición gota a gota de una solución de NaNO_2 (1.97 mmol) en H_2O (0.5 ml). La mezcla resultante se agitó a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. Se añadió gota a gota una solución de KI (1.97 mmol) en H_2O (1 ml). La mezcla resultante se agitó a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min y durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó (H_2O), se secó y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2 , 100:0 a 75:25 de ciclohexano/EtOAc) para dar el producto deseado.

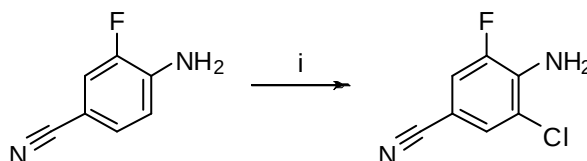
1.12. Síntesis de 6-bromo-4-metil-piridin-3-ilamina (Int. 20)



Una mezcla de NH_4Cl (14.9 mmol) y polvo de hierro (18.4 mmol) en H_2O (5 ml) se agitó a $90\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadió 2-bromo-4-metil-5-nitropiridina (2.3 mmol) en porciones. La mezcla se agitó a $90\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h y 15 min. La reacción se detuvo y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar el producto deseado.

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

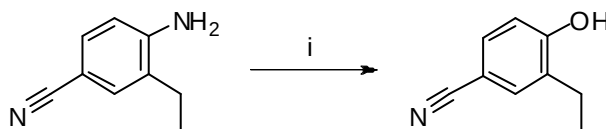
5



Una mezcla de 4-amino-3-fluorobenzonitrilo (184 mmol) y NCS (276 mmol) en AcOH (300 ml) se agitó a 70 °C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se concentró. Se añadió H₂O al residuo y el producto sólido se separó por filtración y se lavó (NaHCO₃ sat. y H₂O). Para eliminar H₂O, se añadió THF y se eliminó bajo presión reducida para dar el producto deseado.

1.14. Síntesis de 3-etil-4-hidroxi-benzonitrilo (Int. 22)

15

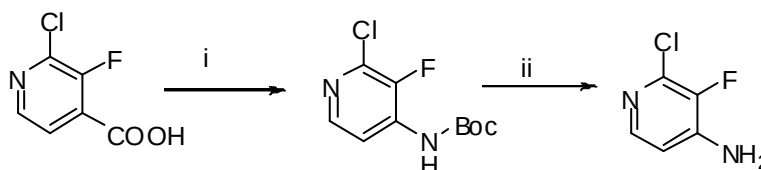


Se añadió H₂SO₄ concentrado (3.4 ml) gota a gota a una solución de 4-amino-3-etilbenzonitrilo (6.84 mmol) en H₂O (12 ml) a 0 °C. Una solución de NaNO₂ (7.52 mmol) en H₂O (5 ml) se añadió gota a gota a 0 °C a la mezcla resultante. La reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y a 100 °C durante 2 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó (H₂O), se secó y se

concentró para dar el producto deseado.

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

5



1.15.1. Paso i: carbamato de terbutilo N-(2-cloro-3-fluoro-4-piridil)

10

Se añadió difenilfosforil azida (DPPA) (129 mmol) a una mezcla de ácido 2-cloro-3-fluoro-piridina-4-carboxílico (85.7 mmol), Et₃N (257 mmol) en 1:1 de terBuOH/tolueno (200 ml). La mezcla se calentó a 110 °C durante 4 h. La mezcla se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 80:20 de DCM/EtOAc) para dar el producto N-(2-cloro-3-fluoro-4-piridil)carbamato de terbutilo deseado.

15

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

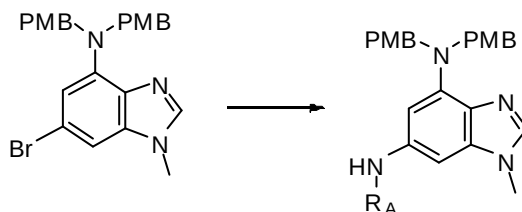
20

Una solución de terbutilo N-(2-cloro-3-fluoro-4-piridil)carbamato (20.2 mmol) en 1:2 de TFA/DCM (45 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 90:10 de DCM/7 N de NH₃ en MeOH) para dar el producto deseado.

25

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

5



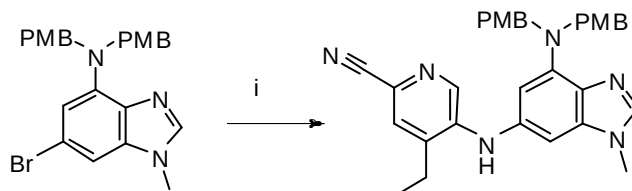
En la que R_A puede ser arilo o heteroarilo sustituido en forma opcional.

10 1.16.1. Método E1

Una mezcla del Int. 2 (1 eq), la anilina correspondiente (1.1 eq), Cs_2CO_3 (2 eq) y XPhos (0.3 eq) en tolueno seco se purga con un gas inerte antes de que se añadiera $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.1 a 0.15 eq). La mezcla se agitó a 15 110 °C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa, la mezcla de reacción se puede filtrar y concentrar. El residuo se puede mantener sin modificaciones 20 o purificarse por medio de cromatografía para dar el producto deseado.

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

5



Una mezcla del Int. 2 (0.75 mmol), Int. 10
10 (0.79 mmol), Cs₂CO₃ (1.5 mmol) y XPhos (0.225 mmol) en tolueno seco (6.3 ml) se purgó con argón antes de que se añadiera Pd(OAc)₂ (0.075 mmol). La mezcla se agitó a 110 °C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó (salmuera), se secó
15 (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 50:50 de ciclohexano/EtOAc) para dar el producto deseado.

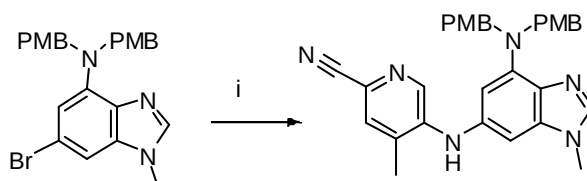
1.16.3. Método E2

Una mezcla del Int. 2 (1 eq), la anilina
20 correspondiente (1.1 eq), Cs₂CO₃ (4 a 5 eq) y XPhos (0.4 eq) en tolueno seco se purgó con un gas inerte antes de que se añadiera Pd(OAc)₂ (0.2 a 0.3 eq). La mezcla se agitó a 110 °C durante un período que osciló entre 1 h y 24 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las
25 dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se

concentró. En forma alternativa, la mezcla de reacción se puede filtrar y concentrar. El residuo se puede mantener sin modificaciones o purificarse por medio de cromatografía para dar el producto deseado.

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

10



Una mezcla del Int. 2 (4 mmol), Int. 8 (4.3 mmol), Cs_2CO_3 (20 mmol) y XPhos (1.6 mmol) en tolueno seco (35 ml) se purgó con argón durante 10 min antes de que se añadiera $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (1.2 mmol). La mezcla se agitó a 110 °C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2 , 15 98:2 a 25:75 de ciclohexano/ EtOAc) para dar el producto deseado.

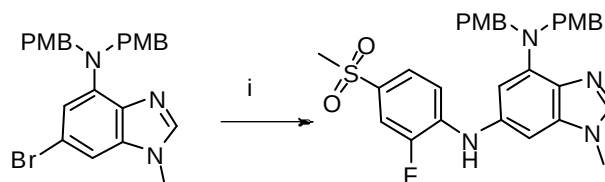
20 1.16.5. *Método E3*

Una mezcla del Int. 2 (1 eq), anilina (1.1 eq), BINAP (0.3 eq), Cs_2CO_3 (4 eq) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.2 eq) en 1,4-dioxano seco se desgasifica con un gas inerte.

25

La reacción se agitó durante un período que osciló entre 4 h y aproximadamente 16 h a 100 a 110 °C. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa, la mezcla de reacción se puede filtrar y concentrar. El residuo se puede mantener sin modificaciones o se puede purificar por medio de cromatografía para dar el producto deseado.

1.16.6. *Ejemplo ilustrativo del método E3: síntesis de N6-(2-Fluoro-4-metanosulfonyl-fenil)-N4,N4-bis-(4-metoxibencil)-1-metil-1H-benzoimidazol-4,6-diamina (Int. 34).*



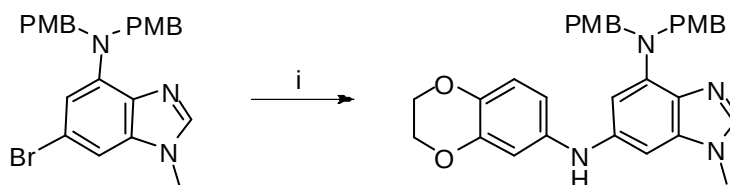
Una mezcla del Int. 2 (1.48 mmol), 2-fluoro-4-metilsulfonyl-anilina (1.58 mmol), BINAP (0.47 mmol), Cs₂CO₃ (6.32 mmol) y Pd(OAc)₂ (0.32 mmol) en seco 1,4-dioxano (15 ml) se desgasificó con nitrógeno. La reacción se agitó a 100 °C durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó (H₂O), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar el producto deseado.

1.16.7. Método E4

Una mezcla del Int. 2 (1 eq), anilina (1.1 eq), Brettphos (0.1 eq), Cs_2CO_3 (5 eq) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.05 eq) en 1,4-dioxano seco se desgasifica con un gas inerte.

5 La reacción se agitó durante un período de entre 2 h y aproximadamente 8 horas a 85 a 95 °C. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa, la mezcla de reacción se puede filtrar y concentrar. El residuo se puede mantener sin modificaciones o se puede purificar por medio de cromatografía para dar el producto deseado.

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



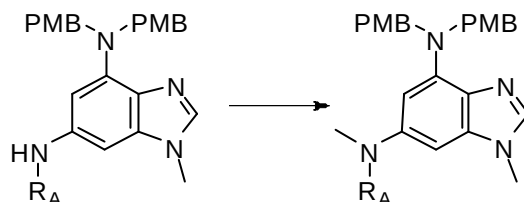
20

Una mezcla del Int. 2 (1.17 mmol), 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-amina (1.29 mmol), Brettphos (0.117 mmol), Cs_2CO_3 (6.32 mmol) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.058 mmol) en 1,4-dioxano seco (15 ml) se desgasificó con nitrógeno. La reacción se agitó a 25 90 °C durante aproximadamente 5 h. La mezcla se diluyó con

EtOAc y la capa orgánica se lavó (H₂O), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar el producto deseado.

1.17. *Método general: metilación del producto Buchwald*

5



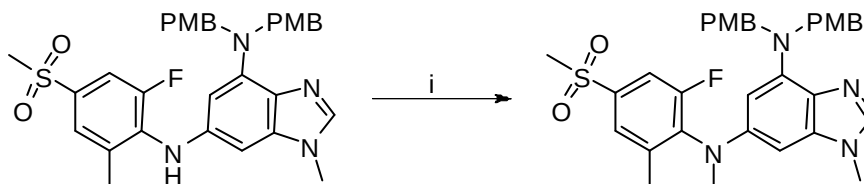
En la que R_A puede ser arilo o heteroarilo
10 sustituido en forma opcional.

1.17.1. *Método F*

Se añadió NaH (60% en aceite mineral, 1.1 a 3 eq) a una solución del producto intermedio obtenido a partir del acoplamiento de Buchwald (1 eq) en THF o DMF a 0 °C.
15 La mezcla se agita a 0 °C durante 30 min. Se añadió MeI (1.1 a 3 eq) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante un período que oscila entre 1 h y aproximadamente 16 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó
20 y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía sobre sílice o se utilizó como tal sin purificación adicional.

1.17.2. *Ejemplo ilustrativo del método F: síntesis de*
N6-(2-Fluoro-4-metanosulfonil-6-metil-fenil)-N4,N4-bis-(4-
25 *metoxi-bencil)-1,N6-dimetil-1H-benzoimidazol-4,6-diamina*

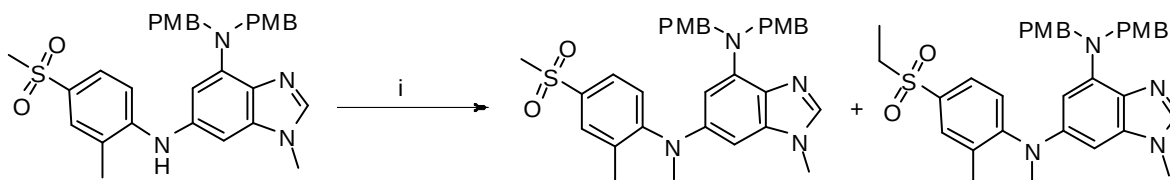
(Int. 37).



5

NaH (60% en aceite mineral, 6.76 mmol) se añadió a una solución del Int. 35 (2.25 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. Se añadió MeI (6.76 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con H₂O. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 20:80 a 80:20 EtOAc/éter de petróleo) para dar el producto deseado.

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

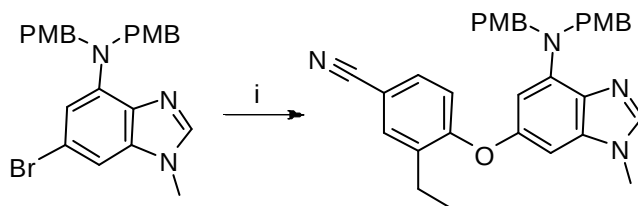


25

NaH (60% en aceite mineral, 4.86 mmol) se añadió a

una solución del Int. 36 (1.62 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. Se añadió MeI (4.86 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con H₂O. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 20:80 a 80:20 de EtOAc/éter de petróleo) dio una mezcla del producto deseado (Int. 49A, producto principal) junto con un producto secundario (Int. 49B, producto minoritario).

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

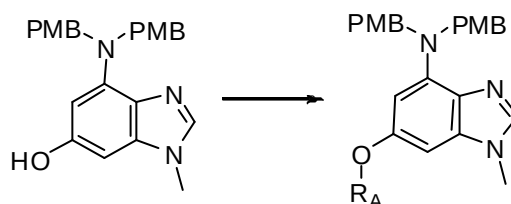


Una mezcla del Int. 2 (0.4 mmol), Int. 22 (0.4 mmol), CuI (0.06 mmol) y Cs₂CO₃ (1 mmol) en piridina (2 ml) se purgó con argón, sellado y se calentó en un reactor de microondas durante 3 h en 200 °C. La mezcla se diluyó con H₂O y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó y se concentró para dar el producto deseado.

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

aromáticos o heteroaromáticos

5



En la que R_A puede ser arilo o heteroarilo sustituido en forma opcional.

1.19.1. Método G

10

Una mezcla del Int. 3 (1 eq), el haluro de arilo (1.2 a 1.3 eq), CuI (0.1 a 0.2 eq), N,N-dimetil glicina (0.3 a 0.5 eq) y Cs_2CO_3 (3 eq) en 1:1 DMF/1,4-dioxano se purga con un gas inerte y se agitó a 110 °C durante un período que osciló entre 4.5 h y 16 h. La mezcla se filtra, se repartió

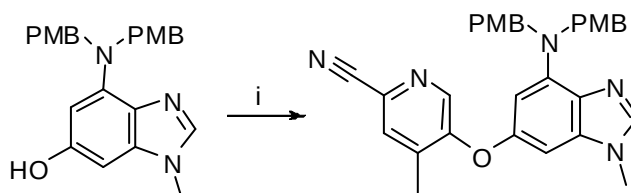
15

entre un disolvente orgánico y una fase acuosa. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purifica por medio de cromatografía de sílice.

1.19.2. Ejemplo ilustrativo del método G: síntesis de 5-{7-[bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-

20

iloxi}-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int. 51).

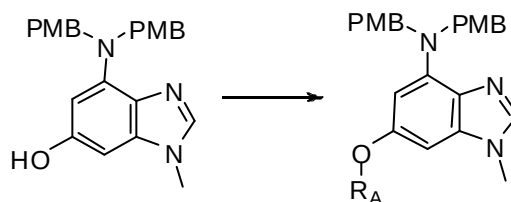


25

Una mezcla del Int. 3 (0.39 mmol), Int. 18

(0.47 mmol), CuI (0.08 mmol), N,N-dimetil glicina (0.2 mmol) y Cs₂CO₃ (1.17 mmol) en 1:1 DMF/1,4 dioxano (4 ml) se purgó con argón y se agitó a 110 °C durante aproximadamente 16 h en un tubo sellado. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 40:60 de ciclohexano/EtOAc) para dar el producto deseado.

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



En la que R_A puede ser arilo o heteroarilo sustituido en forma opcional.

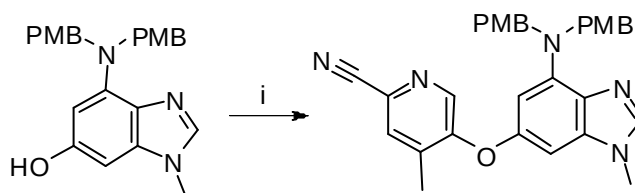
1.20.1. *Método H*

Una mezcla del Int. 3 (1 eq), el haluro de arilo/heteroarilo (de 1.2 a 1.5 eq) y K₂CO₃ (2 eq) en DMF se agita a 100 °C durante un período que osciló entre 3 h y aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó

varias veces con H₂O, se secó y se concentró. El residuo se purifica por medio de cromatografía en columna ultrarrápida.

1.20.2. *Ejemplo ilustrativo del método H: síntesis de 5-{7-[bis-(4-metoxi-bencil)-amino]-3-metil-3H-benzoimidazol-5-*

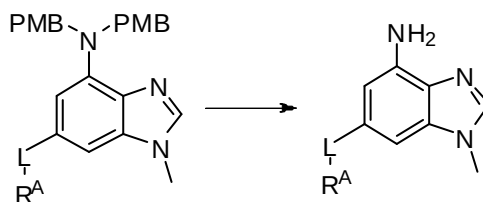
5 *iloxi}-4-metil-piridin-2-carbonitrilo (Int. 51).*



10 Una mezcla del Int. 3 (58 mmol), Int. 7 (70 mmol) y K₂CO₃ (116 mmol) en DMF (160 ml) se agitó a 100 °C. Después de 3 h más 7.35 mmol del Int. 7 se añadieron a la reacción y la mezcla se agitó durante 1 h a 100 °C. La mezcla resultante se diluyó con EtOAc, se lavó varias veces con H₂O, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 15:85 a 35:75 EtOAc/éter de petróleo) para dar el producto deseado.

1.21. *Método general: bis-PMB desprotección*

20



25

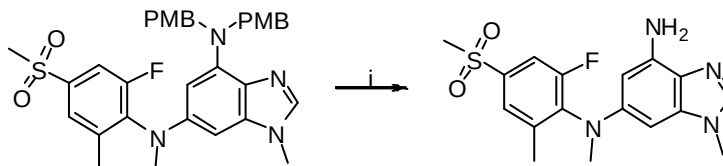
En la que R_A puede ser arilo o heteroarilo

sustituido en forma opcional; y -L- pueden ser: -NH-, -NMe- o -O-.

1.21.1. **Método I1**

Una mezcla de amina protegida bis-PMB (1 eq) en TFA
5 se agita a temperatura ambiente durante un período de entre
30 min a aproximadamente 16 h. La temperatura se aumentó a 50
o 60 °C y la mezcla se agitó en forma adicional durante un
periodo que osciló entre 0.5 y 3 h. La mezcla se somete a un
diagnóstico por el uso de una solución acuosa básica y un
10 disolvente orgánico. Las dos fases se separaron y la capa
orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa,
la mezcla de reacción primero se puede concentrar y después
el residuo se somete al diagnóstico descrito con
anterioridad. El residuo obtenido a partir del diagnóstico se
15 puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice o por
medio de resina de intercambio iónico ISOLUTE® SCX-3
(Biotage) o se mantiene sin modificaciones.

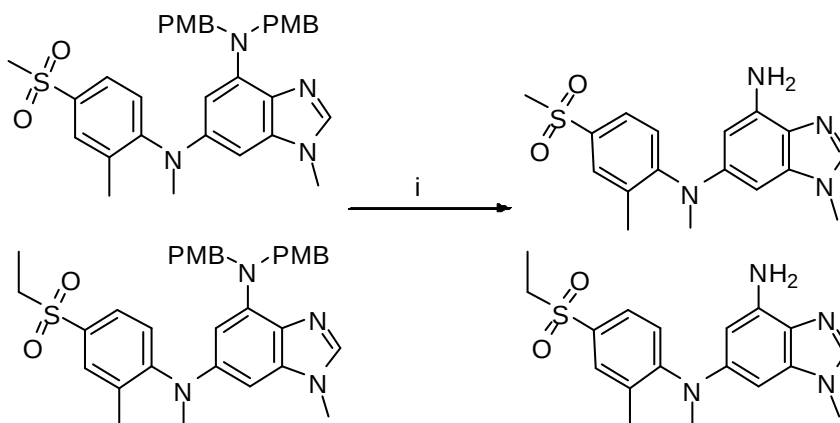
1.21.2. *Ejemplo ilustrativo del método I1: síntesis de N6-*
(2-fluoro-4-metanosulfonil-6-metil-fenil)-1,N6-dimetil-1H-
20 *benzoimidazol-4,6-diamina (Int. 53).*



Una mezcla del Int. 37 (0.33 mmol) en TFA (5 ml) se
25 agitó a temperatura ambiente durante 1 h y a 50 °C durante

0.5 h. la mezcla se concentró. El residuo se repartió entre NaHCO₃ sat. y DCM. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 20:80 a 100:0 EtOAc/éter de petróleo) para dar el producto deseado.

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



Una mezcla del Int. 49A y 49B (ca 0.61 mmol en total) en TFA (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h y a 50 °C durante 3 h. La mezcla se concentró. El residuo se repartió entre NaHCO₃ sat. y DCM. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Una cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 20:80 a 100:0 EtOAc/éter de petróleo) dio una mezcla

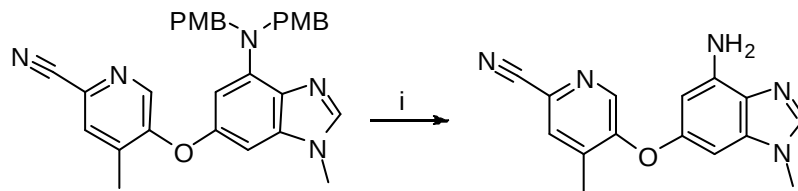
del producto deseado (Int. 56A, producto principal) junto con un producto secundario (Int. 56B, producto minoritario) derivado de la desprotección del Int. 49B.

1.21.4. Método I2

5 Una mezcla de amina protegida bis-PMB (1 eq) en DCM/TFA (3:1 a 1:1) se agita a temperatura ambiente durante un período de entre 20 min a 3 h. La mezcla se somete a un tratamiento por el uso de una solución acuosa básica y un disolvente orgánico. Las dos fases se separaron y la capa
10 orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa, la mezcla de reacción primero se puede concentrar y después el residuo se somete al diagnóstico descrito con anterioridad. El residuo obtenido a partir del diagnóstico se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice o por
15 medio de resina de intercambio iónico ISOLUTE® SCX-3 (Biotage) o se mantiene sin modificaciones.

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

20



25

Se añadió TFA (55 ml) a una solución del Int. 51 (23.1 mmol) en DCM (55 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadió tolueno y la mezcla se concentró. El residuo se repartió entre DCM y NaHCO₃ sat. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 95:5 de EtOAc/MeOH). El producto obtenido de la columna se lavó con THF para dar el producto deseado (Int 79).

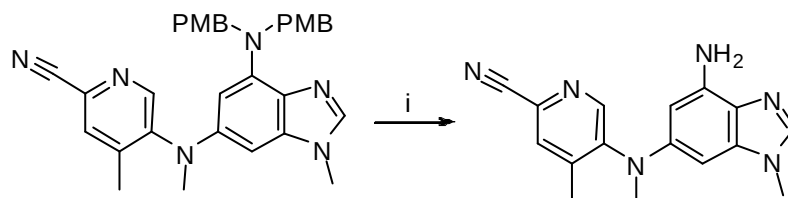
1.21.6. Método I3

Una mezcla de amina protegida bis-PMB (1 eq) en TFA se agita a temperatura ambiente durante un período de entre 30 min a aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó en un disolvente orgánico y se lavó por el uso de una solución acuosa básica. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa, antes del lavado, la mezcla de reacción se puede concentrar primero. La capa orgánica se concentró, y el residuo se puede purificar ya sea por medio de cromatografía sobre sílice o por medio de resina de intercambio de iones ISOLUTE® SCX-3 (Biotage) o se utiliza como tal sin purificación adicional.

1.21.7. Ejemplo ilustrativo del método I3: síntesis de 5-[(7-amino-3-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-metil-amino]-

4-metil-piridina-2-carbonitrilo (Int. 62).

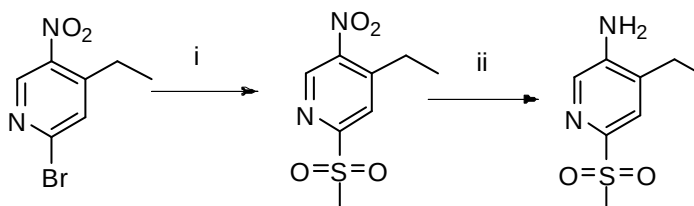
5



Una solución del Int. 41 (2.4 mmol) en TFA (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó con NaHCO₃ sat. y después con NaOH 5 N. Las dos capas se separaron y la capa acuosa se extrajo en forma adicional con DCM. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (filtración a través de separador de fases) y se concentraron. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 90:10 de EtOAc/MeOH) para dar el producto deseado.

15 1.22. Síntesis de 4-etil-6-metanosulfonil-piridin-3-ilamina (Int. 70).

20



1.22.1. Paso i: 4-etil-2-metilsulfonil-5-nitro-piridina

Una mezcla de 2-bromo-4-etil-5-nitro-piridina (4.35 mmol) y metanosulfonato de sodio (4.35 mmol) en DMSO (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h.

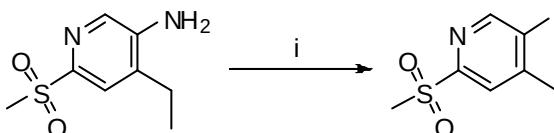
25 La mezcla se vertió en agua con hielo y se agitó hasta que el

hielo se había derretido. La mezcla se filtró y el sólido (el producto deseado) se recolectó.

1.22.2. *Paso ii: 4-etil-6-metilsulfonil-piridin-3-amina*

Una mezcla de 4-etil-2-metilsulfonil-5-nitro-
5 piridina (4.1 mmol), NH_4Cl (26.65 mmol) y polvo de hierro (33 mmol) en H_2O (10 ml) se agitó a 90°C durante 1 h. La reacción se detuvo, se filtró y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar el producto deseado.

10 1.23. *Síntesis de 4-etil-5-yodo-2-metilsulfonil-piridina (Int. 74).*



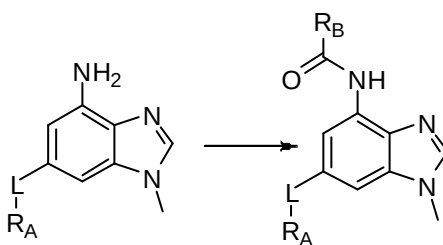
15

Se añadió una solución de KI (15 mmol) y NaNO_2 (12 mmol) en H_2O (1.8 ml) gota a gota a una mezcla del Int. 70 (6 mmol) y p-TsOH $\cdot$ H_2O (18 mmol) en MeCN (12 ml)
20 manteniendo la temperatura a 10 a 15°C . La mezcla se agitó durante 10 min a una temperatura de 10 a 15°C y después a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió a 0°C , se neutralizó (NaHCO_3 sat.) y se extrajo (DCM). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se
25 purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida

(SiO₂, 70:30 éter de petróleo/EtOAc) para dar el producto deseado.

Ejemplo 2. Síntesis de los compuestos de la invención

2.1 Método general: acilación de la amina intermedia
5 con un derivado de cloruro de carbonilo para obtener un compuesto final



En la que R_A se puede sustituir en forma opcional con arilo o heteroarilo; L puede ser NH, NMe u O; y R_B puede ser cicloalquilo, OMe.

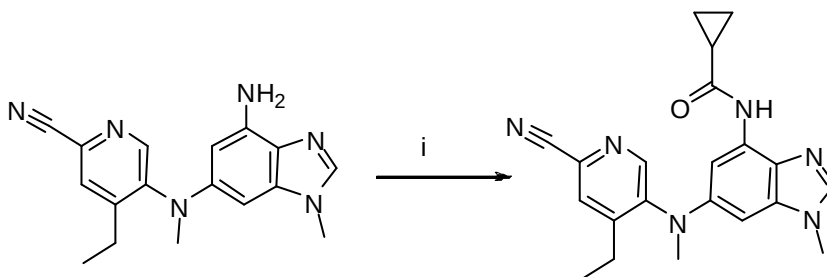
2.1.1.1. Método J1

R_BCOCl (1 eq) se añadió a una solución de la amina intermedia (1 eq) en DCM/piridina (de proporción 2:1 a 5:1) a 0 °C. La mezcla se agita durante un período de entre 40 min a 2 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una
20 solución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró. En forma alternativa, la mezcla de reacción se puede concentrar sin someterse a un diagnóstico. El residuo se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice o por medio de HPLC preparativa o
25 por medio de precipitación por el uso de la mezcla de

disolvente apropiada.

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

5



10

Se añadió cloruro de ciclopropanocarbonilo (0.39 mmol) a una solución del Int. 63 (0.39 mmol) en 1:2 piridina/DCM (2.55 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 97:3 de DCM/MeOH) para proporcionar el producto deseado.

15

2.1.3. Método J2

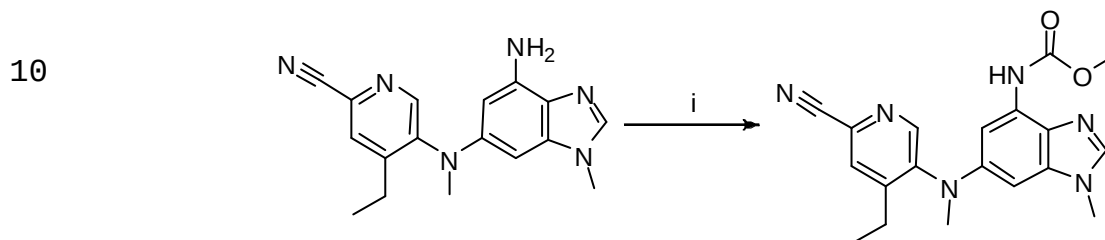
20

R_BC(=O)Cl (1.5 a 3 eq) se añadió a una solución de la amina intermedia (1 eq) en DCM seguido por piridina (1.5 a 3 eq). La mezcla se agita durante un período de entre 2 h a aproximadamente 16 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una solución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró.

25

El residuo se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice, por medio de HPLC preparativa o por medio de precipitación por el uso de la mezcla de disolvente apropiada.

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



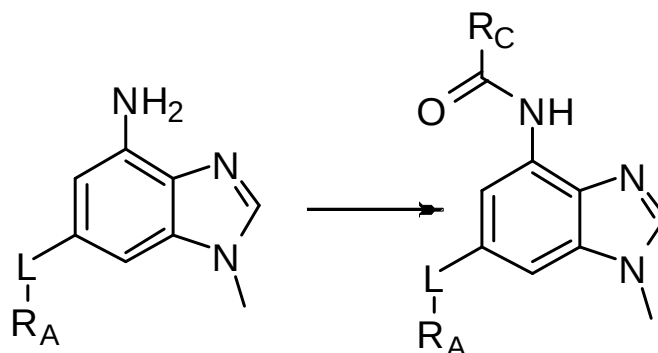
15 Se añadió cloroformiato de metilo (0.33 mmol) a una solución del Int. 63 (0.22 mmol) en DCM seco (2.2 ml) seguido por piridina (0.33 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se repartió entre H₂O y DCM. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó (NaHCO₃

20 sat.), se secó (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 100:0 a 95:5 DCM/MeOH) para dar el producto deseado.

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

25 *compuesto final*

5



En la que R_a puede ser arilo o heteroarilo sustituido en forma opcional; L puede ser: NH, NMe u O; y R_C puede ser: cicloalquilo, cicloalquilo sustituido.

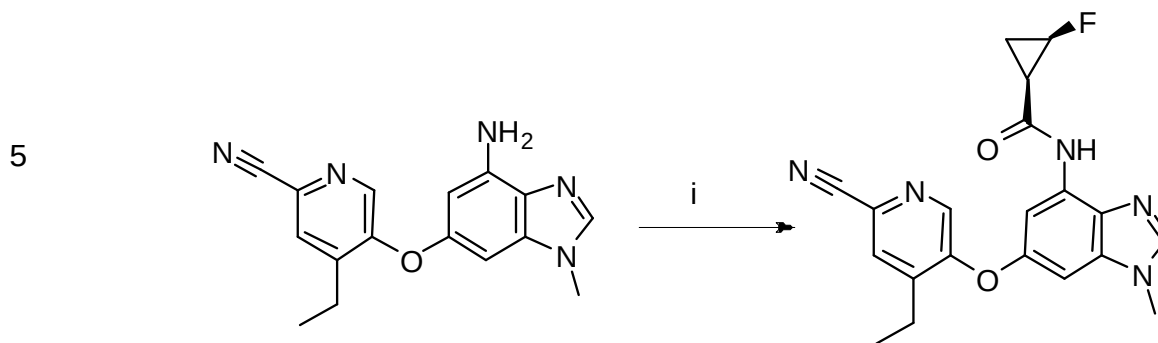
10 2.1.1. Método K1

Se añade (COCl)₂ (1.4 a 2 eq) a una solución del ácido carboxílico (de 1.5 a 2 eq) en DCM a 0 °C. Se añade una cantidad catalítica de DMF y la reacción se agitó a 0 °C durante un período que osciló entre 30 min y 1 h.

15 Una solución del intermedio de amina (1 eq) y piridina (2 a 4 eq) en DCM se añade a la mezcla. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante un período de entre 30 min a 2 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una solución acuosa. Las dos fases se separaron y
20 la capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice, por medio de HPLC preparativa o por medio de precipitación por el uso de la mezcla de disolvente apropiada.

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

bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida (Comp. 6).

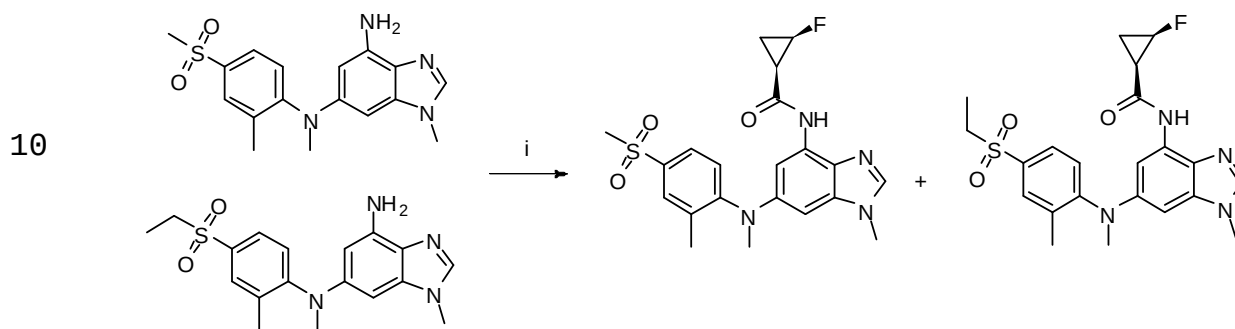


Se añadió $(\text{COCl})_2$ (0.186 mmol) a una solución de
10 ácido ((1R,2R)-(-)-cis-2-fluoro-ciclopropanocarboxílico
(ChemCollect, lote Núm. 1,241,399, 0.186 mmol) en DCM (1 ml)
seguido por DMF (2 gotas). La mezcla de reacción se dejó en
agitación a 0 °C durante 1 h. Una solución del Int. 65
(0.093 mmol) y piridina (0.186 mmol) en DCM (1 ml) se añadió
15 a la mezcla y la reacción se agitó durante 2 h a temperatura
ambiente. Se añadió NaHCO_3 sat. y las dos fases se separaron.
La capa orgánica se concentró. El residuo se purificó por
medio de cromatografía en columna ultrarrápida (SiO_2 , 100:0 a
95:5 DCM/MeOH) para dar el producto deseado.

20

25

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



Se añadió (COCl)₂ (0.82 mmol) a una solución de
ácido ((1R,2R)-(-)-cis-2-fluoro-ciclopropanocarboxílico
(ABCR, lote Núm. 1,242,863, 0.92 mmol) en DCM (1 ml) seguido
por DMF (1 gota). La mezcla de reacción se dejó en agitación
a 0 °C durante 45 min. Una solución de una mezcla del Int.
20 56A y el Int. 56B (aproximadamente 0.46 mmol en total) y
piridina (1.85 mmol) en DCM (1 ml) se añadió a la mezcla y la
reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente.
La mezcla se diluyó con DCM, se lavó (H₂O) y las dos fases se
separaron. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró.
25 La cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 20:80

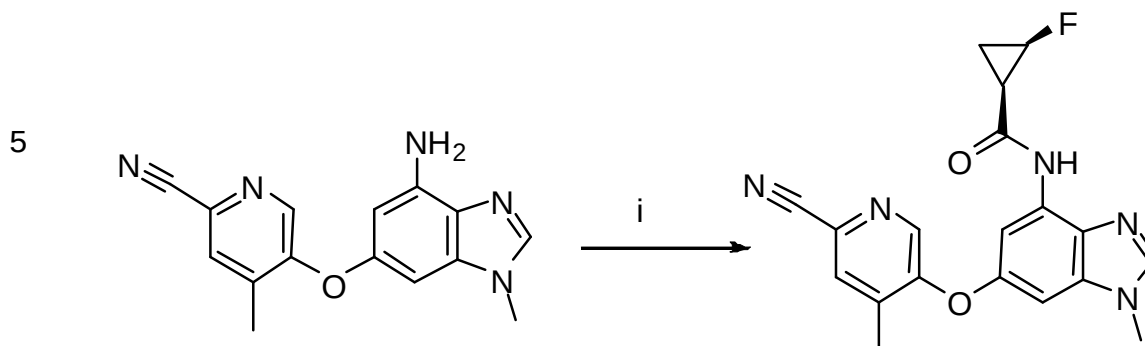
EtOAc/éter de petróleo a 90:10 EtOAc/MeOH) dio una mezcla del Compuesto 26 y el Compuesto 27. Los dos componentes se separaron por medio de HPLC preparativa. HPLC.

2.2.4. Método K2

5 Se añadió $(\text{COCl})_2$ (1.35 a 2.5 eq) a una solución del ácido carboxílico (1.4 a 3 eq) en DCM a 0 °C. Se añade una cantidad catalítica de DMF y la reacción se agitó a 0 °C durante un período que osciló entre 30 min y 1 h. Una solución del intermediario de amina (1 eq) y piridina (1.7 a
10 4 eq) en NMP o NMP/DCM se prepara por separado asegurándose de que el intermediario de amina se disuelva por completo. Para ayudar a la disolución, se puede aplicar calefacción (temperaturas de hasta 70 °C). Se añade la última solución gota a gota a la solución que contiene el cloruro de acilo
15 recién formado a 0 °C. La mezcla resultante se deja en agitación a temperatura ambiente durante un período comprendido entre 1 y 2 h. La mezcla se repartió entre un disolvente orgánico y una solución acuosa. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se secó y se concentró.
20 El residuo se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice, por medio de HPLC preparativa o por medio de precipitación por el uso de la mezcla de disolvente apropiada.

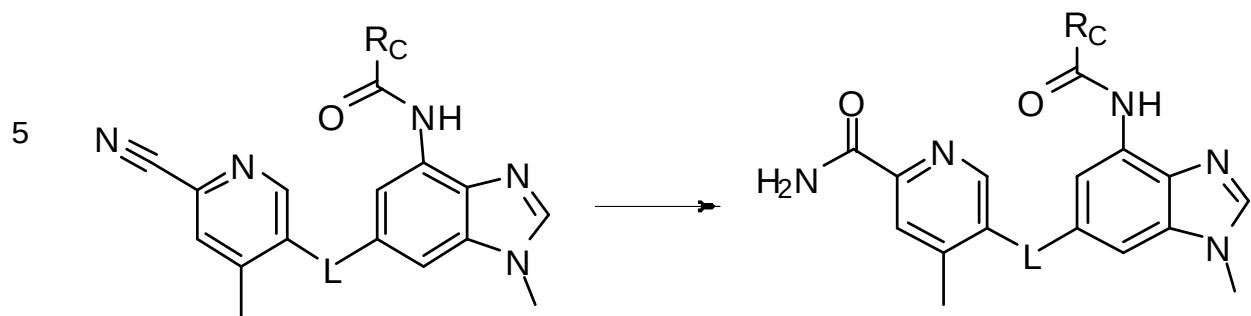
2.2.5. Ejemplo ilustrativo del método K2: síntesis de
25 (1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-

bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida (Comp. 20).



Se añadió $(\text{COCl})_2$ (16.6 mmol) a una solución de
10 ácido ((1R,2R)-(-)-cis-2-fluoro-ciclopropanocarboxílico
(ABCR, lote Núm. 1,242,863, 17.5 mmol) en DCM (70 ml) seguido
por DMF (200 μl). La mezcla de reacción se dejó en agitación
a 0 °C durante 45 min. Una solución del compuesto 28
(12.5 mmol) y piridina (21.3 mmol) en NMP (15 ml) se calentó
15 a 65 °C, para ayudar a la disolución, y dejar que se enfríe a
temperatura ambiente. La solución que contiene el Compuesto
28 y piridina se añadió a la mezcla que contiene el derivado
carboxílico activado a 0 °C y la reacción se agitó durante
45 min a temperatura ambiente. La mezcla se repartió entre
20 EtOAc y NaHCO_3 sat. Las dos fases se separaron y la capa
orgánica se lavó de nuevo (NaHCO_3 sat., NH_4Cl , H_2O), se secó
(Na_2SO_4) y se concentró. El producto bruto se purificó por
precipitación a partir de DCM/ $i\text{PrOH}$ y el sólido resultante se
lavó con Et_2O y se secó bajo vacío para proporcionar el
25 producto deseado.

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



10 Donde L es NH, NMe u O; R_C es cicloalquilo, cicloalquilo sustituido; Z es N o CH; y R¹⁰ es Me o Et.

2.3.1. Método L

Una solución del material de partida de nitrilo (1 eq) se disuelve en una mezcla 4:1 de EtOH/DMSO.

15 La solución orgánica resultante se mezcla con 30% de H₂O₂/H₂O y NaOH 1 N, con las siguientes proporciones 10:2:1 solución orgánica/H₂O₂/NaOH 1N. La mezcla se agita a 50 °C durante 1 h. La mezcla se reparte entre un disolvente orgánico y una solución acuosa. Las dos fases se separan y la capa orgánica

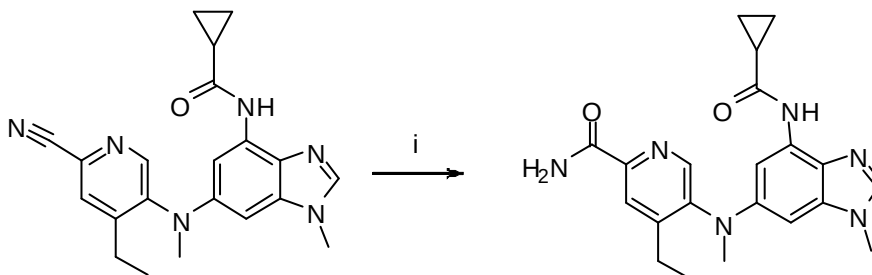
20 se seca y se concentra. El residuo se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice, por medio de HPLC preparativa o por medio de precipitación por el uso de la mezcla de disolvente apropiada.

2.3.2. Ejemplo ilustrativo del método L: síntesis de

25 5-((4-(ciclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-

6-il)(metil)amino)-4-etilpicolinamida (Comp. 24).

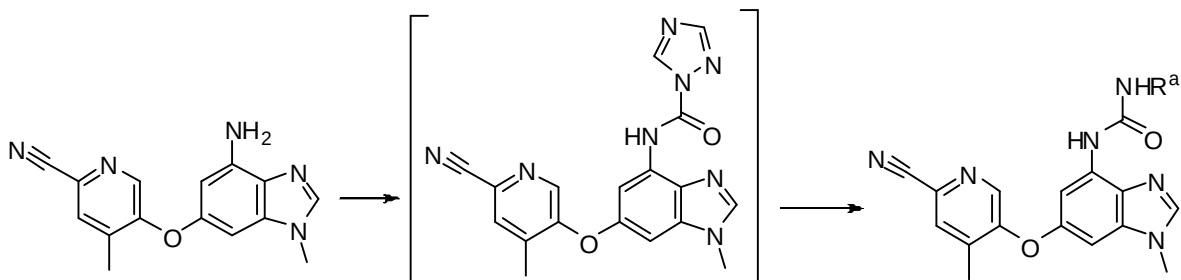
5



Una solución del compuesto 1 (0.19 mmol) se disolvió en una mezcla 4:1 de EtOH/DMSO (2.3 ml). La solución orgánica resultante se mezcló con 30% de H₂O₂/H₂O (0.4 ml) y NaOH 1 N (0.23 ml). La mezcla se agitó a 50 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se filtró a través de un separador de fases y se concentró. El residuo se purificó por medio de HPLC preparativa para dar el producto deseado.

2.3.3. Método M: Método general de síntesis de urea

20



Se añade carbonilditriazol (1.5 eq.) a una mezcla del Comp. 28 (1.0 eq.) y piridina (5 eq;) en DCM. La mezcla

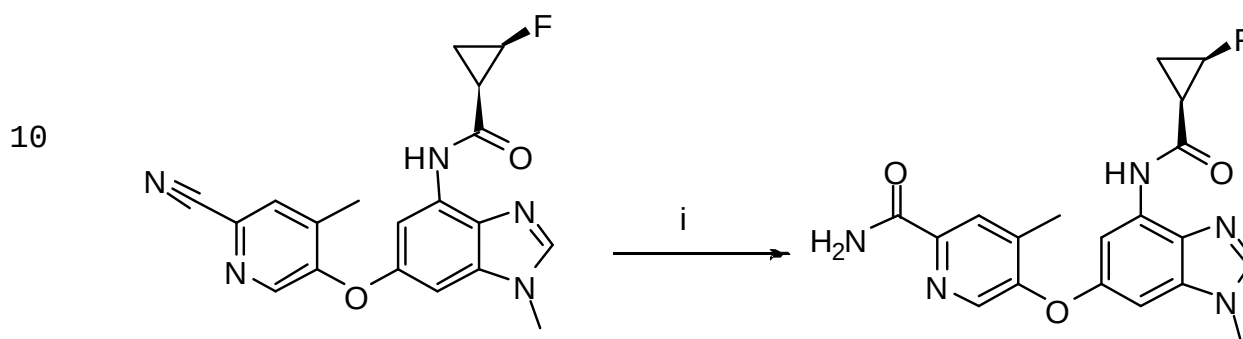
se agita a continuación a 50 °C durante 1 h. Sin ningún tratamiento adicional, la R^aNH₂ de amina requerida se añade a la solución a 50 °C y se deja en agitación durante otra 1 h. Después de la terminación de la reacción por UPLC, la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se diluye con DCM, y la mezcla se divide a continuación en agua. Las dos fases se separan y la capa orgánica se lava con solución de HCl 0.25 M, solución de bicarbonato de sodio, se seca y se concentra. El residuo se puede purificar por medio de cromatografía sobre sílice, por medio de HPLC preparativa o por medio de precipitación por el uso de la mezcla de disolvente apropiada

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

Se añadió carbonilditriazol (1.07 mmol) a una mezcla del Comp. 28 (0.71 mmol) y piridina (3.55 mmol) en DCM (3 ml) y la mezcla resultante se agitó a 50 °C. Se formó un precipitado después de 2 min y la mezcla se agitó en forma adicional durante 1 h. Después se añadió metilamina (solución 2 M en THF) (2.84 mmol) a la solución a 50 °C y se dejó en agitación durante otra 1 h. Después de la terminación de la reacción por UPLC, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con DCM y se repartió en agua. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó

con solución de HCl 0.25 M, solución de bicarbonato de sodio, se secó y se concentró. El residuo se utilizó sin ninguna purificación adicional.

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



Una mezcla del Compuesto 20 (0.27 mmol) y DMSO (0.5 ml) en H₂O (pH 13, 10 ml) se agitó a 50 °C durante 72 h. La mezcla se filtró. El sólido se recolectó y se purificó por medio de HPLC preparativa para dar el producto deseado.

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

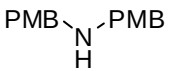
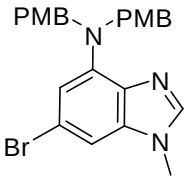
NaH se añadió a una mezcla del Comp. 28 (0.36 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. Después de 30 min, se añadió MeI (0.36 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a

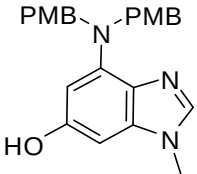
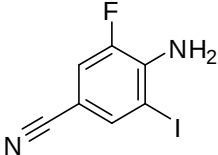
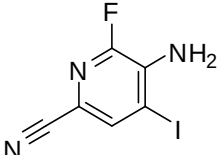
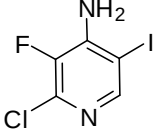
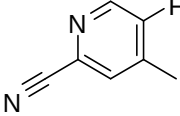
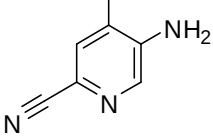
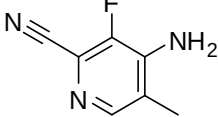
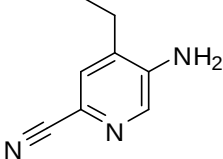
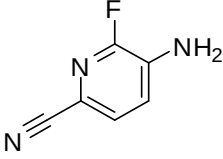
25

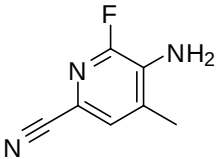
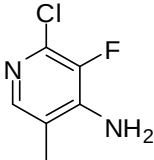
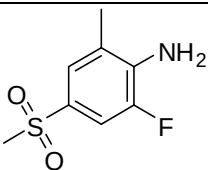
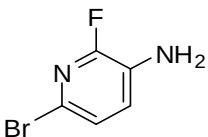
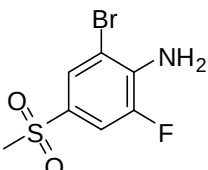
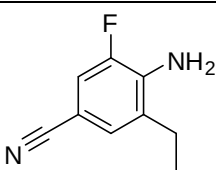
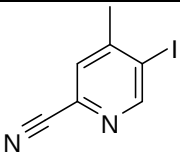
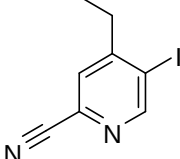
temperatura ambiente y se agitó hasta su finalización. Después de la terminación supervisada por UPLC, la reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. El Comp. 34 y el Comp. 35 se aislaron por medio de HPLC preparativa.

Los compuestos ilustrativos de la invención enumerados en la Tabla III a continuación y los ejemplos comparativos se han preparado de acuerdo con los métodos sintéticos descritos en esta descripción por el uso de los intermediarios enumerados en el la Tabla II. Los datos espectrales de RMN de los compuestos de la invención y algunos de los ejemplos comparativos se presentan en la Tabla IV.

Tabla II: Intermediarios ilustrativos hacia los compuestos de la invención

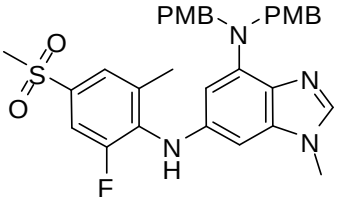
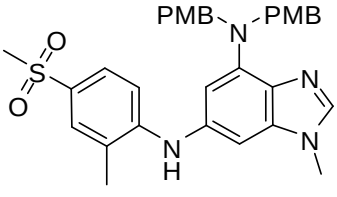
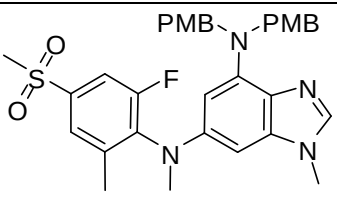
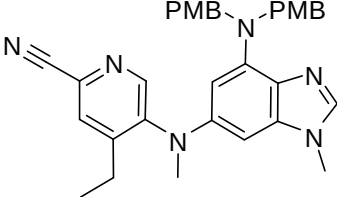
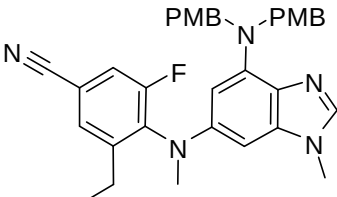
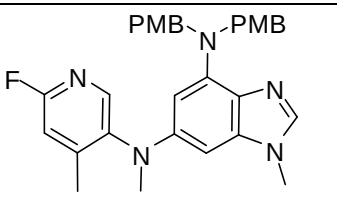
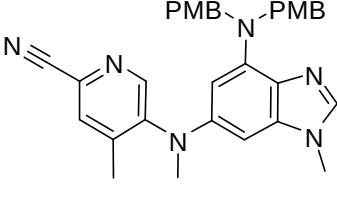
Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
1		4-metoxi bencilamina	Dsc'd	257.3	258.1 (M+1)
2		Int. 1 + 5-bromo- 3-fluoro-N-metil- 2-nitro-anilina	Dsc'd-	466.4	465.9/467.9 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
3		Int. 2	Dsc'd-	403.5	404.4 (M+1)
4		4-amino-3-fluoro-benzonitrilo	A1	262.0	261.5 (M-1)
5		Int. 11	A2	263.0	263.9 (M+1)
6		Int. 23	A1	272.4	272.8 (M+1)
7		2-cloro-5-fluoro-4-metil-piridina	B	136.1	137.1 (M+1)
8		Int. 20	B	133.2	134.1 (M+1)
9		Int. 13	B	151.1	152.0 (M+1)
10		6-bromo-4-etil-piridin-3-amina	B	147.2	148.0 (M+1)
11		Int. 15	B	137.1	138.0 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
12		Int. 5	C	151.1	152.0 (M+1)
13		Int. 6	C	160.6	161.0 (M+1)
14		Int. 16	C	203.2	204.0 (M+1)
15		2-fluoropiridin-3- amina	Dsc'd	191.0	190.9/192.9 (M+1)
16		2-fluoro-4- metilsulfonil- anilina	Dsc'd	268.1	267.0/268.9 (M+1)
17		Int. 4	Dsc'd	164.2	165.5 (M+1)
18		Int. 8	D	244.0	245.0 (M+1)
19		Int. 10	D	258.1	259.1 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
20		2-bromo-4-metil-5-nitro-piridina	Dsc'd	187.0	187.0/189.0 (M+1)
21		4-amino-3-fluoro-benzonitrilo	Dsc'd	170.6	La masa no puede ser detectada por diversos métodos
22		4-amino-3-etil-benzonitrilo	Dsc'd	147.2	146.1 (M-1)
23		Ácido 2-cloro-3-fluoro-piridina-4-carboxílico	Dsc'd	146.6	147.0 (M+1)
24		Int. 2 + Int. 10	E1	532.6	533.2 (M+1)
25		Int. 2 + Int. 17	E1	549.6	550.4 (M+1)
26		Int. 2 + 6-fluoro-4-metil-piridin-3-amina	E1	511.6	512.5 (M+1)
27		Int. 2 + Int. 8	E2	518.6	519.4 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
28		Int. 2 + Int. 21	E2	556.0	556.3 (M+1)
29		Int. 2 + 2,6-difluoropiridin-3-amina	E2	515.6	516.4 (M+1)
30		Int. 2 + Int. 11	E2	522.6	523.3 (M+1)
31		Int. 2 + Int. 12	E2	536.6	537.0 (M+1)
32		Int. 2 + Int. 9	E2	536.6	537.0 (M+1)
33		Int. 2 + 4-amino-3-fluoro-benzonitrilo	E2	521.6	522.4 (M+1)
34		Int. 2 + 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina	E3	574.7	575.0 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
35		Int. 2 + Int. 14	E3	588.7	589.2 (M+1)
36		Int. 2 + 2-fluoro-4-metilsulfonil-anilina	E3	570.7	571.4 (M+1)
37		Int. 35	F	602.7	603.3 (M+1)
38		Int. 24	F	546.7	547.2 (M+1)
39		Int. 25	F	563.7	564.3 (M+1)
40		Int. 26	F	525.6	526.4 (M+1)
41		Int. 27	F	532.6	533.5 (M+1)

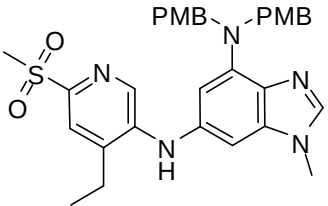
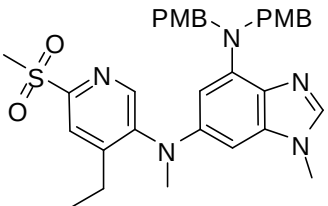
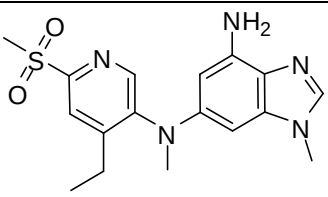
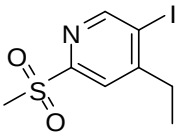
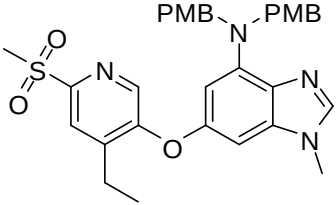
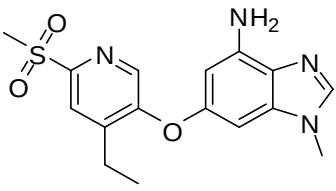
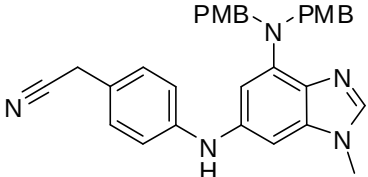
Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
42		Int. 28	F	570.1	570.4 (M+1)
43		Int. 29	F	529.6	530.5 (M+1)
44		Int. 30	F	536.6	536.5 (M+1)
45		Int. 31	F	550.6	551.0 (M+1)
46		Int. 32	F	550.6	551.0 (M+1)
47		Int. 33	F	535.6	522.4 (M+1)
48		Int. 34	F	588.7	589.5 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
49 A		Int. 36	F	584.7	585.1 (M+1)
49 B		Int. 36	F (subpro ducto)	598.8	599.1 (M+1)
50		Int. 2 + Int. 22	Dsc'd	532.6	533.4 (M+1)
51		Int. 3 + Int. 18 (método G), Int. 3 + Int. 7 (método H)	G o H	519.6	520.4 (M+1)
52		Int. 3 + Int. 19	G	533.6	534.4 (M+1)
53		Int. 37	l1	362.4	363.1 (M+1)
54		Int. 25	l1	309.3	310.3 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
55		Int. 43	I1	289.3	290.0 (M+1)
56 A		Int. 49A	I1	344.4	344.9 (M+1)
56 B		Int. 49B	I1	358.5	359.0 (M+1)
57		Int. 45	I1	310.3	311.0 (M+1)
58		Int. 47	I1	295.3	296.0 (M+1)
59		Int. 48	I1	348.4	349.0 (M+1)
61		Int. 39	I2	323.4	324.3 (M+1)
62		Int. 41	I3	292.3	293.3 (M+1)

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
5		Int. 38	I3	306.4	307.1 (M+1)
		Int. 50	I3	292.3	293.3 (M+1)
		Int. 52	I3	293.3	294.2 (M+1)
10		Int. 42	I3	329.8	330.2 (M+1)
		Int. 40	I3	285.3	286.2 (M+1)
		Int. 44	I3	296.3	297.0 (M+1)
20		Int. 32	I3	310.3	311.0 (M+1)
		2-bromo-4-etil-5-nitro-piridina	Dsc'd	200.3	201.1 (M+1)

25

Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
71		Int. 70 + Int. 2	E2	585.7	586.0 (M+1)
72		Int. 71	F	599.8	600.1 (M+1)
73		Int. 72	I3	359.5	360.0 (M+1)
74		Int. 70	Dsc'd	311.1	311.8 (M+1)
75		Int. 3 + Int. 74	G	586.7	587.3 (M+1)
76		Int. 75	I2	346.4	347.0 (M+1)
77		Int. 2 + 2-(4-aminofenil) acetonitrilo	E4	517.6	518.0 (M+1)

5

10

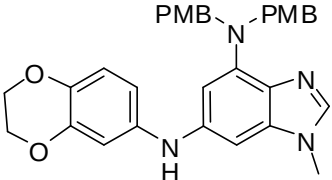
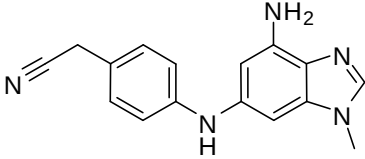
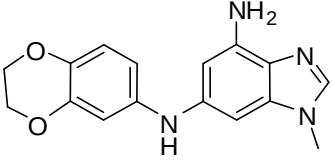
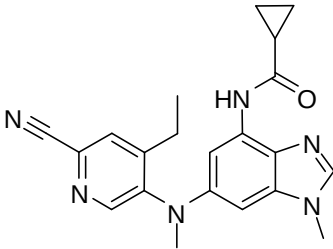
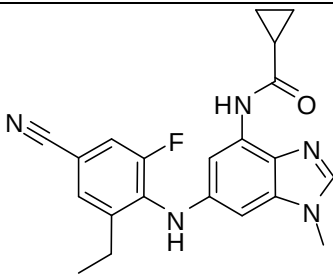
Int #	Estructura	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
78		Int. 2 + 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-amina	E4	536.6	537.33 (M+1)
79		Int. 77	I2	277.3	278.0 (M+1)
80		Int. 78	I2	296.3	297.0 (M+1)

Tabla III. Compuestos ilustrativos de la invención

15

20

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
1		N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il) iclopropanocarboxamida	Int 63	J1	374.4	375.3
2		N-(6-(4-ciano-2-etil-6-fluorofenilamino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il) ciclopropanocarboxamida	Int 54	J1	377.4	378.0

25

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
3		N-(6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)ciclopropanocarboxamida	Int 61	J1	391.4	392.4
4		6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo	Int 63	J2	364.4	365.1
5		6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-ilcarbamato de metilo	Int 61	J2	381.4	382.1
6		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-etil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 65	K1	379.4	380.4
7		N-(6-((4-ciano-2-etil-6-fluorofenil)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida (1S, 2S)/(1R,2R) mezcla racémica	Int 61	K1	409.4	410.2

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
8		(1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-etilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 63	K1	392.4	393.1
9		(1R,2R)-N-(6-((6-ciano-4-metilpiridin-3-il)(metil)amino)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-4-il)-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 62	K1	378.4	378.9
10		(1R,2R)-N-[6-(4-ciano-2-etil-fenoxi)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 64	K1	378.4	379.4
11		(1R,2R)-N-[6-(2-cloro-4-ciano-6-fluoro-N-metil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluorociclopropanocarboxamida	Int 66	K1	415.8	416.0
12		(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-((6-fluoro-4-metil-3-piridil)-metil-amino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 67	K1	371.4	372.5

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
13		(1R,2R)-N-[6-[(2,6-difluoro-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 55	K1	375.4	376.1
14		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-2-fluoro-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 68	K1	382.4	383.0
15		(1R,2R)-N-[6-(4-ciano-2-fluoro-N-metil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 58	K1	381.4	382.1
16		(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 53	K1	448.5	448.9
17		(1R,2R)-2-fluoro-N-[6-(2-fluoro-N-metil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 59	K1	434.5	435.1

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
18		N-[6-[(4-etil-6-metilsulfonil-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 73	K1	427.5	428.2
19		N-[6-(2-fluoro-N,6-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 53	K1	430.5	431.0
20		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Comp 28	K2	365.4	366.0
21		(1R,2R)-N-[6-[(6-ciano-2-fluoro-4-metil-3-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 57	K2	396.4	397.1
22		(1R,2R)-N-[6-[(2-ciano-3-fluoro-5-metil-4-piridil)-metil-amino]-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 69	K2	396.4	397.1

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
23		N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Comp 28	K2	347.4	348.1
24		5-((4-(ciclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)-4-etilpicolinamida	Comp. 1	L	392.5	393.3
25		4-etil-5-((4-((1R,2R)-2-fluorociclopropanocarboxamido)-1-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)(metil)amino)picolinamida	Comp 8	L	410.5	411.3
26		(1R,2R)-N-[6-(N,2-dimetil-4-metilsulfonil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 56A	-	430.5	431.0
27		(1R,2R)-N-[6-(4-etilsulfonil-N,2-dimetil-anilino)-1-metil-bencimidazol-4-il]-2-fluoro-ciclopropanocarboxamida	Int 56B	K1	444.5	445.0

Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
28		5-(7-amino-3-metil-bencimidazol-5-il)oxi-4-metil-piridina-2-carbonitrilo	Int 51	I2	279.3	280.1
29		N-[6-[(4-etil-6-metilsulfonyl-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 76	K1	414.5	415.1
30		N-[6-[4-(cianometil)anilino]-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 79	K1	345.4	346.0
31		N-[6-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilamino)-1-metil-bencimidazol-4-il]ciclopropanocarboxamida	Int 80	K1	364.4	365.0
32		5-[7-[(1R,2R)-2-fluorociclopropano carbonil]amino]-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metil-piridin-2-carboxamida	Comp 20	Dsc'd	383.4	384.1
33		1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea	Int 83	M	336.4	337.0

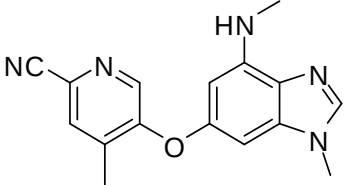
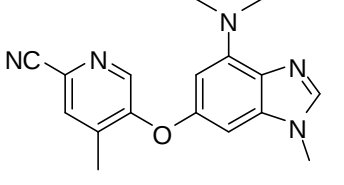
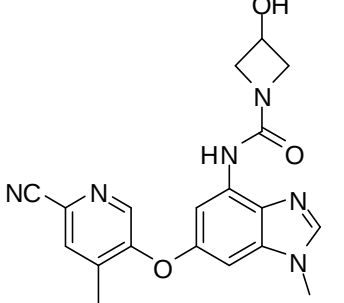
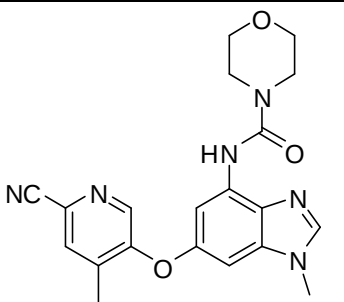
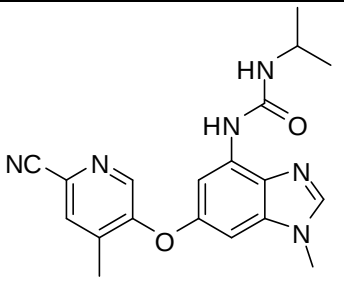
Comp. #	Estructura	Nombre	SM	Mtd	PM	MS Ms'd
34		4-metil-5-[3-metil-7-(metilamino)bencimidazol-5-il]oxi-piridina-2-carbonitrilo	Int 83	Dsc'd	293.3	294.0
35		5-[7-(dimetilamino)-3-metil-bencimidazol-5-il]oxi-4-metil-piridina-2-carbonitrilo	Int 83	Dsc'd	307.4	308.0
36		N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-hidroxi-azetidina-1-carboxamida	Int 83	M	378.1	379.0
37		N-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]morfolina-4-carboxamida	Int 83	M	392.2	393.1
38		1-[6-[(6-ciano-4-metil-3-piridil)oxi]-1-metil-bencimidazol-4-il]-3-isopropil-urea	Int 83	M	364.2	365.1

TABLA IV. Datos de RMN de los compuestos ilustrativos de la invención

Comp. #	RMN
5	1
10	2
15	3
20	4
	5

5	1	RMN- ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆): d = 0.69 a 0.77 (m, 4H), 1.04 (t, 3H), 2.15 a 2.24 (m, 1H), 2.34 (q, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 6.72 (d, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 10.05 (s, 1H).
10	2	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ = 0.70 a 0.80 (m, 4H), 1.09 (t, 3H), 2.19 a 2.27 (m, 1H), 2.64 (q, 2H), 3.68 (s, 3H), 6.42 (t, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.64 (dd, 1H), 7.67 (br s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 10.01 (s, 1H).
15	3	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): d = 9.93 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.81 (dd, 1H), 7.74 (s, 1 H), 7.29 (br s, 1H), 6.47 (d, finamente dividido, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.54 a 2.48 (m, parcialmente oscurecido por el pico del disolvente, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.09 (t, 3H), 0.71 a 0.69 (m, 4H).
20	4	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): δ = 1.05 (t, 3H), 2.36 (q, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 6.72 (d, 1H), 7.06 (d, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.00 (dd, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.91 (bs, 1H).
	5	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): δ = 1.10 (t, 3H), 2.52 (q, 2H), 3.23 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 6.51 (d, 1H), 6.86 (d, 1H), 7.76 (br s, 1H), 7.82 (dd, 1H), 7.92 (s, 1H), 8.75 (s, 1H).

Comp. #		RMN
5	6	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): d = 1.14 (ddt, H), 1.24 (t, 3H), 1.53 a 1.67 (m, 1H), 2.51 a 2.55 (m, 1H), 2.75 (q, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.77 a 5.03 (m, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 10.43 (s, 1H).
	7	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): δ = 0.99 a 1.15 (m, 1H), 1.09 (t, 3H), 1.54 (m, 1H), 2.39 (m, 1H), 2.52 (q, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.85 (m, 1H), 6.49 (d, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.82 (dd, 1H), 7.96 (s, 1H), 9.96 (s, 1H).
	8	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): δ = 0.99 a 1.18 (m, 1H), 1.05 (t, 3H), 1.56 (m, 1H), 2.29 a 2.45 (m, 1H), 2.35 (q, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.88 (m, 1H), 6.72 (d, 1H), 7.51 (bs, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 10.09 (bs, 1H).
	9	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): d = 10.13 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.55 (br s, 1H), 6.79 (d, finamente dividido, 1H), 5.0 a 4.7 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 2.5 a 2.3 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.6 a 1.5 (m, 1H), 1.2 a 1.0 (m, 1H).
20	10	RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆): d = 1.07 a 1.20 (m, 1H), 1.24 (t, 3H), 1.53 a 1.67 (m, 1H), 2.43-2.48 (m, 1H), 2.75 (q, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.78 a 5.01 (m, 1H), 6.78 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.59 (dd, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.80 (d, 1H), 8.22 (s, 1H), 10.40 (s, 1H).

Comp. #		RMN
5	11	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ = 1.08 (ddt, 1H), 1.41 a 1.67 (m, 1H), 2.41 (dt, 1H), 3.27 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.65 a 5.05 (m, 1H), 6.61 (d, 1H), 7.42 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.04 (dd, 1H), 8.12 (t, 1H), 10.04 (s, 1H).
	12	RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆): δ = 1.08 (ddt, 1H), 1.50 a 1.60 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.39 (dt, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.76 a 4.96 (m, 1H), 6.49 (d, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 10.02 (s, 1H).
10	13	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): 10.12 (s, 1H), 8.06 a 8.00 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.22 a 7.19 (m, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.98 a 4.77 (d, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 2.45 a 2.42 (m, 1H), 1.59 a 1.52 (m, 1H), 1.27 a 1.10 (m, 1H).
15	14	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.30 (1 H, s), 8.20 (1 H, s), 7.92 (1 H, dd), 7.85 (1 H, d), 7.63 (1 H, dd), 7.17 (1 H, d), 4.92 (1H, dF), 3.79 (3 H, s), 3.40 (3 H, s), 2.48-2.44 (1H, m), 1.64 a 1.53 (1H, m), 1.19 a 1.15 (1H, m).
20	15	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆): 10.22 (1H, s), 8.16 (1H, s), 7.80 (1H, s), 7.70 a 7.67 (1H, m), 7.59 a 7.58 (1H, d), 7.25 a 7.21 (1H, m), 7.07 (1H, s), 4.99 a 4.81 (1H, d), 3.79 (3H, s, CH ₃), 3.38 (3H, s, CH ₃), 2.46 a 2.42 (1H, m, CH), 1.61 a 1.55 (1H, m), 1.19 a 1.9 (1H, m).

Comp. #		RMN
5	16	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.30 (1 H, s), 7.95 (1 H, s), 7.78 (1 H, d), 7.74 (1 H, dd), 7.36 (1 H, d), 6.49 (1 H, d), 4.87 (1H, dF), 3.78 (3 H, s), 3.28 (3 H, s), 3.21 (3 H, s), 2.43 a 2.38 (1H, m), 2.22 (3 H, s), 1.62 a 1.51 (1H, m), 1.15 a 1.8 (1H, m).
	17	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.84 (1 H, s), 9.21 (1 H, s), 7.79 (2 H, dt), 7.55 (1 H, t), 7.42 (1 H, s), 7.26 (1 H, d), 4.95 (1H, dF), 3.96 (3 H, s), 3.43 (3 H, s), 3.28 (3 H, s), 2.43 a 2.38 (1 H, m), 1.62 a 1.51 (1 H, m), 1.15 a 1.08 (1 H, m).
	18	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.08 (1 H, s), 8.53 (1 H, s), 8.05 (1 H, s), 7.93 (1 H, s), 7.48 (1 H, br s), 6.69 (1 H, d), 3.75 (3 H, s), 3.29 (3 H, s), 3.21 (3 H, s), 2.46 (2 H, q), 2.25 a 2.17 (1 H, m), 1.08 (3 H, t), 0.76 a 0.69 (4 H, m).
15	19	RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃): 9.55 (1 H, br s), 8.05 a 8.00 (2 H, m), 7.70 (1 H, d), 7.61 (1 H, dd), 6.01 (1 H, d), 3.78 (3 H, s), 3.33 (3 H, s), 3.13 (3 H, s), 2.25 (3 H, s), 1.97 a 1.92 (1 H, m), 0.91 a 0.85 (4 H, m).
	20	RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆): d = 1.15 (ddt, 1H), 1.54 a 1.66 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.52 a 2.54 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.77 a 5.03 (m, 1H), 7.12 (d, 1H), 7.86 (d, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 10.44 (s, 1H).
25	21	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.12 (1H, s), 8.11 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.41 (1H, s), 6.61 (1H, d), 4.88 (1H, m), 3.75 (3H, s), 3.26 (3H, s), 2.42 (1H, m), 2.22 (3H, s), 1.57 (1H, m), 1.09 (1H, m).

Comp. #		RMN
5	22	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.18 (1H, s), 8.50 (1H, s), 8.06 (1H, s), 7.51 (1H, s), 6.73 (1H, d), 4.87 (1H, m), 3.75 (3H, s), 3.32 (3H, s), 2.45 (1H, m), 2.11 (3H, s), 1.60 (1H, m), 1.11 (1H, m).
	23	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.39 (1 H, s), 8.23 (1 H, s), 8.11 (1 H, s), 8.07 (1 H, s), 7.84 (1 H, d), 7.11 (1 H, d), 3.79 (3 H, s), 2.35 (3 H, s), 2.33 a 2.27 (1 H, m), 0.81 a 0.76 (4 H, m).
	24	RMN- ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆): d = 0.56 a 0.78 (m, 4H), 1.09 (t, 3H), 2.18 (br. s., 1H), 2.46 (br. s., 2H), 3.30 (br. s., 3H), 3.73 (br. s., 3H), 6.56 (br. s., 1H), 7.38 (br s, 1H), 7.59 (br. s., 1H), 7.98 (br. s., 2H), 8.05 (br. s., 1H), 8.33 (br. s., 1H), 9.96 (br. s., 1H).
10	25	RMN- ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆): d = 1.5 a 1.8 (m, 1H), 1.09 (t, 3H), 1.50 a 1.59 (m, 1H), 2.39 (dt, 1H), 2.45 a 2.49 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.70 a 4.97 (m, 1H), 6.57 (d, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.99 (s, 2H), 8.06 (d, 1H), 8.34 (s, 1H), 10.00 (s, 1H).
15	26	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.10 (1 H, s), 8.04 (1 H, s), 7.78 (1 H, s), 7.76 (1 H, dd), 7.51 (1 H, d), 7.35 (1 H, d), 6.68 (1 H, d), 4.90 (1H, d), 3.75 (3 H, s), 3.29 (3 H, s), 3.21 (3 H, s), 2.40 (1H, t), 2.08 (3 H, s), 1.64 a 1.53 (1H, m), 1.15 a 1.08 (1H, m).
20		

Comp. #	RMN
27	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.10 (1 H, s), 8.03 (1 H, s), 7.73 a 7.71 (2 H, m), 7.48 (1 H, d), 7.38 (1 H, d), 6.68 (1 H, dd), 4.90 (1H, dF), 3.74 (3 H, s), 3.29 (3 H, s), 3.23 (2 H, q), 2.40 (1H, t), 2.07 (3 H, s), 1.64 a 1.53 (1H, m), 1.15 a 1.08 (1H, m) 1.11 (3 H, t).
28	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.09 (1 H, s), 8.05 (1 H, s), 7.95 (1 H, s), 6.53 (1 H, d), 6.11 (1 H, d), 5.60 (2 H, br s) 3.68 (3 H, s), 2.34 (3 H, s).
29	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.42 (1 H, s), 8.23 (1 H, s), 8.13 (1 H, s), 8.03 (1 H, s), 7.86 (1 H, d), 7.13 (1 H, d), 3.80 (3 H, s), 3.24 (3 H, s), 2.83 (2 H, q), 2.33 a 2.27 (1 H, m), 1.26 (3 H, t), 0.81 a 0.76 (4 H, m).
30	RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) 8.81 (1 H, s), 8.02 (1 H, d), 7.71 (1 H, s), 7.17 (2 H, d), 7.04 (2 H, d), 6.83 (1 H, d), 6.05 (1 H, s), 3.73 (3 H, s), 3.65 (2 H, s), 1.73 a 1.66 (1 H, m), 1.10 a 1.06 (2 H, m), 0.87 a 0.82 (2 H, m).
31	RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) 8.77 (1 H, s), 7.89 (1 H, s), 7.66 (1 H, s), 6.78 (1 H, d), 6.68 (2 H, t), 6.63 (1 H, dd), 5.73 (1 H, br s), 4.25 a 4.21 (4 H, m), 3.69 (3 H, s), 1.73 a 1.66 (1 H, m), 1.11 a 1.06 (2 H, m), 0.87 a 0.82 (2 H, m).
32	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.41 (1 H, br s), 8.20 (1 H, s), 8.07 (1 H, s), 8.03 (1 H, s), 7.98 (1 H, br s), 7.84 (1 H, d), 7.55 (1 H, br s), 7.01 (1 H, d), 5.02 a 4.80 (1 H, m), 3.78 (3 H, s), 2.34 (3 H, s), 1.66 a 1.55 (1 H, m), 1.21 a 1.02 (2 H, m).

	Comp. #	RMN
5	33	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.89 (1 H, br s), 8.23 (1 H, br s), 8.10 (2 H, m), 7.72 (1 H, br m), 6.4 a 6.8 (2 H, m), 3.78 (3 H, s), 2.65 (3 H, d), 2.36 (3 H, s).
	34	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.07 (1 H, s), 8.05 (1 H, s), 7.97 (1 H, s), 6.47 (1 H, d), 6.10 (1 H, m), 6.01 (1 H, d), 3.69 (3 h, s), 2.77 (3 H, d), 2.36 (3 H, s)
	35	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.07 (1 H, s), 8.05 (1 H, s), 8.01 (1 H, s), 6.63 (1 H, d), 6.16 (1 H, d), 3.70 (3 H, s), 3.19 (6H, s), 2.36 (3H, s)
10	36	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.16 (1 H, s), 8.10 (1 H, s), 0.07 (1 H, s), 8.00 (1 H, s), 7.62 (1 H, d), 6.99 (1 H, d), 5.68 (1 H, m), 4.45 (1 H, m), 4.21 (2 H, m), 3.78 (4 H, m), 2.57 (3 H, s).
15	37	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.42 (1 H, br s), 8.16 (1 H, s), 8.10 (1 H, s), 8.07 (1 H, s), 7.56 (1 H, d), 7.02 (1 H, d), 3.78 (3 H, s), 3.61 (4 H, m), 3.44 (4 H, m), 2.36 (3 H, s).
	38	RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.68 (1 H, br, s), 8.13 (1 H, s), 8.08 (1 H, s), 8.06 (1 H, s), 7.73 (1 H, d), 6.99 (1 H, br d), 6.89 (1 H, d), 3.75 (3 H, s), 3.72 (1 H, m), 2.35 (3 H, s), 1.07 (6 H, d).

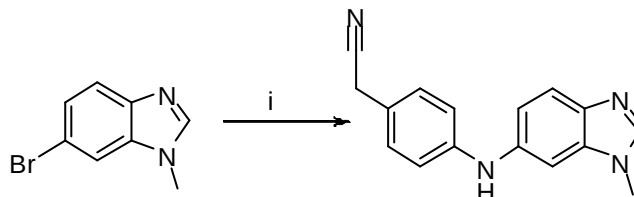
20

25

Ejemplo 3. Compuestos comparativos

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

5

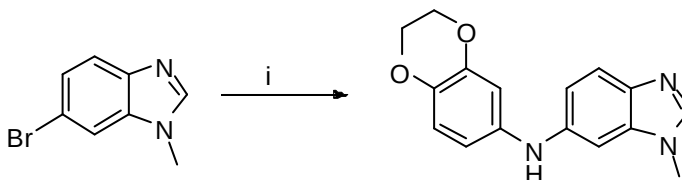


Una mezcla de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.01 mmol) y Xantphos (0.01 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) se sometió a ultrasonidos y se añadió bajo nitrógeno a una mezcla de 6-bromo-1-metilbencimidazol (0.45 mmol), 2-(4-aminofenil)acetonitrilo (0.58 mmol) y Cs_2CO_3 (0.62 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml). La mezcla se agitó a 110 °C durante 12 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó (H_2O), se secó (separador de fases y se concentró. El residuo se purificó por medio de HPLC preparativa para dar el producto deseado (Compuesto A).

PM: 262.3. MS $\text{Ms}^{\text{'d}}$: 263.2.

RMN: RMN- ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.13 (1 H, s), 7.68 (1 H, dd), 7.60 (1 H, dd), 7.54 (1 H, d), 7.32 (1 H, d), 7.24 (1 H, t), 6.91 (1 H, dd), 3.77 (3 H, s), 3.39 (3 H, s).

3.2 Compuesto B



25

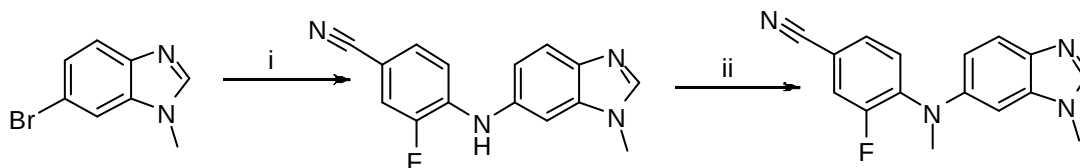
Una mezcla de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.01 mmol) y Xantphos

(0.01 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) se sometió a ultrasonidos y se añadió bajo nitrógeno a una mezcla de 6-bromo-1-metil-bencimidazol (0.45 mmol), 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-amina (0.58 mmol) y Cs₂CO₃ (0.62 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml). La mezcla se agitó a 110 °C durante 12 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó (H₂O), se secó (separador de fases y se concentró. El residuo se purificó por medio de HPLC preparativa para dar el producto deseado (Compuesto B).

PM: 281.3. MS Ms'd: 282.1.

RMN: RMN - ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.94 (1 H, s), 7.80 (1 H, br s), 7.45 (1 H, d), 7.05 (1 H, d), 6.86 (1 H, dd), 6.73 (1 H, dd), 6.61 a 6.57 (2 H, m), 4.22 a 4.16 (4 H, m), 3.71 (3 H, s).

3.3. **Compuesto** **C3-fluoro-4-[metil-(3-metilbenzoimidazol-5-il)amino]benzonitrilo**



3.3.1. Paso i: 3-fluoro-4-[(3-metilbenzoimidazol-5-il)amino]benzonitrilo

Una mezcla que contiene 6-bromo-1-metil-bencimidazol (2.38 mmol), 4-amino-3-fluoro-benzonitrilo (3.57 mmol), XPhos (0.95 mmol), Cs₂CO₃ (7.14 mmol) y Pd(OAc)₂ (0.71 mmol) en tolueno seco (8 ml) se agitó a 110 °C durante

aproximadamente 16 h. La mezcla se diluyó (EtOAc), se lavó (H₂O), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar el producto deseado 3-fluoro-4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo.

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

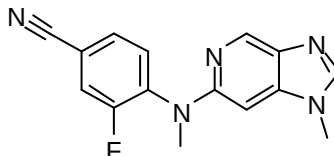
Se añadió NaH (7.14 mmol) a una solución de 3-fluoro-4-[(3-metilbencimidazol-5-il)amino]benzonitrilo (2.38 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 10 30 min. Se añadió MeI (4.76 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se diluyó (DCM), se lavó (H₂O) y se concentró. El residuo se purificó por medio de HPLC preparativa para dar el producto deseado (Compuesto C).

15 PM: 280.1. MS Ms'd: 281.0.

RMN: RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.13 (1 H, s), 7.68 (1 H, dd), 7.60 (1 H, dd), 7.54 (1 H, d), 7.32 (1 H, d), 7.24 (1 H, t), 6.91 (1 H, dd), 3.77 (3 H, s), 3.39 (3 H, s).

3.4. Compuesto D

20



La síntesis de este compuesto se describe en PCT Sol. Int. (2013) W0 2013117645. (Menet et al., 2013)

25

EJEMPLOS BIOLÓGICOS

Ejemplo 4. Ensayos in vitro

4.1. Ensayo de inhibición de JAK1

4.1.1. Análisis de JAK1 con sustrato poliGT

5 Se adquirió un dominio catalítico de JAK1 recombinante humano (aminoácidos 850 a 1154; número de catálogo 08-144) de Carna Biosciences. Se incubó 10 ng de JAK1 con 12.5 g de sustrato poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en amortiguador de reacción de cinasa (15 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de DTT, 0.01% de Tween-20, 10 mM de MgCl₂, 2
10 μM ATP no radiactivo, 0.25 Ci ³³P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 μL que contiene el compuesto de prueba o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 25 μl, en una
15 placa de polipropileno de 96 pozos (Greiner, fondo en V). Después de 45 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 μl/pozo de 150 mM ácido fosfórico. Toda la reacción de cinasa terminada se transfiere a placas de filtro de 96 pozos (Perkin Elmer número de catálogo
20 6005177) prelavadas (75 mM de ácido fosfórico) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 μl por pozo de una solución de 75 mM de ácido fosfórico y la parte inferior de las placas se sella. Se añaden 40 μl/pozo de Microscint-20. la parte
25 superior de las placas se sella y la lectura se lleva a cabo

por el uso de Topcount (Perkin Elmer). La actividad de cinasa se calcula por medio de la sustracción de los recuentos por minuto (cpm) obtenida en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μ M de estaurosporina) de cpm obtenidos en la presencia del vehículo. La capacidad del compuesto para inhibir esta actividad se determina como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{RFU del compuesto de prueba} - \text{RFU de control})}{(\text{RFU del vehículo} - \text{RFU de control})} * 100$$

10 RFU del compuesto de prueba = RFU determinadas para la muestra con el compuesto de prueba presente

 RFU de control = RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo

 RFU del vehículo = RFU determinadas en presencia
15 del vehículo

 Se preparan serie de dilución de dosis para los compuestos que permiten las pruebas de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK1 y el cálculo del IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se prueba en forma rutinaria a una concentración de 20 μ M seguido por una
20 dilución en serie 1/3, 8 puntos (20 μ M - 6.67 μ M - 2.22 μ M - 740 nm - 247 nM - 82 nM - 27 nm - 9 nM) en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando aumentó la potencia de la serie de compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la
25 concentración superior (por ej., 5 μ M, 1 μ M).

4.1.2. **Ensayo de péptido JAK1 Ulight-JAK1**

Se adquirió JAK1 recombinante humana (dominio catalítico, aminoácidos 866 a 1154; número de catálogo PV4774) de Invitrogen. 1 ng de JAK1 se incubó con 20 nM de péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) (Perkin Elmer, número de catálogo TRF0121) en amortiguador de reacción de cinasa (25 mM MOPS pH 6.8, 0.01% de Brij-35, 5 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT, 7 μ M de ATP) con o sin 4 μ L que contiene el compuesto de prueba o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 20 μ L, en una placa 384 Opti blanca (Perkin Elmer, número de catálogo 6007290). Después de 60 min a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 20 μ L/pozo de mezcla de detección (1 x amortiguador de detección (Perkin Elmer, número de catálogo CR97-100C), 0.5 nM con europio anti-fosfotirosina (PT66) (Perkin Elmer, catálogo número AD0068), EDTA 10 mM). La lectura se lleva a cabo por el uso del Envision con excitación a 320 nm y medición de emisión a 615 nm (Perkin Elmer). La actividad de cinasa se calculó por medio de la sustracción de unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) obtenidas en la presencia de un inhibidor de control positivo (10 μ M de estaurosporina) de RFU obtenidas en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de prueba para inhibir esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = ((RFU determinadas para la muestra con el compuesto de prueba presente - RFU determinadas

para la muestra con el inhibidor de control positivo) dividido por (RFU determinadas en la presencia del vehículo - RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo)) * 100.

5 La serie de dilución de la dosis se prepararon para los compuestos que permiten las pruebas de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK1 y el cálculo del IC₅₀ para el compuesto. Cada compuesto se prueba en forma rutinaria a una concentración de 20 µM seguido por una dilución en serie 1/5, 10
10 puntos en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando aumenta la potencia de la serie de compuestos, se preparan más diluciones y/o se baja la concentración superior (por ej., 5 µM, 1 µM). Los datos se expresan como el promedio de IC₅₀ de los ensayos ± error estándar de la media.

15 Tabla V. **Valores de IC₅₀ de JAK1 de Compuestos Ilustrativos de la invención**

* > 500 nM
** > 100 a 500 nM
*** > 50 a 100nM
20 ***** 0.1 a 50 nM

Comp. #	IC ₅₀ de JAK1
1	*****
2	*****
25 3	*****

5

10

15

20

25

Comp. #	IC ₅₀ de JAK1
4	*****
5	*****
6	*****
7	*****
8	*****
9	*****
10	*****
11	*****
12	*****
13	***
14	*****
15	*****
16	*****
17	**
18	*****
19	*****
20	*****
21	*****
22	*****
23	*****
24	*****
25	*****
26	*****

5

Comp. #	IC ₅₀ de JAK1
27	****
28	***
29	****
32	***
33	****
34	**
35	*
36	*
37	*
38	****

10

Tabla VI. Valores de IC₅₀ de JAK1 de Compuestos Comparativos

15

Comp. #	IC ₅₀ de JAK1
A	*
B	*
C	*
D	*

20

4.1.3. *Ensayo de determinación JAK1 KI*

Para la determinación de Ki, se mezclan diferentes cantidades de compuesto con la enzima y la reacción enzimática es seguido como una función de la concentración de

25

ATP. La K_i se determina por medio del trazado recíproco doble de K_m vs concentración del compuesto (gráfico de Lineweaver-Burk). Se utiliza 1 ng de JAK1 (Invitrogen, PV4774) en el ensayo. El sustrato era de 50 nM Ulight-JAK-1 (Tyr1023) péptido (Perkin Elmer, TRF0121). La reacción se lleva a cabo en 25 mM de MOPS, pH 6.8, 0.01%, 2 mM de DTT, 5 mM de $MgCl_2$ Brij-35 con diferentes concentraciones de ATP y el compuesto. El sustrato fosforilado se mide por el uso de un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con Eu PT66 (Perkin Elmer, AD0068) de acuerdo con lo descrito en la Lectura 1.1.2. se lleva a cabo en el Envision (Perkin Elmer) con excitación a 320 nm y emisión seguida a 615 nm y 665 nm.

4.2. ***Ensayo de inhibición de JAK2***

4.2.1. ***Ensayo de JAK2 de sustrato poliGT***

Se adquirió un dominio catalítico de JAK2 recombinante humana (aminoácidos 808 a 1132; número de catálogo PV4210) de Invitrogen. 0.025 mU de JAK2 se incubaba con 2.5 mg de sustrato poliGT (número de catálogo Sigma P0275) en amortiguador de reacción de cinasa (5 mM de MOPS, pH 7.5, 9 mM de MgAc, 0.3 mM de EDTA, 0.06% de Brij y 0.6 mM de DTT, 1 μ M de ATP no radiactivo, 0.25 μ Ci ^{33} P-gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 μ L que contiene el compuesto de prueba o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 25 μ L, en una placa de polipropileno de 96 pozos (Greiner,

fondo en V). Después de 90 min a 30 °C, las reacciones se detienen por medio de la adición de 25 µl/pozo de 150 mM ácido fosfórico. Toda la reacción de cinasa terminada se transfiere a prelavado (75 mM de ácido fosfórico) placas de filtro de 96 pozos (Perkin Elmer número de catálogo 6005177) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pozo de una solución 75 mM de ácido fosfórico y la parte inferior de las placas se sella. Se añaden 40 µl/pozo de Microscint-20. La parte superior de las placas se sella y la lectura se lleva a cabo por el uso de Topcount (Perkin Elmer). La actividad de cinasa se calcula por medio de la sustracción de los recuentos por minuto (cpm) obtenido en presencia de un inhibidor de control positivo (10 µM de estaurosporina) de cpm obtenido en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de prueba para inhibir esta actividad se determina como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{RFU del compuesto de prueba} - \text{RFU de control})}{(\text{RFU del vehículo} - \text{RFU de control})} * 100$$

RFU del compuesto de prueba = RFU determinadas para la muestra con el compuesto de prueba presente

RFU de control = RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo

RFU del vehículo = RFU determinadas en

presencia del vehículo

Se preparan series de dilución de dosis para los compuestos que permiten las pruebas de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK2 y el cálculo del IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se prueba en forma rutinaria a una concentración de 20 µM seguido por una dilución en serie 1/3, 8 puntos (20 µM - 6.67 µM - 2.22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando se aumenta la potencia de las series de compuesto, se preparan más diluciones y/o la concentración superior se baja (por ej., 5 µM, 1 µM).

4.2.2. ***Ensayo de péptido JAK2 Ulight-JAK1***

Se adquirió JAK2 recombinante humana (dominio catalítico, aminoácidos 866 a 1154; número de catálogo PV4210) de Invitrogen. 0.025 mU de JAK2 se incubó con 25 nM de péptido Ulight-JAK1 (tyr1023) (Perkin Elmer número de catálogo TRF0121) en amortiguador de reacción de cinasa (25 mM de HEPES, pH 7.0. 0.01% de Triton X-100. 7.5 mM de MgCl₂, 2 mM de DTT, 7.5 µM ATP) con o sin 4 µL que contiene el compuesto de prueba o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 20 µL, en una placa 384 Opti blanca (Perkin Elmer, número de catálogo 6007290). Después de 60 min a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 20 µL/pozo de mezcla de detección (1 x amortiguador de detección (Perkin Elmer, número de

catálogo CR97-100C), 0.5 nM con europio anti-fosfotirosina (PT66) (Perkin Elmer, número de catálogo AD0068), 10 mM de EDTA). La lectura se lleva a cabo por el uso de Envision con excitación a 320 nm y medición de emisión a 615 nm (Perkin Elmer). La actividad de cinasa se calculó por medio de la sustracción de unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) obtenidas en la presencia de un inhibidor de control positivo (10 mM de estaurosporina) de RFU obtenida en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de prueba para inhibir esta actividad se determinó como:

Porcentaje de inhibición = $\left(\frac{\text{RFU determinadas para la muestra con el compuesto de prueba presente} - \text{RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo}}{\text{RFU determinadas en la presencia del vehículo} - \text{RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo}} \right) * 100$.

Se preparan series de dilución de dosis para el compuesto que permite las pruebas de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK2 y el cálculo del IC₅₀ para el compuesto. Cada compuesto se prueba en forma rutinaria a una concentración de 20 µM seguido por una dilución en serie 1/5, 10 puntos en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando aumenta la potencia de las series de compuesto, se preparan más diluciones y/o se baja la

concentración superior (por ej., 5 μ M, 1 μ M). Los datos se expresan como el promedio de IC₅₀ de los ensayos $\pm$ error estándar de la media.

Los siguientes compuestos se han probado por su actividad contra JAK2 y los valores de IC₅₀ de acuerdo con lo determinado por el uso de los ensayos descritos en esta descripción, y se presentan a continuación en la Tabla VII.

Tabla VII. Valores CI₅₀ de JAK2 de compuestos ilustrativos de la invención

- 10 * > 500 nM
- ** > 100 a 500 nM
- *** > 50 a 100nM
- **** 0.1 a 50 nM

15

20

Comp. #	IC ₅₀ de JAK2
1	****
2	****
3	****
4	****
5	****
6	****
7	****
8	****

25

5

10

15

20

25

Comp. #	IC ₅₀ de JAK2
9	****
10	****
11	****
12	***
13	**
14	***
15	**
16	****
17	*
18	****
19	****
20	***
21	****
22	****
23	***
24	****
25	****
26	***
27	**
28	*
29	**
32	***
33	****

5

Comp. #	IC ₅₀ de JAK2
34	*
35	*
36	*
37	*
38	**

10

Tabla VIII. Valores de IC₅₀ de JAK2 de Compuestos Comparativos

15

Comp. #	IC ₅₀ de JAK2
A	*
B	*
C	*
D	*

4.2.3. **Ensayo de determinación de JAK2 Kd**

20

Se utiliza JAK2 (Invitrogen, PV4210) a una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se lleva a cabo en 50 mM de Hepes, pH 7.5, 0.01% de Brij-35, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA por el uso de 25 nM de trazador de cinasa 236 (Invitrogen, PV5592) y 2 nM de Eu-anti-GST (Invitrogen, PV5594) con concentraciones de compuesto variables.

25

La detección del trazador se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

4.3. ***Ensayo de inhibición de JAK3***

4.3.1. ***Ensayo de péptido JAK3 Ulight-JAK1***

5 Se adquirió un dominio catalítico de JAK3 humana recombinante (aminoácidos 781 a 1.124; número de catálogo PV3855) de Invitrogen. Se incubaron 0.5 ng de proteína JAK3 con 2.5 g de sustrato poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en amortiguador de reacción de cinasa (25 mM de Tris, pH 7.5, 10 0.5 mM de EGTA, 10 mM de $MgCl_2$, 2.5 mM de DTT, 0.5 mM de Na_3VO_4 , 5 mM de b-glicerolfosfato, 0.01 % de Triton X-100. 1 μ M de ATP no radiactivo, 0.25 μ Ci de ^{33}P -gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 μ l que contiene el compuesto de prueba o 15 vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 25 μ l, en una placa de polipropileno de 96 pozos (Greiner, fondo en V). Después de 45 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 μ l/pozo de 150 mM de ácido fosfórico. Toda la reacción de cinasa terminada se 20 transfirió a placas de filtro de 96 pozos (Perkin Elmer número de catálogo 6005177) prelavadas (75 mM de ácido fosfórico) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 μ l por pozo de una solución de 75 mM de ácido fosfórico y se selló el fondo 25 de las placas. Se añadieron 40 μ l/pozo de Microscint-20.

Se selló la parte superior de las placas y la lectura se llevó a cabo por el uso de Topcount (Perkin Elmer). La actividad de cinasa se calculó por medio de la sustracción de recuentos por min (cpm) obtenida en presencia de un inhibidor de control positivo (10 μ M de estaurosporina) de cpm obtenido en presencia del vehículo. La capacidad de un compuesto de prueba para inhibir esta actividad se determinó como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{RFU del compuesto de prueba} - \text{RFU de control})}{(\text{RFU del vehículo} - \text{RFU de control})} * 100$$

10

RFU del compuesto de prueba = RFU determinadas para la muestra con el compuesto de prueba presente

RFU de control = RFU determinadas para la muestra con el inhibidor de control positivo

15

RFU del vehículo = RFU determinadas en presencia del vehículo

Se prepararon series de dilución de la dosis para los compuestos que permiten las pruebas de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de JAK3 y el cálculo del IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó en forma rutinaria a una concentración de 20 μ M seguido por una dilución en serie 1/5, 10 puntos en una concentración final de 1% de DMSO. Cuando aumentó la potencia de las series de compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la

20

25

concentración superior (por ej., 5 mM, 1 M).

Los siguientes compuestos se han probado por su actividad contra la JAK3 y los valores de IC₅₀. de acuerdo con lo determinado por el uso de los ensayos descritos en esta descripción, se presentan a continuación en la tabla IX.

Tabla IX. Valores de IC₅₀ de JAK3 de Compuestos Ilustrativos de la invención

* > 500 nM

** > 100 a 500 nM

10 *** > 50 a 100 nM

**** 0.1 a 50 nM

15

20

25

Comp. #	IC ₅₀ de JAK3
1	***
2	****
3	****
4	**
5	***
6	*
7	****
8	**
9	**
10	**
11	**

5

10

15

20

25

Comp. #	IC ₅₀ de JAK3
12	* *
13	*
14	* *
15	*
16	* * *
17	*
18	* *
19	* * *
20	*
21	* * *
22	* *
23	*
24	* *
25	* *
26	* *
27	* *
28	*
29	*
32	*
33	* *
34	*
35	*
36	*

Comp. #	IC ₅₀ de JAK3
37	*
38	*

5 Tabla X. **Valores de IC₅₀ de JAK3 de Compuestos Comparativos**

Comp. #	IC ₅₀ de JAK3
C	*
D	*

10

4.3.2. Ensayo de determinación de JAK3 Ki

Para la determinación de Ki, se mezclan diferentes cantidades del compuesto con la enzima y la reacción enzimática es seguido como una función de la concentración de ATP. La Ki se determina por medio del trazado recíproco doble de Km vs concentración del compuesto (gráfica de Lineweaver-Burk). Se utiliza JAK3 (Carna Biosciences, 09CBS-0625B) a una concentración final de 10 ng/ml. El sustrato es una sal de poli(Glu,Tyr)sodio (4:1), PM 20,000 a 50,000 (Sigma, P0275) La reacción se lleva a cabo en 25 mM de Tris, pH 7.5, 0.01% de Triton X-100. 0.5 mM de EGTA, 2.5 mM de DTT, 0.5 mM de Na₃VO₄, 5 mM de b-glicerolfosfato, 10 mM de MgCl₂ con diferentes concentraciones de ATP y el compuesto y se detuvieron por medio de la adición de 150 mM de ácido

fosfórico. La medición de fosfato incorporado en el sustrato poliGT se lleva a cabo por medio de la carga de las muestras en una placa de filtro (por el uso de un recolector, Perkin Elmer) y un lavado posterior. El ^{33}P incorporado en poliGT se mide en un contador de centelleo Topcount después de la adición de líquido de centelleo a las placas de filtro (Perkin Elmer).

4.4. ***Ensayo de inhibición de TYK2***

4.4.1. ***Ensayo de péptido TYK2 Ulight-JAK1***

Se adquirió un dominio catalítico de TYK2 recombinante humana (aminoácidos 871 a 1187; número de catálogo 08-147) de Carna biosciences. Se incubaron 5 ng de TYK2 con 12.5 μg de sustrato poliGT (Sigma número de catálogo P0275) en amortiguador de reacción de cinasa (25 mM de Hepes, pH 7.2, 50 mM de NaCl, 0.5 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 5 mM de MnCl_2 , 10 mM de MgCl_2 , 0.1% de Brij-35, 0.1 μM de ATP no radiactivo, 0.125 μCi ^{33}P -gamma-ATP (GE Healthcare, número de catálogo AH9968) concentraciones finales) con o sin 5 μL que contiene el compuesto de prueba o vehículo (DMSO, concentración final 1%), en un volumen total de 25 μL , en una placa de polipropileno de 96 pozos (Greiner, fondo en V). Después de 90 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por medio de la adición de 25 μL /pozo de 150 mM de ácido fosfórico. Toda la reacción de cinasa terminada se transfirió a placas de filtro de 96 pozos (Perkin Elmer número de

catálogo 6005177) prelavadas (75 mM de ácido fosfórico) por el uso de un recolector de células (Perkin Elmer). Las placas se lavaron 6 veces con 300 µl por pozo de una solución de 75 mM de ácido fosfórico y el fondo de las placas se selló.

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

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

Se prepararon series de dilución de la dosis para
20 los compuestos que permiten las pruebas de los efectos de dosis-respuesta en el ensayo de TYK2 y el cálculo del IC₅₀ para cada compuesto. Cada compuesto se ensayó en forma rutinaria a una concentración de 20 µM seguido por una dilución en serie 1/3, 8 puntos (20 µM - 6.67 µM - 2.22 µM -
25 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM) en una concentración

final de 1% de DMSO. Cuando aumentó la potencia de las series de compuesto, se prepararon más diluciones y/o se bajó la concentración superior (por ej., 5 M, 1 M).

Los siguientes compuestos se han probado para su actividad contra TYK2; y los valores de IC_{50} de acuerdo con lo determinado por el uso de los ensayos descritos en esta descripción, se presentan a continuación en la Tabla XI.

Tabla XI. Valores de IC_{50} de TYK2 de Compuestos Ilustrativos de la invención

- 10 * > 500 nM
- ** > 100 a 500 nM
- *** > 50 a 100 nM
- **** 0.1-50 nM

15

20

Comp. #	IC_{50} de TYK2
1	****
2	****
3	****
4	****
5	****
6	****
7	****
8	****
9	****

25

5

10

15

20

25

Comp. #	IC ₅₀ de TYK2
10	*****
11	*****
12	*****
13	*****
14	*****
15	*****
16	*****
17	**
18	*****
19	*****
20	*****
21	*****
22	*****
23	*****
24	*****
25	*****
26	*****
27	*****
28	**
29	**
32	***
33	*****
34	*

5

Comp. #	IC ₅₀ de TYK2
35	*
36	*
37	*
38	**

Tabla XII. Valores de IC₅₀ de TYK2 de Compuestos Comparativos

10

Comp. #	IC ₅₀ de TYK2
C	*
D	*

4.4.2. *Ensayo de determinación de TYK2 Kd*

15

20

Se utiliza TYK2 (Carna Biosciences, 09CBS-0983D) a una concentración final de 5 nM. El experimento de unión se lleva a cabo en 50 mM de Hepes, pH 7.5, 0.01% de Brij-35, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA 50 nM por el uso de un trazador de cinasa 236 (Invitrogen, PV5592) y 2 nM de Eu-anti-GST (Invitrogen, PV5594) con concentraciones de compuesto variables. La detección del trazador se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento de los fabricantes.

25

Ejemplo 5. Ensayos celulares:

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

**5.1.1. Ensayo celular de JAK1 selectiva, activación de
5 STAT1 por IFN α en PBMC**

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de capas leucocitarias en condiciones amortiguadas por centrifugación en gradiente de densidad por el uso de un medio LymphoPrep™
10 (Axis-Shield), seguido por 3 etapas de lavado posteriores en PBS sin Ca⁺⁺ Mg⁺⁺. Las PBMC se resuspendieron en un medio llano RPMI 1640 que contiene 10% (v/v) de FBS inactivado por calor, 1% de Pen-Strep (100 U/ml penicillium y 100 µg/ml de estreptomicina) y se cultivaron en forma adicional en un
15 incubador humidificado a 37 °C, 5 % de CO₂.

Las PBMC se siembran en placas de 24 pozos a 5.0 10⁰⁶ células/pozo en un volumen de 200 µl de RPMI 1640 (Invitrogen) que contiene 10% (v/v) de FBS y 1% de Pen-Strep (Invitrogen).

20 Las PBMC se tratan con compuesto de prueba durante 30 min a 37 °C, 5% de CO₂. 25 µl de dilución de compuesto concentrado en 10 veces se añade al medio. Después de 30 min del pretratamiento de compuesto de prueba/vehículo, las PBMC se estimulan durante 30 min a 37 °C, 5% de CO₂ con IFN α
25 humano recombinante (PeproTech) a una concentración final de

100 ng/ml por medio de la adición de 25 μ l (concentrado en 10 veces) de activador de citocinas para obtener un volumen final de 250 μ l por pozo.

5 Todos los compuestos se ensayaron en una sola partida de 20 μ M, seguido por una dilución en serie 1/3, 8 dosis en total (20 μ M, 6.6 μ M, 2.2 μ M, 0.74 μ M, 0.25 μ M, 0.082 μ M, 0.027 μ M y 0.009 μ M) en una concentración final de 0.2% de DMSO.

10 Después de 30 min de estimulación de citocinas, 250 μ l de suspensión celular se transfiere a una placa de 96 pozos de fondo en V, se centrifuga durante 5 min a 1000 rpm para sedimentar las células, seguido por la eliminación del sobrenadante. El sedimento de células se reconstituye en 100 μ l de amortiguador de lisis 1x
15 complementado con cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche Applied Sciences, Número de Producto 11836170001) seguido por congelación y almacenamiento de las muestras a -80 °C. El 1x de amortiguador de lisis se proporciona con el Kit de Elisa fosfo-STAT1 y contiene inhibidores de la
20 fosfatasa. Los niveles endógenos de STAT1 fosforilados se cuantifican por el uso de un Kit ELISA Sandwich PathScan® fosfo-STAT1 (Tyr701) de 96 pozos (Cell Signaling, Número de Producto #7234) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 La actividad de HRP (HRP se conjuga con el

anticuerpo secundario) se mide por medio de la adición de 100 µl de sustrato luminol recién preparado (Sustrato ELISA de quimioluminiscencia BM (POD), Roche, Número de Producto 11582950001), por medio de una incubación durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad y medido en un luminómetro de microplacas de Ascenso Thermo Scientific Luminoskan (tiempo de integración de 200 ms).

5.1.2. Ensayo de células JAK2 selectiva, la activación de STAT5 por GM-CSF en PBMC

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de capas leucocitarias en condiciones amortiguadas por centrifugación en gradiente de densidad por el uso de un medio LymphoPrep™ (Axis-Shield), seguido por 3 etapas de lavado posteriores en PBS sin Ca⁺⁺ Mg⁺⁺. Las PBMC se resuspendieron en un medio llano RPMI 1640 que contiene 10% (v/v) de FBS inactivado por calor, 1% de Pen-Strep (100 U/ml de penicilium y 100 µg/ml de estreptomicina) y se cultivaron en forma adicional en un incubador humidificado a 37 °C 5 % de CO₂.

Las PBMC se siembran en placas de 24 pozos a 5.0×10^6 células/pozo en un volumen de 200 µl RPMI 1640 (Invitrogen) que contiene 10% (v/v) de FBS y 1% Pen-Strep (Invitrogen).

Las PBMC se tratan con compuesto de prueba por medio de la adición de 25 µl de dilución del compuesto

concentrado en 10 veces al medio y se incuban durante 30 min a 37 °C, 5% de CO₂. Posteriormente, las PBMC se estimulan con GM-CSF humana recombinante (PeproTech) a una concentración final de 0.5 ng/ml por medio de la adición de 25 µl (concentrado en 10 veces) de activador de citocinas por pozo para obtener un volumen final de 250 µl. Las células se activan durante 30 min a 37 °C, 5% de CO₂.

Todos los compuestos se probaron en una sola partida de 20 µM, seguido por una serie de dilución 1/3, 8 dosis en total (20 µM, 6.6 µM, 2.2 µM, 0.74 µM, 0.25 µM, 0.082 µM, 0.027 µM y 0.009 µM) en una concentración final de 0.2% de DMSO.

Después de 30 min de estimulación de citocinas 250 µl de suspensión de células se transfieren a una placa de 96 pozos de fondo en V seguido por una centrifugación durante 5 min a 1000 rpm para sedimentar las células. El sobrenadante celular se retira y el sedimento se reconstituye en 100 µl de amortiguador de lisis 1x complementado con cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche Applied Sciences, Número de Producto 11836170001), seguido por la congelación de la muestra y el almacenamiento a -80 °C. 1x amortiguador de lisis se proporciona con el Kit Elisa de fosfo-STAT5 y contiene inhibidores de fosfatasa. Los niveles endógenos de STAT5 fosforilada se cuantifican por el uso de un Kit ELISA Sandwich PathScan® fosfo-STAT5 (Tyr694) de 96 pozos (Cell

Signaling, Número de Producto # 7113) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La actividad de HRP (HRP se conjuga con el anticuerpo secundario) se mide por medio de la adición de
5 100 µl de sustrato de luminol recién preparado (Sustrato ELISA de quimioluminiscencia BM (POD), Roche, Número de Producto 11582950001), la incubación durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad y medido en un
luminómetro de microplacas en Ascenso Thermo Scientific
10 Luminoskan (tiempo de integración de 200 ms).

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

Células de NK-92 (linfoma no hodgkiniano humano maligno, de la línea celular de interleucina-2 (IL-2)
15 dependiente de las células citolíticas naturales, ATCC # CRL-2407).

Las células de NK-92 se mantienen en un medio alfa, medio esencial mínimo (MEM, por sus siglas en inglés) sin ribonucleósidos y desoxirribonucleosidas, 2 mM de
20 L-glutamina, 2.2 g/L de bicarbonato de sodio (Invitrogen, Número de Producto 22561-021) que contiene 0.2 mM de mio-inositol, 0.1 mM 2-mercapto-EtOH, ácido fólico 0.1 mM, 12.5% de suero de caballo inactivado por calor (Invitrogen, Número de Producto 26050-088), 12.5% de FBS inactivado por
25 calor, 1% de Pen-Strep (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de

estreptomycin) y 10 ng/ml de IL-2 recombinante humana (R&D Systems). La IL-2 se añade nuevamente al medio con cada paso de actualización del medio. Las células se cultivan en un incubador humidificado a 37 °C, 5% de CO₂.

5 Una fracción subcultivada de células de NK-92 se lavan una vez en un medio simple, sin rhIL-2 y se siembran en placas de 24 pozos a 0.5E06 células/pozo en un volumen de 400 µl de medio alfa MEM llano sin rhIL-2 que contiene 0.2 mM de mio-inositol, 0.1 mM de 2-mercaptoetanol, 0.1 mM de ácido
10 fólico, 12.5% de suero de caballo inactivado por calor (Invitrogen, Número de Producto 26050-088), 12.5% de FBS inactivado por calor, 1% de Pen-Strep (Invitrogen).

Las células de NK-92 se tratan con compuestos de prueba durante 30 min antes de la estimulación de rhIL-12 por
15 medio de la adición de 50 µl de dilución de compuesto concentrado en 10 veces e incubación a 37 °C, 5% de CO₂. Después de 30 min de pretratamiento del compuesto/vehículo, las células se estimulan con IL-12 humana recombinante (R&D Systems, Número de Producto 219-IL) a una concentración final
20 de 25 ng/ml por medio de la adición de 50 µl (concentrado en 10 veces) de activador de citocinas para obtener un volumen final de 500 µl por pozo. Las células de NK-92 se activan con rhIL-12 durante 30 min a 37 °C, 5% de CO₂.

Todos los compuestos se probaron en una sola
25 partida de 20 µM, seguido por una serie de dilución 1/3, 8

dosis en total (20 μ M, 6.6 μ M, 2.2 μ M, 0.74 μ M, 0.25 μ M, 0.082 μ M, 0.027 μ M y 0.009 μ M) en una concentración final de 0.2% de DMSO.

Los niveles de fosfato STAT4 en rhIL-12 estimuladas
5 células de NK-92 se cuantifican por medio de un análisis de
citometría de flujo en un citómetro de flujo Gallios™
(Beckman Coulter). Después de 30 min de estimulación de
citocinas de las células se fijan por medio de la adición de
500 μ l de amortiguador de fijación Cytofix BD pre-calentado
10 (BD PPhosFlow™, Número de Producto 554655) inmediatamente a
los pozos (las células se fijan inmediatamente con el fin de
mantener el estado de fosforilación, en lugar de girar las
células hacia abajo, se recomienda fijar las células por
medio de la adición de un volumen igual de Amortiguador BD
15 Cytofix precalentado a la suspensión celular). Las células se
incuban durante 10 min a 37 °C. La fracción de células
fijadas se resuspende (1 ml) y se transfiere a tubos de FACS
seguido por una etapa de centrifugación (300x g, 10 min) y la
eliminación del sobrenadante. El sedimento de células se
20 mezcla (vórtice) y las células se permeabilizan por medio de
la adición de 1 ml de Amortiguador PhosFlow Perm III BD (BD
Phosflow™, Número de Producto 558050) seguido por incubación
en hielo durante 30 min. Después del paso de
permeabilización, las células se lavan dos veces con
25 Amortiguador de Tinción BD Pharmingen™ (BD Pharmingen, Número

de Producto 554656) con intermedio de la centrifugación a 300x g durante 10 min y la eliminación del sobrenadante. El sedimento (0.5E06 células) se resuspende en 100 µl de Amortiguador de Tinción BD Pharmingen™ y se tiñen por medio
5 de la mezcla de 20 µl de PE de ratón anti-STAT4 (pY693) a las células (BD Phosflow™, PE de ratón anti-STAT4 (pY693), Número de Producto 558249), después se incuban durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células teñidas se lavan una vez con 2 ml de Amortiguador de Tinción BD
10 Pharmingen™ y se resuspenden en 500 µl de Amortiguador de Tinción BD Pharmingen™ y se analizan en un citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter).

Para todos los análisis, las células muertas y los desechos se excluyen por medio de dispersión frontal (FSC, por sus siglas en inglés) y dispersión lateral (SSC, por sus
15 siglas en inglés). Los cambios en la fosforilación de proteínas STAT4 después de la estimulación de citocinas son aproximados por medio del cálculo de la intensidad de fluorescencia X-mediana o X-media (MFI) por célula en el 100%
20 de la fracción cerrada para todas las muestras, estimuladas por citocinas, de compuesto de prueba y no estimuladas.

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

Las muestras no estimuladas (sin activador/vehículo
25 (0.2% DMSO) se utilizan como un control positivo (100% de

inhibición). Como control negativo (0% de inhibición), se utilizan las muestras estimuladas (activador/vehículo (0.2% DMSO)). Los controles positivos y negativos se utilizan para calcular los valores de Z' y "porcentaje de inhibición (PIN, por sus siglas en inglés)".

El porcentaje de inhibición se calcula a partir de:

$$\text{porcentaje de inhibición} = \frac{\text{RLCU (activador/veh)} - \text{RLCU (compuesto de prueba)}}{\text{RLCU (activador/veh)} - \text{RLCU (sin activador/veh)}} * 100$$

10 donde

RCLU (activador/veh): señal quimioluminiscente relativa determinada en presencia del vehículo y el activador

RCLU (compuesto de prueba): señal quimioluminiscente relativa determinada en presencia de los compuestos de prueba)

RCLU (sin activador/veh): señal quimioluminiscente relativa determinada en presencia del vehículo sin activador.

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

Los valores de PIN se trazan para los compuestos probados en dosis-respuesta y valores de EC₅₀ se derivan por el uso de GraphPad Prism Software aplicando un ajuste de curvas de regresión no lineal (sigmoidea).

5.2. Mutaciones de JAK1 en cáncer de pulmón y ensayo de líneas celulares de carcinoma hepatocelular.

5.2.1. Señalización constitutiva inducida por mutación de JAK1

5 Las líneas celulares de cáncer con y sin mutaciones de JAK1 (Tabla I - líneas celulares de cáncer de pulmón) se cultivan con o sin suero durante 4 a 6 h, estimulado o no con un cóctel de citocinas (INF γ , IL2, IL4 e IL6) durante 5, 10, 30 y 45 min. La fosforilación de JAK1, STAT1, STAT3 y STAT5
10 es evaluada por medio de inmunotransferencia (anticuerpos de señalización celular).

5.2.2. Ataque a JAK1 mutantes por el uso de inhibidores de JAK

5.2.2.1. Fosforilación de la vía de JAK-STAT:

15 Las líneas celulares de cáncer con y sin mutaciones de JAK1 se cultivan en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de inhibidores de JAK. Las células se analizan a las 24 y 48 h para inhibición de vía de JAK-STAT eficaz por inmunotransferencia.

20

25

Tabla I: líneas celulares de cáncer de pulmón ilustrativas

Gen	Línea celular	Tejido	Cambio	Dominio de la proteína	Presentes en el tejido primario
JAK1	NCIH1915	Pulmón	I62V	FERM	—
JAK1	SQ1	Pulmón	N226S	FERM	—
JAK1	HCC4006	Pulmón	S383G	FERM	—
JAK1	NCIH2066	Pulmón	L423V	Entre dominios (FERM y SH2)	—
JAK1	NCIH1793	Pulmón	H525Y	SH2	—
JAK1	HCC95	Pulmón	N833S	Proteína cinasa 1	Sí
JAK1	VMRCLCD	Pulmón	E223 *	—	—
JAK1	NCIH1563	Pulmón	Q161 *	—	—
WT JAK1	A549	Pulmón	—	—	—
JAK1 -/-	U4C	Fibrosarcoma	—	—	—

*: Truncamiento

5.2.2.2. **Viabilidad celular**

Ensayo 2D: líneas celulares de cáncer con y sin mutaciones de JAK1 se cultivan en la presencia o ausencia de concentraciones crecientes de inhibidores de JAK. Después de 48 a 72 h, la viabilidad celular se mide por el uso del ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminescent (Promega) o el ensayo MTT. En forma alternativa, se analizan líneas celulares de cáncer en diferentes puntos de tiempo de cultivo con una concentración fija de inhibidor de JAK para

la viabilidad celular por el uso de ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminescent (Promega) o el ensayo MTT.

Ensayo 3D: líneas celulares de cáncer con y sin mutaciones de JAK1 se siembran en un medio de agar semisólido. La formación de colonias multicelulares se mide por medio de la determinación de la viabilidad celular por el uso de un colorante fluorescente en diferentes puntos de tiempo de cultivo. La adición de inhibidores potenciales después de la siembra de células permite el análisis de los efectos anti-cancerígenos.

5.2.3. Investigación de mutaciones de JAK1 humanos en células Ba/F3 murinas

(De acuerdo con lo ilustrado en: Kan et al, 2013.; Staerk et al., 2005; Zenatti et al., 2011)

Construcción de vectores de expresión de JAK1: secuencias de JAK1 de tipo salvaje y humanos mutantes se clonan en vectores retrovirales y clones verificados por secuenciación.

La infección retroviral de células Ba/F3: Células Ba/F3 se infectan con sobrenadantes retrovirales producidos en células 293T.

Células Ba/F3 que expresan WT o JAK1 mutado humano se cultivan con o sin IL-3 durante 4 h y la fosforilación de la vía de JAK-STAT se evalúa por medio de inmunotransferencia.

El potencial transformador de las mutaciones de *JAK1* se evalúa por medio de la medición de la capacidad de cada mutación para inducir el crecimiento autónomo cuando se expresa en células Ba/F3 dependientes de citocinas.

5 El crecimiento celular se evalúa en ausencia de la citocina IL-3.

Las líneas celulares de *JAK1* mutante transducidas Ba/F3 se evalúan por su sensibilidad a los inhibidores de JAK por medio del cultivo de las mismas en presencia o ausencia
10 de concentraciones crecientes de inhibidores de JAK. Después de 48 a 72 h, la viabilidad celular se mide por el uso del ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminescent (Promega) o el ensayo MTT. En forma alternativa, se analizaron líneas celulares de cáncer en diferentes puntos
15 de tiempo de cultivo con una concentración fija de inhibidor de JAK para la viabilidad celular por el uso del ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo Luminescent (Promega) o el ensayo MTT.

20 5.2.4. ***Potencial tumorigénico in vivo de las mutaciones de JAK1***

5.2.4.1. Modelo de xenoinjerto:

Las células de expresión de *JAK1* mutante se inyectan por vía subcutánea en ratones CD1 nu/nu o ratones *Rag1*^{-/-} y se evalúa la progresión del tumor. Se establecen
25 las curvas de crecimiento del volumen del tumor subcutáneo.

Se determina la transplantabilidad de tumores primarios en los animales receptores secundarios.

5.2.4.2. **Modelo PDX.**

Los xenoinjertos derivados de pacientes (PDX, por sus siglas en inglés) se basan en la transferencia de tumores primarios (que contienen mutaciones de JAK1) directamente desde el paciente a un ratón inmunodeficiente. Para lograr esto, los tumores de pacientes se deben obtener frescos de la cirugía, momento en el que son mecánicamente o químicamente digeridos, con una pequeña porción guardada como una acción principal y establecida en un ratón NOD-SCID. Los modelos de PDX se mantienen por medio de células pasantes directamente de ratón a ratón una vez que la carga tumoral se vuelve demasiado alta. Los tumores pueden ser injertados heterotópicamente (implantación de los tumores en el flanco subcutáneo de un ratón) u ortotópicamente (implantación directa al órgano de ratón de elección).

La fosforilación de JAK1, STAT1, STAT3 y STAT5 en tumores primarios y secundarios son evaluados por inmunotransferencia.

5.3. **Ensayo de Proliferación PBL**

Los linfocitos de sangre periférica humana (PBL, por sus siglas en inglés) se estimularon con IL-2 y la proliferación se mide por el uso de un ensayo de incorporación de BrdU. Los PBL se estimulan primero durante

72 h con PHA para inducir el receptor de IL-2, a continuación, se mantienen en ayunas durante 24 h para detener la proliferación de células seguido por la estimulación de IL-2 durante otras 72 h (que incluyen el etiquetado de BrdU durante 24h). Las células se preincubaron con compuestos de prueba 1 h antes de la adición de IL-2. Las células se cultivaron en un medio RPMI 1640 que contiene 10% (v/v) de FBS.

5.4. ***Ensayo de sangre entera humana (hWBA)***

10 ***5.4.1. Protocolo 1***

5.4.1.1. Protocolo de estimulación de IL-6

Se lleva a cabo un análisis de citometría de flujo para establecer la selectividad del compuesto JAK1 sobre JAK2 *ex vivo* por el uso de sangre entera humana. Por lo tanto, se extrae sangre de voluntarios humanos que dieron su consentimiento informado. La sangre se equilibra después durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave, a continuación, se dividieron en alícuotas en tubos Eppendorf. El compuesto se añade a diferentes concentraciones y se incuba a 37 °C durante 30 minutos bajo agitación suave y posteriormente se estimula durante 20 min a 37 °C bajo agitación suave con interleucina 6 (IL-6) para la estimulación de la vía dependiente de JAK1 o GM-CSF para la estimulación de la vía dependiente de JAK2. Fosfo-STAT1 y fosfo-STAT5 después se evalúan por el uso de análisis FACS.

5.4.1.2. *Ensayos Fosfo-STAT1*

5.4.1.2.1. *Preparación de los reactivos*

El amortiguador 5X de Lyse/Fix (BD PhosFlow, Núm. de Cat. 558049) se diluye 5 veces con agua destilada y previamente calentada a 37 °C. El amortiguador diluido de Lyse/Fix restante se desecha.

10 µg de rhIL-6 (R&D Systems, Núm. de Cat. 206-IL) se disuelve en 1 ml de PBS, 0.1% de BSA para obtener una solución madre de 10 µg/ml. La solución madre se divide en 10 alícuotas y se almacena a -80 °C.

Se prepara una serie de diluciones de 3 veces del compuesto en DMSO (10 mM de solución madre). Las muestras de control tratadas recibieron DMSO en lugar de compuesto. Todas las muestras se incuban con una concentración final de DMSO 15 1%.

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

La sangre humana se recoge en tubos heparinizados. La sangre se divide en alícuotas de 148.5 µL. Después, 1.5 µl de la dilución del compuesto de prueba se añade a cada alícuota de sangre y las muestras de sangre se incuban durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave. Uno microlitro y medio de solución madre de IL-6 diluida 10 veces se añade a las muestras de sangre (concentración final 10 ng/ml) y las 25 muestras se incuban a 37 °C durante 20 min bajo agitación

suave.

5.4.1.2.3. *Preparación de glóbulos blancos*

Al final del período de estimulación, 3 ml de amortiguador de Lyse/Fix 1X precalentado inmediatamente se
5 añade a las muestras de sangre, se agitan brevemente y se incuban durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

Los tubos se centrifugan durante 5 min a 400 xg a 4 °C. El sedimento celular se lavó con 3 ml de PBS 1X frío, y
10 después de la centrifugación, el sedimento celular se resuspende en 100 µl de PBS 1X helado y se añaden 900 µL de MeOH enfriado con hielo al 100%. Después las células se incuban a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

Las células permeabilizadas se lavan después con
15 PBS 1X que contiene BSA al 3% y finalmente se resuspende en 80 µL de PBX 1X que contiene 3% de BSA.

5.4.1.2.4. *Etiquetado celular con anti fosfo-STAT1 y anticuerpos anti-CD4*

Se añaden 20 µL de ratón anti-PE STAT1 (pY701) o
20 anticuerpo de control de isotipo PE ratón IgG2a_κ (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612564 y 559319, respectivamente) y anticuerpo anti-CD4 conjugado con FITC o anticuerpo de isotipo conjugado con FITC de control y se mezclan, después se incuban durante 30 min a 4 °C, en la oscuridad.

25 Posteriormente las células se lavan una vez con PBS

1X y se analizan en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

5.4.1.2.5. *Análisis de fluorescencia en FACSCanto II*

5 Se cuentan 50.000 eventos totales y se miden células positivas fosfo-STAT1 después de abrirse en células CD4⁺, en la compuerta de linfocitos. Los datos se analizan por el uso del software FACSDiva y el porcentaje de inhibición de estimulación de IL-6 calculada a partir del
10 porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 en las células CD4⁺.

5.4.1.3. *Ensayo fosfo-STAT5*

Preparación de los reactivos

El amortiguador 5X de Lyse/Fix (BD PhosFlow, Núm. de Cat. 558049) se diluye 5 veces con agua destilada y
15 previamente calentada a 37 °C. El resto del amortiguador de Lyse/Fix diluido se descarta.

Una cantidad de 10 µg de rhGM-CSF (Abcys S.A., Núm. de Cat. P300-03) se disuelve en 100 µl de PBS, 0.1% de BSA
20 para obtener una solución madre 100 µg/ml. La solución madre se almacena en alícuotas a -80 °C.

Se prepara una serie de diluciones de 3 veces del compuesto en DMSO (10 mM de solución madre). Las muestras de control tratadas reciben DMSO sin el compuesto de prueba.
25 Todas las muestras se incuban con una concentración final de

DMSO al 1%.

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

La sangre humana se recoge en tubos heparinizados.

5 La sangre se divide en alícuotas de 148.5 μ L. Después, 1.5 μ L de dilución del compuesto se añade a cada alícuota y las muestras de sangre se incuban durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave. Una dilución de 5000 veces de la solución madre de GM-CSF (1.5 μ L) se añade a las muestras de sangre
10 (concentración final 20 pg/ml) y las muestras se incuban a 37 °C durante 20 min bajo agitación suave.

5.4.1.3.2. *Preparación de glóbulos blancos*

Al final del período de estimulación, 3 ml de amortiguador de Lyse/Fix 1X pre-calentado inmediatamente se
15 añade a las muestras de sangre, se agitan brevemente y se incuban durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de lisar los glóbulos rojas y fijar los leucocitos.

Los tubos se centrifugan durante 5 min a 400 x g a 4 °C. El sedimento celular se lava con 3 ml de PBS
20 1X frío, y después de la centrifugación, el sedimento celular se resuspende en 100 μ L de PBS 1X helado y se añaden 900 μ L de MeOH enfriado con hielo al 100%. Después las células se incuban a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

25 5.4.1.3.3. *Etiquetado celular con anticuerpos anti-fosfo*

STAT5 y anti-CD33

Se añaden 20 µL de PE de ratón anti-STAT5 (pY694) o anticuerpo de control de isotipo PE de ratón IgG1k (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612567 y 554680. respectivamente) y
5 el anticuerpo de ratón APC anti CD33 (BD Biosciences Núm. de Cat. 345800) o anticuerpo de control isotipo IgG1 de ratón APC (BD Biosciences Núm. de Cat. 345818), a continuación se mezclan, se incuban durante 30 min a 4 °C, en la oscuridad.

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

5.4.1.3.4. Análisis de fluorescencia en FACSCanto II

Se cuentan 50,000 eventos totales y células
15 positivas fosfo-STAT5 se miden después de abrirse en las células CD33⁺. Los datos se analizan por el uso del software FACSDiva y corresponden al porcentaje de inhibición de la estimulación de GM-CSF calculado a partir del porcentaje de células positivas para el fósforo-STAT5 sobre las células
20 CD33⁺.

5.5. Protocolo 2

5.5.1. Protocolo de estimulación

Se lleva a cabo un análisis de citometría de flujo para establecer la selectividad del compuesto JAK1 sobre JAK2
25 *ex vivo* por el uso de sangre entera humana. Por lo tanto, se

extrae sangre de voluntarios humanos que dieron su consentimiento informado. La sangre se equilibra después durante 30 min a 37 °C bajo agitación suave, a continuación, se divide en alícuotas en tubos Eppendorf. El compuesto se
5 añade a diferentes concentraciones y se incuba a 37 °C durante 30 minutos bajo agitación suave y posteriormente se estimula durante 20 min a 37 °C bajo agitación suave con interleucina 6 (IL-6) para la estimulación de la vía dependiente de JAK1, interferón alfa (IFN α) para la
10 estimulación de la vía de JAK1/TYK2, interleucina 2 (IL-2) para la estimulación de la vía de JAK1/JAK3 o GM-CSF para la estimulación de la vía dependiente de JAK2. Los niveles de fosfo-STAT1 (IL-6 y células estimuladas con IFN α) y fosfo-STAT5 (células estimuladas para IL-2 y GM-CSF) se evalúan por
15 medio del análisis FACS.

5.5.2. *Ensayos Fosfo-STAT*

5.5.2.1. *Preparación de los reactivos*

El amortiguador 5X de Lyse/Fix (BD PhosFlow, Núm. de Cat. 558049) se diluye 5 veces con agua destilada y
20 previamente calentada a 37 °C. El amortiguador diluido de Lyse/Fix restante se desecha.

Una cantidad de 10 μ g de rhIL-6 (R&D Systems, Núm. de Cat. 206-IL) se disuelve en 1 ml de PBS + BSA al 0.1% para obtener una solución madre de 10 μ g/ml. La solución madre se
25 divide en alícuotas y se almacena a -80 °C.

Una cantidad de 10 μg de rhIL-2 (R&D Systems, Núm. de Cat. 202-IL) se disuelve en 1 ml de PBS + BSA al 0.1% para obtener una solución madre de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La solución madre se divide en alícuotas y se almacena a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 Una cantidad de 5 μg de rhGM-CSF (Abcys SA, Núm. de Cat. P300-03) se disuelve en 12.5 ml de PBS + BSA al 0.1% para obtener una solución madre de 400 ng/ml. La solución madre se almacena en alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se prepara una serie de diluciones de 3 veces del
10 compuesto en DMSO (10 mM de solución madre). Las muestras tratadas con el control recibieron DMSO en lugar de compuesto. Todas las muestras se incuban con una concentración final de DMSO al 1%.

5.5.2.2. *Incubación de la sangre con el compuesto y*
15 *estimulación con activadores*

La sangre humana se recoge en tubos heparinizados. La sangre se divide en alícuotas de 148.5 μL . Después, 1.5 μl de la dilución del compuesto de prueba se añade a cada alícuota de sangre y las muestras de sangre se incuban
20 durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo agitación suave. Se añade un microlitro y medio diluido 10 veces en una solución madre de IL-6, 1.5 μl de solución madre de uIFN α (PBL Biomedical, Núm. de Cat. 11200-1), 1.5 μl de solución madre de IL-2 diluida 25 veces o 1.5 μl de solución madre de GM-CSF diluida
25 200 veces a las muestras de sangre y las muestras se incuban

a 37 °C durante 20 min bajo agitación suave.

5.5.2.3. *Preparación de glóbulos blancos*

Al final del período de estimulación, 3 ml de amortiguador de Lyse/Fix 1X pre-calentado inmediatamente se
5 añade a las muestras de sangre, se agitan brevemente y se incuban durante 15 min a 37 °C en un baño de agua con el fin de lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos.

Los tubos se centrifugan durante 5 min a 400 xg a 4 °C. El sedimento celular se lava con 3 ml de PBS 1X frío, y
10 después de la centrifugación, el sedimento celular se resuspende en 100 µl de PBS 1X helado y se añaden 900 µL de MeOH enfriado con hielo al 100%. Después, las células se incuban a 4 °C durante 30 min para la permeabilización.

Las células permeabilizadas se lavan después con
15 PBS 1X que contiene BSA al 3% y finalmente se resuspenden en 80 µl de PBX 1X que contiene 3% de BSA.

5.5.2.4. *Etiquetado celular*

Se añaden 20 µL de PE de ratón anti-STAT1 (pY701) o anticuerpo de control de isotipo IgG2aκ PE de ratón (BD
20 Biosciences, Núm. de Cat. 612564 y 559319, respectivamente) y anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC o anticuerpo de isotipo conjugado con APC de control (BD Biosciences, Núm. de Cat. 555349 y 555751, respectivamente) a tubos estimulados con IL-6 y IFN α y se mezcla, a continuación, se incuban durante
25 20 min a 4 °C, en la oscuridad.

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

Se añaden 20 μ L de PE de ratón anti-STAT5 (pY694) o anticuerpo de control de isotipo PE de ratón IgG1k (BD Biosciences, Núm. de Cat. 612567 y 554680. respectivamente) y anticuerpo anti-CD33 de ratón APC (BD Biosciences Núm. de Cat. 345800) o anticuerpo de control de isotipo IgG1 de ratón APC (BD Biosciences Núm. de Cat. 345818) a tubos estimulados con GM-CSF, se mezclan y después se incuban durante 20 min a 4 °C, en la oscuridad.

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

20 5.5.2.5. *Análisis de fluorescencia en FACSCanto II*

Se cuentan 50.000 eventos totales y se miden las células fosfo-STAT1 positivos después de abrirse en las células CD4+, en la compuerta de linfocitos para células estimuladas con IL-6 e IFN α . Las células fosfo-STAT5 positivas se miden después de abrirse en las células CD4+, en

la compuerta de linfocitos para las células estimuladas con IL-2. Las células fosfo-STAT5 positivas se miden después de abrirse en las células CD33+. Los datos se analizan por el uso del software FACSDiva y el porcentaje de inhibición de la estimulación con IL-6 o IFN α calculada es a partir del porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 en las células CD4+. Para las células estimuladas con IL-2, los datos se analizan por el uso del software FACSDiva y el porcentaje de inhibición de la estimulación con IL-2 se calcula a partir del porcentaje de células positivas para fosfo-STAT1 en las células CD4+. Para las células estimuladas con GM-CSF, el porcentaje de inhibición de la estimulación con GM-CSF se calcula a partir del porcentaje de células positivas para fosfo-STAT5 sobre las células CD33+.

15 **Ejemplo 6. Modelos in vivo**

6.1. Modelo de CIA

6.1.1. Materiales

Se adquirieron adyuvante Completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés) y adyuvante incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés) de Difco. Se obtuvo colágeno bovino de tipo II (CII), lipopolisacárido (LPS), y Enbrel de Chondrex (Isle d'Abeau, Francia); Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, Francia), Whyett (jeringa inyectable de 25 mg, Francia) Acros Organics (Palo Alto, CA), respectivamente. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado reactivo

y todos los disolventes fueron de grado analítico.

6.1.2. **Animales**

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

6.1.3. **Artritis inducida por colágeno (CIA)**

Un día antes del experimento, se preparó una solución de CII (2 mg/ml) con ácido acético 0.05 M y se almacenó a 4°C. Justo antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes iguales de adyuvante (IFA) y CII por medio de un homogeneizador en una botella de vidrio pre-enfriada en un baño de agua helada. Pueden ser necesarios adyuvante adicional y homogeneización prolongada si no se forma una emulsión. Un volumen 0.2 ml de la emulsión se inyectó por vía intradérmica en la base de la cola de cada rata en el día 1, una segunda inyección intradérmica de refuerzo (solución CII en 2 mg/ml en CFA 0.1 ml de solución salina) se llevó a cabo en el día 9. Este método de inmunización fue modificado a partir de los métodos publicados (Jou et al., 2005; Sims et al., 2004).

6.1.4. **Diseño del estudio**

Los efectos terapéuticos de los compuestos se ensayaron en el modelo CIA de rata. Las ratas se dividieron

aleatoriamente en grupos iguales y cada grupo contenía 10 ratas. Todas las ratas se inmunizaron en el día 1 y se reforzaron el día 9. La dosificación terapéutica duró desde el día 16 al día 30. El grupo de control negativo fue tratado con vehículo (0.5% de MC) y el grupo de control positivo con Enbrel (10 mg/kg, 3 veces por semana. sc). Un compuesto de interés se probó en forma típica en 3 dosis, por ejemplo, 3, 10, 30 mg/kg, p.o.

6.1.5. ***Evaluación clínica de la artritis***

La artritis se obtuvo de acuerdo con el método de (Khachigian, 2006; Lin et al., 2007; Nishida et al., 2004). La inflamación de cada una de las cuatro patas se clasifica con la puntuación artrítica de la siguiente manera: 0- sin síntomas; 1- leve, pero el enrojecimiento y la inflamación de un tipo de articulación definida por ej., el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e inflamación aparentes limitada a dígitos individuales, en forma independiente del número de dígitos afectados; 2- enrojecimiento e inflamación moderados de dos o más tipos de articulaciones; 3- enrojecimiento e inflamación severa de toda la pata, que incluyen dígitos; 4- extremidad máximamente inflamada con la participación de múltiples articulaciones (artritis clínica acumulada, máxima puntuación de 16 por animal) (Nishida et al., 2004).

Para permitir el meta-análisis de múltiples estudios, los valores de las puntuaciones clínicas se

normalizaron de la siguiente manera:

AUC de la puntuación clínica (puntuación AUC):

El área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) desde el día 1 al día 14 se calculó para cada rata individual.

5 El AUC de cada animal se divide por el AUC promedio obtenido para el vehículo en el estudio de los que se obtuvieron los datos sobre ese animal y se multiplican por 100 (es decir, el AUC se expresó como un porcentaje del AUC promedio de los vehículos por estudio).

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

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

20 Clínicamente, la pérdida de peso corporal está asociado con la artritis (Rall y Roubenoff., 2004; Shelton et al., 2005; Walsmith et al, 2004). Por lo tanto, los cambios en el peso corporal después de la aparición de la artritis se pueden utilizar como un punto final no específico para
25 evaluar el efecto de los terapéuticos en el modelo de rata.

El cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis se calculó de acuerdo con lo presentado a continuación:

Ratones: $\frac{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana6})} - \text{Peso Corporal}_{(\text{semana5})}}{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana5})}} \times 100\%$

5 $\text{Peso Corporal}_{(\text{semana5})}$

Ratas: $\frac{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana4})} - \text{Peso Corporal}_{(\text{semana3})}}{\text{Peso Corporal}_{(\text{semana3})}} \times 100\%$

$\text{Peso Corporal}_{(\text{semana3})}$

10 6.1.7. **Radiología**

Se tomaron fotos de rayos X de las patas traseras de cada animal individual. Un número de identificación ciego aleatorio se asignó a cada una de las fotos, y la gravedad de la erosión ósea se clasificó por medio de dos puntuadores independientes con sistema de puntuación del Larsen radiológico de la siguiente manera: 0- normal con contornos óseos intactos y el espacio normal de las articulaciones; 1- ligera anormalidad con uno o dos de los huesos metatarsianos exteriores que muestra ligera erosión ósea; 15 2- anormalidad temprana definida con cualquiera de 3 a 5 de los huesos metatarsianos exteriores que muestra la erosión ósea; 3- anormalidad destructiva mediana con todos los huesos metatarsianos exteriores, así como también uno o dos de los huesos metatarsianos interiores que muestran erosiones óseas 20 definidas; 4- anormalidad destructiva severa con todos los

huesos metatarsianos que muestran una erosión ósea definida y por lo menos una de las articulaciones de los metatarsianos interiores erosionada por completo, dejando algo de contornos de la articulación ósea conservados en parte; 5- anormalidad mutilante sin contornos óseos. Este sistema de puntuación es una modificación de (Bush et al., 2002; Jou et al., 2005; Salvemini et al., 2001; Sims et al., 2004).

6.1.8. **Histología**

Después del análisis radiológico, las patas traseras de los ratones se fijaron en formalina al 10% tamponada con fosfato (pH 7.4), descalcificadas con descalcificante óseo rápido para histología fina (Laboratories Eurobio) y embebidos en parafina. Para asegurar una extensa evaluación de las articulaciones artríticas, por lo menos cuatro secciones seriadas (5 μ m de espesor) se cortaron y cada serie de secciones fue de 100 μ m en el medio. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los exámenes histológicos de la inflamación sinovial y el daño en los huesos y cartílagos se llevaron a cabo a doble ciego. En cada pata, se evaluaron cuatro parámetros mediante el uso de una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron infiltración celular, gravedad de paño, erosión del cartílago y erosión ósea. La puntuación se llevó a cabo de acuerdo con lo presentado a continuación: 1- normal, 2- leve, 3- moderada, 4- marcada. Estas cuatro puntuaciones se suman y

se representan como una puntuación adicional, a saber, la "puntuación total de RA".

6.1.9. Análisis por Tomografía micro-computarizada (μ CT) de calcáneo (hueso del talón):

5 La degradación ósea observada en la RA se produce sobre todo en el hueso cortical y puede ser revelada por el análisis de μ CT (Oste et al., 2007; Sims et al., 2004). Después de la exploración y el volumen de la reconstrucción 3D del hueso calcáneo, la degradación ósea se mide como el
10 número de objetos discontinuos presentes por diapositiva, aislados in silico perpendicular al eje longitudinal del hueso. Cuanto más se degrada el hueso, se miden más objetos discretos. Se analizan 1000 rodajas, distribuidas uniformemente a lo largo del calcáneo (espaciadas por
15 aproximadamente 10.8 μ m).

6.1.10. PK de estado estacionario

 En el día 7 u 11, se recogieron muestras de sangre en el seno retro-orbital con heparina de litio como anticoagulante en los siguientes puntos de tiempo: antes de
20 la dosis, 1, 3 y 6 h. Las muestras de sangre entera se centrifugaron y las muestras de plasma resultantes se almacenan a -20 °C a la espera del análisis. Las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de prueba se
25 determinaron por un método LC-MS/MS en el que el espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de

electropulverización positiva. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon por el uso de Winnonlin® (Pharsight®, Estados Unidos) y se supuso que los niveles plasmáticos previos a la dosis fueron iguales a los niveles de plasma de 24 h.

6.2. **Modelos de Oncología**

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

6.3. **Modelo de IBD de ratón**

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

6.4. **Modelo de asma en ratón**

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

6.5. **Modelo murino de hiperplasia epidérmica similar a psoriásica inducida por inyecciones intradérmicas de IL22 o IL23**

6.5.1. **Materiales**

La IL22 de ratón recombinante (582-ML-CF), libre de portador es proporcionada por R&D systems. La IL23 de ratón

recombinante, libre de portador (14-8231, CF) es proporcionada por e-Bioscience.

6.5.2. *Animales*

5 Ratones Balb/c (hembras, de peso corporal de 18 a 20g) se obtienen de CERJ (Francia). Los ratones se mantienen en un ciclo de 12 h luz/oscuridad (07:00 a 19:00). La temperatura se mantiene a 22 °C, la comida y el agua se proporcionan *ad libitum*.

6.5.3. *Diseño del estudio*

10 El diseño del estudio es una adaptación de Rizzo et al, 2011.

En el primer día (D1), los ratones se afeitan en torno a las dos orejas.

15 Por 4 días consecutivos (D1 a D4), los ratones recibieron una dosis intradérmica diaria de IL22 o IL23 de ratón recombinante (1 µg/20 µL en PBS/BSA al 0.1%) en el pabellón de la oreja derecha y 20 µL de PBS/0.1% de BSA en la pabellón de la oreja izquierda bajo anestesia inducida por inhalación de isoflurano.

20 De D1 a D5, los ratones se dosifican con el compuesto de prueba (10. 30. o 100 mg/kg, po, qd en MC 0.5%), 1 h antes de la inyección de IL23/IL22 o con vehículo.

6.5.4. *Evaluación de la enfermedad*

25 El espesor de ambas orejas se midió diariamente con una pinza automática. El peso corporal se evaluó al inicio y

en el momento del sacrificio. El quinto día, 2 horas después de la última dosis, se sacrifican los ratones. El pabellón auricular de la oreja se corta, con exclusión de los cartílagos. Los pabellones de la oreja se pesan y después se
5 colocan en un vial que contiene 1 ml de solución ARN o en formaldehído.

En el D4, las muestras de sangre también se recogen del seno retro-orbital para el perfil PK justo antes de la dosificación (T0) y 1 h, 3 h, 6 h después de la dosificación.

10 Hay 8 ratones por grupo. Los resultados se expresan como media $\pm$ sem y el análisis estadístico se lleva a cabo por el uso de Anova de una vía seguido por la prueba de Dunnett post-hoc contra los grupos de vehículos IL22 o IL23.

6.5.5. *Histología*

15 Después del sacrificio, las orejas se recolectan y se fijan en formaldehído al 3.7% antes de inclusión en parafina. Se elaboran secciones de 2 μ m de espesor se hacen y se tiñen con hematoxilina y eosina. El espesor de la epidermis de la oreja se mide por análisis de imagen
20 (Sis'Ncom software) con 6 imágenes por oreja capturada en un aumento x20. Los datos se expresan como media $\pm$ sem y el análisis estadístico se lleva a cabo por el uso de Anova de una vía seguido por la prueba de Dunnett post-hoc contra grupos de vehículos IL22 o IL23.

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

Los niveles de transcripción de IL-17a, IL-22, IL-1 β , LCN2 y S100A9 en tejido de la oreja se determinan por el uso de PCR cuantitativa en tiempo real.

5 ***Ejemplo 7. Ensayos de Farmacocinética, ADME y Toxicidad***

7.1. Solubilidad termodinámica

El compuesto de prueba se añade a un amortiguador de fosfato 0.2 M, pH 7.4 o amortiguador de citrato 0.1 M, pH
10 3.0 a una concentración de 1 mg/ml en un vial de vidrio.

Las muestras se hacen girar en una unidad de rotador STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) a una velocidad de 3.0 a temperatura ambiente durante 24 h.

Después de 24 h, 800 μ L de la muestra se
15 transfieren a un tubo eppendorf y se centrifugan 5 min a 14,000 rpm. Un volumen de 200 μ l del sobrenadante de la muestra se transfieren después a una placa de Solubilidad MultiscreenR (Millipore, MSSLBPC50) y el sobrenadante se filtra (10 a 12 "Hg (25 cm a 30 cm Hg)) con la ayuda de un
20 colector de vacío en una placa de 96 pozos de fondo en V de polipropileno Greiner limpia (Núm. de Cat. 651201). Un volumen 5 μ l del filtrado se diluyen en 95 μ l (F20) del mismo amortiguador utilizado para incubar en la placa que contiene la curva estándar (Greiner, Núm. de Cat. 651201).

25 La curva estándar para el compuesto se prepara en

DMSO nueva a partir de 10 mM de solución madre de DMSO diluida en factor de 2 en DMSO (5000 μ M) y después se diluye en forma adicional en DMSO hasta 19.5 μ M. 3 μ L de la serie de dilución a partir 5000 μ M se transfiere entonces a una mezcla
5 de acetonitrilo-amortiguador de 97 μ L (50/50). El intervalo de concentración final es de 2.5 a 150 μ M.

La placa se sella con esteras de sellado (MA96RD-04S, www.kinesis.co.uk) y las muestras se miden a temperatura ambiente en LC-MS (ZQ 1525 de Waters) bajo
10 condiciones optimizadas por el uso de Quanoptimize para determinar la masa apropiada de la molécula.

Las muestras se analizaron en LC-MS con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El disolvente A es 15 mM de amoníaco y el disolvente B es acetonitrilo. La muestra se
15 ejecuta bajo pulverización de iones positivos en un columna C18 de 3.5 μ m XBridge (2.1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 min y varía desde 5% de B a 95% de B.

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

Los valores de solubilidad se indican en μ M o μ g/ml.

7.2 **Hidrosolubilidad**

25 A partir de una solución madre de 10 mM en DMSO,

una serie de dilución del compuesto se prepara en DMSO. La serie de dilución se transfiere a una placa de 96 NUNC Maxisorb de fondo plano (Núm. de Cat. 442404) y se añade 0.1 M de amortiguador de fosfato pH 7.4 o 0.1 M de amortiguador de citrato, pH 3.0 a temperatura ambiente.

La concentración final oscila entre 300 μM a 18.75 μM en 5 pasos iguales de dilución. La concentración final de DMSO no supera el 3%. Se añaden 200 μM de pireno a los puntos de esquina de cada placa de 96 pozos y sirve como un punto de referencia para la calibración del eje Z en el microscopio.

Las placas de ensayo se sellan y se incuban durante 1 h a 37 °C con agitación a 230 rpm. Las placas se exploran en el microscopio de luz blanca, para producir imágenes individuales del precipitado por concentración. El precipitado se analiza y se convierte en un número con una herramienta de software que se pueden trazar en un gráfico. La primera concentración a la que el compuesto parece disuelto por completo es la concentración informada; sin embargo, la verdadera concentración se encuentra entre esta concentración y un paso de dilución superior.

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

7.3. Unión a proteínas plasmáticas (Diálisis de Equilibrio)

10 mM de solución madre del compuesto en DMSO se diluye con un factor de 5 en DMSO. Esta solución se diluye en forma adicional en plasma recién descongelado de humano, rata, ratón o perro (BioReclamation INC) con una
5 concentración final de 5 μ M y la concentración final de DMSO del 0.5% (5.5 μ L en el plasma 1094.5 μ L en un PP-Masterblock de 96 pozos (Greiner, Núm. de Cat. 780285)).

Se prepara una placa de dispositivos Pierce RED con inserciones (ThermoScientific, Núm. de Cat. 89809) y se llena
10 con 750 μ L de PBS en la cámara del amortiguador y 500 μ L del plasma enriquecido en la cámara de plasma. La placa se incuba durante 4 h a 37 °C con agitación a 230 rpm. Después de la incubación, 120 μ L de ambas cámaras se transfieren a 360 μ L de acetonitrilo en placas de 96 pozos de fondo redondo de
15 pozo profundo de PP (Nunc, Núm. de Cat. 278743) y se sella con una tapa de papel de aluminio. Las muestras se mezclan y se colocan en hielo durante 30 min. Esta placa se centrifuga 30 min a 1200 rcf a 4 °C y el sobrenadante se transfiere a una placa PP 96 de fondo en V (Greiner, 651201) para el
20 análisis de LC-MS.

La placa se sella con esteras de sellado (MA96RD-04S) de www.kinesis.co.uk y las muestras se miden a temperatura ambiente en LC-MS (ZQ 1525 de Waters) bajo condiciones optimizadas por el uso de Quanoptimize para
25 determinar la masa apropiada de la molécula.

Las muestras se analizan en LC-MS con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El disolvente A es 15 mM de amoníaco y el disolvente B es acetonitrilo. La muestra se ejecuta bajo pulverización de iones positivos en una columna XBridge C18 de 3.5 μ M (2.1 x 30 mm), de Waters. El gradiente de disolvente tiene un tiempo de ejecución total de 2 min y varía desde 5% de B a 95% de B.

El área pico del compuesto en la cámara del amortiguador y la cámara de plasma se considera que son 100% del compuesto. El porcentaje unido al plasma se deriva de estos resultados y se informa como porcentaje unido al plasma.

La solubilidad del compuesto en la concentración de prueba final en PBS es inspeccionada por microscopio para indicar si se observó o no una precipitación.

7.4. ***Estabilidad de aldehído oxidasa***

10 mM de solución madre del compuesto de prueba en DMSO se diluye primero con agua (5 veces) para obtener una solución de trabajo de 50 μ M. Un inhibidor selectivo de aldehído oxidasa (hidralazina) se prepara en agua como una solución de 5 mM.

Las mezclas de incubación se preparan por medio de la adición de 10 μ l de una suspensión S9 del hígado (humano y de rata, BD Bioscience Gentest, 20 mg/ml) a 86 μ l de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 a 37 °C. Se

añade 2 μ l de hidralazina 5 mM (para la incubación con la adición de inhibidor selectivo) o 2 μ l de agua (para la incubación sin la adición del inhibidor).

Después de 5 min precalentamiento, la reacción se
5 inició por medio de la adición de 2 μ l de compuesto de prueba
50 μ M a las mezclas de incubación. Después de 0, 3, 6, 12,
18, y 30 min de incubación, la reacción (100 μ l) se termina
con 300 μ l de MeCN:MeOH (2:1) con 1% de mezcla de ácido
acético que contiene 10 ng/ml de warfarina como patrón
10 interno analítico.

Las muestras se mezclan, se centrifugan y el
sobrenadante se analizan por LC-MS.

Los compuestos de prueba se consideran como un
sustrato de aldehído oxidasa, si la depuración por S9 es
15 inhibida por la hidralazina. Una depuración específica de
especies de compuesto de prueba también puede indicar el
metabolismo por aldehído oxidasa.

Se incluye ftalazina como un control positivo.

Las respuestas del instrumento (relación de área de
20 pico del compuesto de prueba y el patrón interno) se hace
referencia a las muestras de tiempo cero puntos (considerados
como 100%) con el fin de determinar el porcentaje de
compuesto restante. Los gráficos del porcentaje de compuestos
de prueba restantes se utilizan para determinar la vida media
25 ($T_{1/2}$) y el aclaramiento intrínseco en las incubaciones S9 por

el uso del software Graph Pad Prism.

Para calcular la depuración intrínseca *in vitro* (CL_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$), se utiliza la siguiente fórmula:

$$CL_{int} = \frac{0.693}{T_{1/2}} * \frac{\text{volumen de incubación}}{\text{cantidad de proteína}} * 1000$$

7.5. ***Estabilidad microsómica del hígado***

10 mM de solución madre de compuesto en DMSO se
10 diluye en 6 μM en un amortiguador de fosfato de 105 mM, pH
7.4 en una placa de 96 pozos profundos (Greiner, Núm. de Cat.
780285) y pre-calentado a 37 °C.

Una solución madre de trabajo de glucosa-6-fosfato-
deshidrogenasa (G6PDH, Roche, 10127671001) de 700 U/ml se diluye
15 con un factor de 1:700 en un amortiguador de fosfato de 105 mM,
pH 7.4. Una mezcla de co-factor que contiene 0.528 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
(Sigma, M2670), 0.528 M de glucosa-6-fosfato (Sigma, G-7879) y
0.208 M NADP⁺ (Sigma, N-0505) se diluye con un factor de 1:8 en
un amortiguador de fosfato 105 mM, pH 7.4.

20 Se hace una solución de trabajo que contiene
1 mg/ml de microsomas hepáticos (Xenotech) de las especies de
interés (humano, ratón, rata, perro, ...), 0.8 U/ml G6PDH y
la mezcla de co-factor (6.6 mM MgCl_2 , 6.6 mM de
glucosa-6-fosfato, NADP⁺ 2.6 mM). Esta mezcla se pre-incubó
25 durante 15 min, pero nunca más de 20 min, a temperatura

ambiente.

Después de la pre-incubación, la dilución del compuesto y la mezcla que contiene los microsomas, se añaden juntos en la misma cantidad y se incuban durante 30 min a 300 rpm. Para el punto de tiempo de 0 min, se añaden dos volúmenes de MeOH a la dilución del compuesto antes de añadir la mezcla de microsomas. La concentración final durante la incubación son: 3 μ M de compuesto de prueba o compuesto de control, 0.5 mg/ml de microsomas, 0.4 U/ml de G6PDH, 3.3 mM de $MgCl_2$, 3.3 mM de glucosa-6-fosfato y 1.3 mM de NADP+.

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

Se mezclan las muestras de los dos puntos de tiempo, se centrifugan y se recoge el sobrenadante para el análisis de LC-MS/MS. Las respuestas de instrumentos (es decir, las alturas de los picos) se hace referencia a las muestras de tiempo de punto cero (como 100%) con el fin de determinar el porcentaje de compuesto restante. Los compuestos estándar propanolol y verapamilo están incluidos en el diseño del ensayo.

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

7.6. Estabilidad de los hepatocitos

Los modelos para evaluar la depuración metabólica

en hepatocitos son descritos por McGinnity et al. Drug Metabolism and Disposition 2008, 32, 11, 1247.

7.7. *Permeabilidad de Caco2*

Se llevan a cabo ensayos bi-direccionales Caco-2 de acuerdo con lo descrito a continuación. Las células de Caco-2 se obtienen a partir de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, Núm. de Cat. 86010202) y se utilizan después de un cultivo de células de 21 días en placas de 24 pozos Transwell (Fisher TKT-545-020B).

Se siembran 2×10^5 células/pozo en un medio de placas que consiste en DMEM + GlutaMAXI + 1% de NEAA + 10% de FBS (FetalClone II) + 1% de penicilina/estreptomicina. El medio se cambia cada 2 a 3 días.

Los compuestos de prueba y de referencia (propranolol y rodamina123 o vinblastina, todos adquiridos de Sigma) se preparan en solución salina equilibrada de Hanks que contenía 25 mM de HEPES (pH 7.4) y se añaden a cualquiera de las cámaras apicales (125 μ L) o basolateral (600 μ L) del montaje de placa Transwell a una concentración de 10 mM con una concentración final de DMSO de 0.25%.

Se añaden 50 μ M de Lucifer Yellow (Sigma) a la memoria intermedia de donantes en todos los pozos para evaluar la integridad de las capas de células por medio del control de permeación Lucifer Yellow. Dado que el Lucifer Yellow (LY) no puede penetrar libremente las barreras

lipofílicas, un alto grado de transporte LY indica una mala integridad de la capa de células.

Después de una 1 h de incubación a 37 °C mientras se agitaba en un agitador orbital a 150 rpm, se toman
5 alícuotas 70 µL tanto de cámaras apicales (A) y basales (B) y se añadieron a una solución de 100 µLl de acetonitrilo:agua 50:50 que contiene un estándar interno analítico (0.5 µM de carbamazepina) en una placa de 96 pozos.

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

Las concentraciones de compuesto en las muestras se miden por medio de cromatografía líquida de alta eficacia/espectroscopía de masas (LC-MS/MS).

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

$$P_{app} = \frac{[\text{compuesto}]_{\text{último receptor}} \times V_{\text{receptor}}}{([\text{compuesto}]_{\text{inicial donante}} \times V_{\text{donante}}) / T_{\text{inc}} \times V_{\text{donante}} / \text{área de superficie}} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

en donde:

20 V = volumen de la cámara

T_{inc} = tiempo de incubación.

Área de superficie = 0.33cm²

Las relaciones de eflujo, como una indicación de eflujo activo a partir de la superficie celular apical, se
25 calculan por el uso de la relación de $P_{app} B > A / P_{app} A > B$.

Se utilizan los siguientes criterios de aceptación del ensayo:

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

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

Permeabilidad del Lucifer Amarillo: ≤ 100 nm/s

7.8. *Permeabilidad de MDCKII-MDR1*

Las células MDCKII-MDR1 son células epiteliales de riñón canino Madin-Darby, que sobre-expresan el gen humano de resistencia a múltiples fármacos (MDR1), que codifica la P-glicoproteína (P-gp). Las células se obtienen del Netherlands Cancer Institute y se utilizan después de un cultivo de células de 3 a 4 días en placas de 24 pozos de inserción cultivo celular Millicell (Millipore, PSRP010R5). El ensayo de permeabilidad MDCKII-MDR1 bidireccional se lleva a cabo de acuerdo con lo descrito a continuación.

3×10^5 células/ml (1.2×10^5 células/pozo) se siembran en un medio de placas que consiste en DMEM + 1% Glutamax-100 + 1% de antibiótico/antimicótico + 10% de FBS (Biowest, S1810). Las células se dejan en una incubadora de CO₂ durante 3 a 4 días. El medio se cambia 24 horas después de la siembra y en el día de experimento.

Los compuestos de prueba y de referencia (amprenavir y propranolol) se preparan en amortiguador de fosfato salino de Dulbecco (D-PBS, a pH 7.4) y se añaden a

cualquiera de las cámaras apicales (400 μ L) o basolaterales (800 μ L) del montaje de placas de inserción del cultivo de células Millicell en una concentración final de 10 μ M (0.5 μ M en el caso del amprenavir) con una concentración final de DMSO del 1%.

Se añaden 100 μ M de Lucifer Yellow (Sigma) a todas las soluciones amortiguador de los donantes, con el fin de evaluar la integridad de las monocapas de células por medio del monitoreo de la permeación de Lucifer Yellow. Lucifer Yellow es un marcador fluorescente para la vía paracelular y se utiliza como un control interno en cada monocapa para verificar la integridad de la unión estrecha durante el ensayo.

Después de una 1 h de incubación a 37 °C mientras se agita en un agitador orbital a 150 rpm, se toman alícuotas de 75 μ L tanto de cámaras apicales (A) como basales (B) y se añaden a una solución de acetonitrilo:agua (2:1) de 225 μ L que contiene un estándar analítico interno (10 ng/ml de warfarina) en una placa de 96 pozos. También se lleva a cabo la división en alícuotas en el inicio del experimento a partir de soluciones donantes para obtener la concentración inicial (C_0).

La concentración del compuesto en las muestras se mide por medio de una cromatografía líquida de alta eficacia/espectroscopía de masas (LC-MS/MS).

El Lucifer Yellow se mide con un Fluoroscan Ascent FL Thermo Scientific (485 nm de Ex y 530 nm de Em) en una placa de 96 pozos que contiene 150 μ L de líquido de todos los pozos receptores (lado basolateral o apical).

5 7.9. ***Estudio farmacocinético en roedores***

7.9.1. Animales

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley (machos, de 5 a 6 semanas de edad) de Janvier (Francia). Las ratas se aclimatan durante por lo menos 7 días antes del tratamiento y
10 se mantienen en un ciclo de 12 h luz/oscuridad (0700 a 1900). La temperatura se mantiene a aproximadamente 22 °C, y la comida y el agua se proporcionaron *ad libitum*. Dos días antes de la administración de los compuestos de prueba, las ratas se sometieron a cirugía para colocar un catéter en la vena
15 yugular bajo anestesia con isoflurano. Después de la cirugía, las ratas se alojan individualmente. Las ratas son privadas de alimentos durante por lo menos 16 h antes de la administración oral y 6 horas después. Se provee agua *ad libitum*.

20 7.9.2. ***Estudio farmacocinético***

Los compuestos se formulan en una solución salina fisiológica con PEG200 (60/40) para la vía intravenosa y en 0.5% de metilcelulosa y 10% de hidroxipropil- β -ciclodextrina, pH 3 para la vía oral. Los compuestos de prueba se dosifican
25 por vía oral como una sola sonda esofágica a 5 mg/kg bajo un

volumen de dosificación de 5 ml/kg por vía intravenosa y dosificado como un bolo a través de la vena caudal en 1 mg/kg bajo un volumen de dosificación de 5 ml/kg. Cada grupo constaba de 3 ratas. Las muestras de sangre se recogen a través de la vena yugular con heparina de litio como anticoagulante en los siguientes puntos de tiempo: 0.05, 0.25, 0.5, 1, 3, 5 y 8 h (vía intravenosa), y 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 8 y 24 h (vía oral). En forma alternativa, las muestras de sangre se recogen en el seno retro-orbital con heparina de litio como anticoagulante en los siguientes puntos de tiempo 0.25, 1, 3 y 6 h (vía oral). Las muestras de sangre entera se centrifugan a 5000 rpm durante 10 min y las muestras de plasma resultantes se almacenan a -20 °C a la espera del análisis.

7.9.3. *Cuantificación de los niveles de compuesto en el plasma*

Las concentraciones plasmáticas de cada compuesto de prueba se determinan por un método LC-MS/MS en el que el espectrómetro de masas se opera en modo de electrospray positivo.

7.9.4. *Determinación de los parámetros farmacocinéticos*

Los parámetros farmacocinéticos se calculan por el uso de Winnonlin^{MR} (Pharsight^{MR}, Estados Unidos).

7.10. ***Estudio de toxicidad en ratas de 7 días***

Un estudio de toxicidad oral de 7 días con

compuestos de prueba se lleva a cabo en ratas Sprague-Dawley macho para evaluar su potencial tóxico y toxicocinética, en dosis diarias de 100, 300 y 500 mg/kg/día, por medio de alimentación forzada, a la dosis-volumen constante de 5 ml/kg/día.

Los compuestos de prueba se formulan en 30% (v/v) HP β CD en agua purificada. Cada grupo incluyó 5 ratas macho principales, así como también 3 animales adicionales para toxicocinética. Un cuarto grupo se le asigna 30% (v/v) HP β CD en sólo agua, a la misma frecuencia, el volumen de dosis y por la misma vía de administración, y actuó como el grupo de control del vehículo.

El objetivo del estudio es determinar la dosis más baja que no dio lugar a efectos adversos identificados (nivel sin efecto adverso observable - NOAEL).

7.11. ***Predisposición por la prolongación de QT***

El potencial para la prolongación del intervalo QT se evaluó en el ensayo de pinzamiento zonal hERG.

Se llevan a cabo registros de células enteras de pinzamiento zonal por el uso de un amplificador EPC10 controlado por software v8.77 de pulso (HEKA). La resistencia en serie en forma típica es de menos de 10 M Ω y se compensa en más del 60%, los registros que tenga fugas no se restan. Los electrodos se fabrican a partir de pipetas de vidrio GC150TF (Harvard).

La solución de baño externo contenía: 135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl_2 , 5 mM de glucosa, 10 mM de HEPES, pH 7.4.

La solución de la pipeta de parche interno
5 contenía: 100 mM de gluconato, 20 mM de KCl, 1 mM de CaCl_2 ,
1 mM de MgCl_2 , 5 mM de Na_2ATP , 2 mM de glutatión, 11 mM de
EGTA, 10 mM de HEPES, pH 7.2.

A los fármacos se les aplicó un sistema de perfusión rápida biológica MEV-9/EVH-9.

10 Todos los registros se llevaron a cabo en células
HEK293 que expresan establemente canales hERG. Las células se
cultivan en cubreobjetos redondos de 12 mm (vidrio alemán,
Bellco) anclados en la cámara de registro con dos barras de
platino (Goodfellow). Las corrientes de hERG se evocan por
15 medio de un pulso de activación a +40 mV durante 1000 ms,
seguido por un impulso de corriente de cola a -50 mV durante
2000 ms, el potencial de mantenimiento es -80 mV. Los pulsos
se aplican cada 20 seg. y todos los experimentos se llevan a
cabo a temperatura ambiente.

20 **OBSERVACIONES FINALES**

Aquéllos con experiencia en la técnica apreciarán
que las descripciones anteriores son representativas y
explicativas en la naturaleza, y pretenden ilustrar la
invención y sus modalidades preferidas. A través de la
25 experimentación de rutina, un artesano reconocerá

modificaciones evidentes y variaciones que se pueden hacer sin apartarse del espíritu de la invención. Todas estas modificaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas están destinadas a ser incluidas en el mismo. De este modo, la invención está destinada a ser no
5 definida por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

Todas las publicaciones, que incluyen pero no se limitan a las patentes y solicitudes de patentes, citadas en
10 esta descripción descriptiva se incorporan en esta descripción como referencia como si cada publicación individual se indicara en forma específica e individual para ser incorporada como referencia en la presente como si se expusieran por completo.

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

20 Por lo menos algunos de los nombres químicos del compuesto de la invención como dado y establecido en esta solicitud, puede haber sido generada de manera automatizada por el uso de un programa de software de nomenclatura química disponible comercialmente, y no han sido verificada en forma
25 independiente. Los programas representativos que llevan a

cabo esta función incluyen la herramienta de nombrado Lexichem comercializada por Open Eye, Software Inc. y la herramienta Autonom software comercializada por MDL, Inc. En el caso en el que el nombre químico indicado y la
5 estructura representada difieran, prevalecerá la estructura representada.

REFERENCIAS

Bundgaard, H., 1985. Design of produgs. Elsevier.

Bush, K.A., Farmer, K.M., Walker, J.S., Kirkham,
10 B.W., 2002. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. Arthritis Rheum. 46, 802 a 805. doi: 10.1002/art.10173

Choy, E.H.S., Panayi, G.S., 2001. Cytokine Pathways
15 and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. N. Engl. J. Med. 344, 907 a 916. doi: 10.1056/NEJM200103223441207

Clegg, D.O., Reda, D.J., Harris, C.L., Klein, M.A., O'Dell, J.R., Hooper, M.M., Bradley, J.D., Bingham, C.O., Weisman, M.H., Jackson, C.G., Lane, N.E., Cush, J.J.,
20 Moreland, L.W., Schumacher, H.R., Oddis, C.V., Wolfe, F., Molitor, J.A., Yocum, D.E., Schnitzer, T.J., Furst, D.E., Sawitzke, A.D., Shi, H., Brandt, K.D., Moskowitz, R.W., Williams, H.J., 2006. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. N.
25 Engl. J. Med. 354, 795 a 808. doi: 10.1056/NEJMoa052771

Constantinescu, S.N., Girardot, M., Pecquet, C.,
2008. Mining for JAK-STAT mutations in cancer. Trends
Biochem. Sci. 33, 122 a 131. doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.002

Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of
5 rheumatoid arthritis. Nature 423, 356 a 361. doi:
10.1038/nature01661

Geron, I., Abrahamsson, A.E., Barroga, C.F.,
Kavalerchik, E., Gotlib, J., Hood, J.D., Durocher, J., Mak,
C.C., Noronha, G., Soll, R.M., Tefferi, A., Kaushansky, K.,
10 Jamieson, C.H.M., 2008. Selective Inhibition of JAK2-Driven
Erythroid Differentiation of Polycythemia Vera Progenitors.
Cancer Cell 13, 321 a 330. doi: 10.1016/j.ccr.2008.02.017

Ip, W.K., Wong, C.K., Lam, C.W.K., 2006.
Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte
15 chemoattractant protein-1 expression in human bronchial
epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated
protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and
Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2
signalling pathways. Clin. Exp. Immunol. 145, 162 a 172. doi:
20 10.1111/j.1365-2249.2006.03085.x

Jou, I.-M., Shiau, A.-L., Chen, S.-Y., Wang, C.-R.,
Shieh, D.-B., Tsai, C.-S., Wu, C.-L., 2005. Thrombospondin 1
as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced
arthritis. Arthritis Rheum. 52, 339 a 344. doi:
25 10.1002/art.20746

Kan, Z., Zheng, H., Liu, X., Li, S., Barber, T.D.,
Gong, Z., Gao, H., Hao, K., Willard, M.D., Xu, J.,
Hauptschein, R., Rejto, P.A., Fernandez, J., Wang, G., Zhang,
Q., Wang, B., Chen, R., Wang, J., Lee, N.P., Zhou, W., Lin,
5 Z., Peng, Z., Yi, K., Chen, S., Li, L., Fan, X., Yang, J.,
Ye, R., Ju, J., Wang, K., Estrella, H., Deng, S., Wei, P.,
Qiu, M., Wulur, I.H., Liu, J., Ehsani, M.E., Zhang, C.,
Loboda, A., Sung, W.K., Aggarwal, A., Poon, R.T., Fan, S.T.,
Wang, J., Hardwick, J., Reinhard, C., Dai, H., Li, Y., Luk,
10 J.M., Mao, M., 2013. Whole-genome sequencing identifies
recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res.*
23, 1422 a 1433. doi: 10.1101/gr.154492.113

Khachigian, L.M., 2006. Collagen antibody-induced
arthritis. *Nat. Protoc.* 1, 2512 a 2516. doi:
15 10.1038/nprot.2006,393

Kopf, M., Bachmann, M.F., Marsland, B.J., 2010.
Averting inflammation by targeting the cytokine environment.
Nat. Rev. Drug Discov. 9, 703 a 718. doi: 10.1038/nrd2805

Kudlacz, E., Conklyn, M., Andresen, C., Whitney-
20 Pickett, C., Changelian, P., 2008. The JAK-3 inhibitor CP-
690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model
of pulmonary eosinophilia. *Eur. J. Pharmacol.* 582, 154 a 161.
doi: 10.1016/j.ejphar.2007.12.024

Lee, D.M., Weinblatt, M.E., 2001. Rheumatoid
25 arthritis. *The Lancet* 358, 903 a 911. doi: 10.1016/S0140-6736

(01) 06075-5

Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J.-P.,
Bogdanowicz, P., 2003. JAK/STAT but Not ERK1/ERK2 Pathway
Mediates Interleukin (IL)-6/Soluble IL-6R Down-regulation of
5 Type II Collagen, Aggrecan Core, and Link Protein
Transcription in Articular Chondrocytes ASSOCIATION WITH A
DOWN-REGULATION OF SOX9 EXPRESSION. J. Biol. Chem. 278, 2903
a 2912. doi: 10.1074/jbc.M110773200

Levy, D.E., Loomis, C.A., 2007. STAT3 Signaling and
10 the Hyper-IgE Syndrome. N. Engl. J. Med. 357, 1655 a 1658.
doi: 10.1056/NEJMe078197

Lin, H.-S., Hu, C.-Y., Chan, H.-Y., Liew, Y.-Y.,
Huang, H.-P., Lepescheux, L., Bastianelli, E., Baron, R.,
Rawadi, G., Clément-Lacroix, P., 2007. Anti-rheumatic
15 activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo
in collagen-induced arthritis in rodents. Br. J. Pharmacol.
150. 862 a 872. doi: 10.1038/sj.bjp.0707165

Li, W.Q., Dehnade, F., Zafarullah, M., 2001.
Oncostatin M-Induced Matrix Metalloproteinase and Tissue
20 Inhibitor of Metalloproteinase-3 Genes Expression in
Chondrocytes Requires Janus Kinase/STAT Signaling Pathway. J.
Immunol. 166, 3491 a 3498.

Menet, C.J.M., Schmitt, B.A., Geney, R.J.J., Doyle,
K.J., Peach, J., Palmer, N.J., Jones, G.P., Hardy, D., Duffy,
25 J.E.S., 2013. Imidazo [4, 5 -C] Pyridine Derivatives Useful

for the Treatment of Degenerative and Inflammatory Diseases.
W02013117645 (A1).

Mullighan, C.G., Zhang, J., Harvey, R.C., Collins-
Underwood, J.R., Schulman, B.A., Phillips, L.A., Tasian,
5 S.K., Loh, M.L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S.R.,
Chen, I.-M., Clifford, R.J., Gerhard, D.S., Carroll, W.L.,
Reaman, G.H., Smith, M., Downing, J.R., Hunger, S.P.,
Willman, C.L., 2009. JAK mutations in high-risk childhood
acute lymphoblastic leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
10 106, 9414 a 9418. doi: 10.1073/pnas.0811761106

Naka, T., Nishimoto, N., Kishimoto, T., 2002. The
paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis
Res. 4, S233 a S242. doi: 10.1186/ar565

Nials, A.T., Uddin, S., 2008. Mouse models of
15 allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. Dis.
Model. Mech. 1, 213 a 220. doi: 10.1242/dmm.000323

Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S., Shen, Z.-
N., Furumatsu, T., Doi, H., Yoshida, A., Yamana, J.,
Yamamura, M., Ninomiya, Y., Inoue, H., Asahara, H., 2004.
20 Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-
mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and
p21WAF1/Cip1 expression. Arthritis Rheum. 50. 3365 a 3376.
doi: 10.1002/art.20709

O'Dell, J.R., 2004. Therapeutic Strategies for
25 Rheumatoid Arthritis. N. Engl. J. Med. 350. 2591 a 2602. doi:

10.1056/NEJMra040226

Osaki, M., Tan, L., Choy, B.K., Yoshida, Y., Cheah, K.S.E., Auron, P.E., Goldring, M.B., 2003. The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for Stat1 alpha, Jak1 and Jak2. *Biochem. J.* 369, 103 a 115. doi: 10.1042/BJ20020928

O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., 2004. A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 555-564. doi: 10.1038/nrd1441

Oste, L., Salmon, P., Dixon, G., van Rompaey, L., 2007. A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry.

O'Sullivan, L.A., Liongue, C., Lewis, R.S., Stephenson, S.E.M., Ward, A.C., 2007. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol. Immunol.* 44, 2497 a 2506. doi:10.1016/j.molimm.2006.11.025

Otero, M., Lago, R., Lago, F., Reino, J.J.G., Gualillo, O., 2005. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res. Ther.* 7, R581 a R591. doi:10.1186/ar1708

Pernis, A.B., Rothman, P.B., 2002. JAK-STAT signaling in asthma. *J. Clin. Invest.* 109, 1279 a 1283. doi:10.1172/JCI15786

5 Rall, L.C., Roubenoff, R., 2004. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology* 43, 1219 a 1223. doi:10.1093/rheumatology/keh321

Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C.F., Yin,
10 L., Pennica, D., Johnson Jr., E.M., Schreiber, R.D., 1998. Disruption of the Jak1 Gene Demonstrates Obligatory and Nonredundant Roles of the Jaks in Cytokine-Induced Biologic Responses. *Cell* 93, 373 a 383. doi:10.1016/S0092-8674(00)81166-6

15 Salvemini, D., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., De Sarro, A., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S., 2001. Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 44, 2909 a 2921.

20 Shelton, D.L., Zeller, J., Ho, W.-H., Pons, J., Rosenthal, A., 2005. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain* 116, 8 a 16. doi:10.1016/j.pain.2005.03.039

25 Sims, N.A., Green, J.R., Glatt, M., Schlicht, S., Martin, T.J., Gillespie, M.T., Romas, E., 2004. Targeting

osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 50. 2338 a 2346. doi:10.1002/art.20382

Smolen, J.S., Steiner, G., 2003. Therapeutic
5 strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 473 a 488. doi:10.1038/nrd1109

Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.-B.,
Vainchenker, W., Constantinescu, S.N., 2005. JAK1 and Tyk2
Activation by the Homologous Polycythemia Vera JAK2 V617F
10 Mutation CROSS-TALK WITH IGF1 RECEPTOR. *J. Biol. Chem.* 280.
41893 a 41899. doi:10.1074/jbc.C500358200

Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R.,
Bartlett, J.M.S., Edwards, J., 2007. Expression levels of the
JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to
15 hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* 97, 378 a
383. doi:10.1038/sj.bjc.6603871

Vainchenker, W., Dusa, A., Constantinescu, S.N.,
2008. JAKs in pathology: Role of Janus kinases in
hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin.*
20 *Cell Dev. Biol.* 19, 385 a 393.
doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.002

Vandeghinste, N., Tomme, P., Michiels, F., Ma, L.,
Mille-Baker, B., Van, E., 2005. Methods and Means for
Treatment of Osteoarthritis. WO2005124342 (A2).

25 Walsmith, J., Abad, L., Kehayias, J., Roubenoff,

R., 2004. Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31, 23 a 29.

Wernig, G., Kharas, M.G., Okabe, R., Moore, S.A.,
5 Leeman, D.S., Cullen, D.E., Gozo, M., McDowell, E.P., Levine,
R.L., Doukas, J., Mak, C.C., Noronha, G., Martin, M., Ko,
Y.D., Lee, B.H., Soll, R.M., Tefferi, A., Hood, J.D.,
Gilliland, D.G., 2008. Efficacy of TG101348, a selective JAK2
inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-
10 induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 13, 311 a 320.
doi:10.1016/j.ccr.2008.02.009

Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J.,
Rudolphi, K.A., 2005. Osteoarthritis - an untreatable
disease? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 331 a 344.
15 doi:10.1038/nrd1693

Wirtz, S., Neurath, M.F., 2007. Mouse models of
inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1073 a
1083. doi:10.1016/j.addr.2007.07.003

Xiang, Z., Zhao, Y., Mitaksov, V., Fremont, D.H.,
20 Kasai, Y., Molitoris, A., Ries, R.E., Miner, T.L., McLellan,
M.D., DiPersio, J.F., Link, D.C., Payton, J.E., Graubert,
T.A., Watson, M., Shannon, W., Heath, S.E., Nagarajan, R.,
Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J., Tomasson, M.H., 2008.
Identification of somatic JAK1 mutations in patients with
25 acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 4809 a 4812.

doi:10.1182/blood-2007-05-090308

Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L.,
Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A.,
Silveira, A.B., Cardoso, B.A., Sarmento, L.M., Correia, N.,
5 Toribio, M.L., Kobarg, J., Horstmann, M., Pieters, R.,
Brandalise, S.R., Ferrando, A.A., Meijerink, J.P., Durum,
S.K., Yunes, J.A., Barata, J.T., 2011. Oncogenic IL7R gain-
of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic
leukemia. Nat. Genet. 43, 932 a 939. doi: 10.1038/ng.924

10 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
método conocido por la solicitante para llevar a la práctica
la citada invención, es el que resulta claro de la presente
descripción de la invención.

15

20

25