

**DERIVADO DE BENZIMIDAZOL SUSTITUIDO COMO MODULADOR DE LA  
ACTIVIDAD DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL**

**Campo de la Invención**

5           La presente invención se refiere a un derivado de  
imidazol fusionado sustituido, y a su uso en terapia. Más  
particularmente, esta invención se refiere a un derivado de  
1H-bencimidazol sustituido farmacológicamente activo. Este  
compuesto actúa como un modulador de la señalización de  $\text{TNF}\alpha$ ,  
10 y en consecuencia es beneficioso como agente farmacéutico,  
especialmente en el tratamiento de trastornos inflamatorios y  
autoinmunes adversos, trastornos neurológicos y  
neurodegenerativos, trastornos del dolor y nociceptivos,  
trastornos cardiovasculares, trastornos metabólicos,  
15 trastornos oculares, y trastornos oncológicos.

**Antecedentes de la Invención**

$\text{TNF}\alpha$  es el miembro prototípico de la superfamilia de  
proteínas del Factor de Necrosis Tumoral (TNF, por sus siglas  
en inglés) de proteínas que comparten una función primaria de  
20 regular la supervivencia celular y la muerte celular. Una  
característica estructural común a todos los miembros  
conocidos de la superfamilia de TNF es la formación de  
complejos triméricos que se unen y activan receptores  
específicos de la superfamilia de TNF. A modo de ejemplo,  
25  $\text{TNF}\alpha$  existe en formas y señales solubles y transmembrana a

través de dos receptores, conocidos como TNFR1 y TNFR2, con puntos finales funcionales distintos.

Varios productos capaces de modular la actividad de TNF $\alpha$  ya están disponibles comercialmente. Todos están aprobados para el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn. Todos los productos aprobados actualmente son macromoleculares y actúan inhibiendo la unión del TNF $\alpha$  humano a su receptor. Los inhibidores macromoleculares típicos de TNF $\alpha$  incluyen anticuerpos anti-TNF $\alpha$ ; y proteínas de fusión del receptor de TNF $\alpha$  solubles. Los ejemplos de anticuerpos anti-TNF $\alpha$  disponibles en el mercado incluyen anticuerpos completamente humanos como adalimumab (Humira®) y golimumab (Simponi®), anticuerpos quiméricos tal como infliximab (Remicade®) y fragmentos Fab' pegilados tal como certolizumab pegol (Cimzia®). Un ejemplo de una proteína de fusión del receptor de TNF $\alpha$  soluble disponible comercialmente es etanercept (Enbrel®).

Los miembros de la superfamilia de TNF, incluido el propio TNF $\alpha$ , están implicados en una variedad de funciones fisiológicas y patológicas que se cree que desempeñan un papel en una variedad de condiciones de importancia médica significativa (ver, por ejemplo, MG Tansey & D.E. Szymkowski, Drug Discovery Today, 2009, 14, 1082-1088 y FS Carneiro et al., J. Sexual Medicine, 2010, 7, 3823-3834).

### **Descripción Detallada de la Invención**

Los compuestos de acuerdo con la presente invención, que son potentes moduladores de la actividad del TNF $\alpha$  humano, son por lo tanto beneficiosos en el tratamiento y/o prevención de  
5 diversas dolencias humanas. Estos incluyen trastornos autoinmunes e inflamatorios; trastornos neurológicos y neurodegenerativos; dolor y trastornos nociceptivos; trastornos cardiovasculares; trastornos metabólicos; trastornos oculares; y trastornos oncológicos.

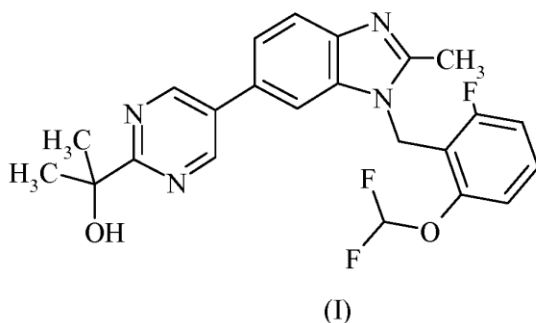
10 Además, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser beneficiosos como estándares farmacológicos para uso en el desarrollo de nuevos ensayos biológicos y en la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos. Por lo tanto, en una modalidad, los compuestos de esta  
15 invención pueden ser útiles como radioligandos en ensayos para detectar compuestos farmacológicamente activos. En una modalidad alternativa, los compuestos de esta invención pueden ser útiles para acoplarse a un fluoróforo para proporcionar conjugados fluorescentes que pueden utilizarse  
20 en ensayos (por ejemplo, un ensayo de polarización de fluorescencia) para detectar compuestos farmacológicamente activos.

WO 2013/186229 describe una clase de derivados de bencimidazol que se consideran moduladores de la señalización  
25 de TNF $\alpha$  beneficiosos en el tratamiento de trastornos

inflamatorios y autoinmunes adversos, trastornos neurológicos y neurodegenerativos, trastornos de dolor y nociceptivos, trastornos cardiovasculares, trastornos metabólicos, trastornos oculares y trastornos oncológicos.

5 La presente invención proporciona 2-(5-{1-[2-(difluorometoxi)-6-fluorobencil]-2-metil-1H-benzimidazol-6-il}pirimidin-2-il)propan-2-ol de fórmula (I):

10



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención  
15 están incluidos dentro del alcance genérico de WO 2013/186229. Sin embargo, no hay una descripción específica en el mismo del compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 La presente invención también proporciona el compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

La presente invención también proporciona el compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal  
25 farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el

tratamiento y/o prevención de trastornos para los cuales está indicada la administración de un modulador de la función de  $\text{TNF}\alpha$ .

En otro aspecto, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno inflamatorio o autoinmune, un trastorno neurológico o neurodegenerativo, dolor o un trastorno nociceptivo, un trastorno cardiovascular, un trastorno metabólico, un trastorno ocular o un trastorno oncológico.

La presente invención también proporciona el uso del compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos para los cuales se indica la administración de un modulador de función  $\text{TNF}\alpha$ .

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno inflamatorio o autoinmune, un trastorno neurológico o neurodegenerativo, dolor o un trastorno nociceptivo, un trastorno cardiovascular, un trastorno metabólico, un trastorno ocular

o un trastorno oncológico.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de trastornos para los cuales está indicada la administración de un modulador de la función de  $\text{TNF}\alpha$ , que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de un trastorno inflamatorio o autoinmune, un trastorno neurológico o neurodegenerativo, dolor o un trastorno nociceptivo, un trastorno cardiovascular, un trastorno metabólico, un trastorno ocular o trastorno oncológico, que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Para uso en medicina, las sales del compuesto de fórmula (I) serán sales farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, otras sales pueden ser útiles en la preparación del compuesto de fórmula (I) o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los principios estándar que subyacen en la selección y preparación de sales farmacéuticamente aceptables se describen, por ejemplo, en Handbook of Pharmaceutical Salts:

Properties, Selection and Use, ed. P.H. Stahl y C.G. Wermuth, Wiley-VCH, 2002. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas del compuesto de fórmula (I) incluyen sales de adición de ácido que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una solución del compuesto de fórmula (I) con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable.

Debe entenderse que cada átomo individual presente en la fórmula (I), o en las fórmulas que se describen a continuación, puede estar presente en la forma de cualquiera de sus isótopos naturales, siendo preferido el isótopo más abundante. Así, a modo de ejemplo, cada átomo de hidrógeno individual presente en la fórmula (I), o en las fórmulas representadas a continuación, puede estar presente como un átomo de  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (deuterio) o  $^3\text{H}$  (tritio), preferiblemente  $^1\text{H}$ . De manera similar, a modo de ejemplo, cada átomo de carbono individual presente en la fórmula (I), o en las fórmulas representadas a continuación, puede estar presente como un átomo de  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ , preferiblemente  $^{12}\text{C}$ .

Los compuestos de acuerdo con la presente invención son beneficiosos en el tratamiento y/o prevención de diversas dolencias humanas. Estos incluyen trastornos autoinmunes e inflamatorios; trastornos neurológicos y neurodegenerativos; dolor y trastornos nociceptivos; trastornos cardiovasculares; trastornos metabólicos; trastornos oculares; y trastornos oncológicos.

Los trastornos inflamatorios y autoinmunes incluyen trastornos autoinmunes sistémicos, trastornos endocrinos autoinmunes y trastornos autoinmunes específicos de órganos. Los trastornos autoinmunes sistémicos incluyen

5 eritematoso sistémico (LES), psoriasis, artropatía psoriásica, vasculitis, miopatía inflamatoria (incluyendo polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), escleroderma, esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide,

10 artritis inflamatoria no específica, artritis inflamatoria juvenil, artritis idiopática juvenil (incluyendo las formas oligoarticulares y poliarticulares de los mismos), anemia por enfermedad crónica (ACD), enfermedad de Still (inicio juvenil y/o adulto), enfermedad de Behçet's y síndrome de Sjögren.

15 Los trastornos endocrinos autoinmunes incluyen tiroiditis. Los trastornos autoinmunes específicos de órganos incluyen enfermedad de Addison, anemia hemolítica o perniciosa, lesión renal aguda (AKI; incluyendo AKI inducida por cisplatino), nefropatía diabética (DN), uropatía obstructiva (incluyendo

20 uropatía obstructiva inducida por cisplatino), glomerulonefritis (incluido el síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis mediada por el complejo inmunitario y anticuerpos citoplásmicos antineutropófilos (ANCA), glomerulonefritis asociada, nefritis lúpica (LN), enfermedad

25 por cambios mínimos, enfermedad de Graves, púrpura

trombocitopénica idiopática, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y pouchitis), pénfigo, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar

5 primaria, neumonitis autoinmune, carditis autoinmune, miastenia grave, infertilidad espontánea, osteoporosis, osteopenia, enfermedad ósea erosiva, condritis, degeneración y/o destrucción del cartílago, trastornos de la fibrosis (incluyendo diversas formas de fibrosis hepática y pulmonar),

10 asma, rinitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria, sepsis, fiebre distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne), rechazo de trasplante de órgano (incluyendo rechazo de aloinjerto renal), escleritis (incluyendo

15 escleritis de arteritis de células gigantes), arteritis de Takayasu, hidradenitis supurativa, pioderma gangrenosa, sarcoidosis, polimialgia reumática y espondiloartritis axial.

Los trastornos neurológicos y neurodegenerativos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de

20 Parkinson, la enfermedad de Huntington, la isquemia, el accidente cerebrovascular, la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión de la médula espinal, el traumatismo craneal, las convulsiones y la epilepsia.

Los trastornos cardiovasculares incluyen trombosis,

25 hipertrofia cardíaca, hipertensión, contractilidad irregular

del corazón (por ejemplo, durante la insuficiencia cardíaca) y trastornos sexuales (incluyendo disfunción eréctil y disfunción sexual femenina). Los moduladores de la función del TNF $\alpha$  también pueden ser útiles en el tratamiento y/o la  
5 prevención del infarto de miocardio (ver J.J. Wu et al., JAMA, 2013, 309, 2043-2044).

Los trastornos metabólicos incluyen diabetes (incluyendo diabetes mellitus dependiente de la insulina y diabetes juvenil), dislipidemia y síndrome metabólico.

10 Los trastornos oculares incluyen retinopatía (incluida la retinopatía diabética, retinopatía proliferativa, retinopatía no proliferativa y retinopatía del prematuro), edema macular (incluyendo edema macular diabética), degeneración macular relacionada con la edad (ARMD),  
15 vascularización (incluyendo vascularización de la córnea y neovascularización), oclusión venosa retiniana y diversas formas de uveítis (incluyendo iritis) y queratitis.

Los trastornos oncológicos, que pueden ser agudos o crónicos, incluyen trastornos proliferativos, especialmente  
20 cáncer, y complicaciones asociadas con cáncer (incluyendo complicaciones esqueléticas, caquexia y anemia). Las categorías particulares de cáncer incluyen enfermedad maligna hematológica (incluyendo leucemia y linfoma) y enfermedad maligna no hematológica (incluyendo cáncer de tumor sólido,  
25 sarcoma, meningioma, glioblastoma multiforme, neuroblastoma,

melanoma, carcinoma gástrico y carcinoma de células renales). La leucemia crónica puede ser mieloide o linfoide. Las variedades de leucemia incluyen leucemia linfoblástica de células T, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia 5 linfocítica/linfoide crónica (CLL), leucemia de células pilosas, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (LMA), síndrome de mielodisplasia, leucemia neutrofilica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células T, plasmocitoma, leucemia de células grandes inmunoblásticas, 10 leucemia de células del manto, mieloma múltiple, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica y eritroleucemia. Las variedades de linfoma incluyen linfoma maligno, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma linfoblástico de células T, linfoma de 15 Burkitt, linfoma folicular, linfoma MALT1 y linfoma de zona marginal. Las variedades de tumores malignos no hematológicos incluyen cáncer de próstata, pulmón, mama, recto, colon, ganglio linfático, vejiga, riñón, páncreas, hígado, ovario, útero, cuello uterino, cerebro, piel, huesos, estómago y 20 músculos. Los moduladores de la función de  $\text{TNF}\alpha$  también se pueden usar para aumentar la seguridad del potente efecto anticanceroso del TNF (ver F.V. Hauwermeiren et al., J. Clin. Invest., 2013, 123, 2590-2603).

La presente invención también proporciona una 25 composición farmacéutica que comprende el compuesto de

fórmula (I) como se representó anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la  
5 invención pueden tomar una forma adecuada para administración oral, bucal, parenteral, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación.

Para la administración oral, las composiciones  
10 farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metil  
15 celulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de  
20 sodio). Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u otro  
25 vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones

líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos o conservantes. Las preparaciones también pueden contener sales  
5 amortiguadoras, agentes saborizantes, agentes colorantes o agentes edulcorantes, según sea apropiado.

Las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

10 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

El compuesto de fórmula (I) se puede formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo por  
15 inyección en bolo o infusión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo en ampollas de vidrio o recipientes de dosis múltiples, por ejemplo frascos de vidrio. Las composiciones para inyección pueden tomar formas tales como suspensiones,  
20 soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización, conservación y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por  
25 ejemplo agua estéril sin pirógenos, antes de su uso.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, el compuesto de fórmula (I) también puede formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación o por  
5 inyección intramuscular.

Para la administración nasal o la administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol para envases presurizados o un  
10 nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado o mezcla de gases.

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un  
15 empaque o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El empaque o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

Para la administración tópica, los compuestos de uso en  
20 la presente invención pueden formularse convenientemente en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Portadores particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, petróleo líquido,  
25 propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera

emulsionante y agua. Alternativamente, los compuestos de uso en la presente invención pueden formularse en una loción adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores farmacéuticamente  
5 aceptables. Los portadores particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, alcohol bencílico, 2-octildodecanol y agua.

Para la administración oftálmica, los compuestos de uso en  
10 la presente invención pueden formularse convenientemente como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica con pH ajustado, con o sin un conservante tal como un agente bactericida o fungicida, por ejemplo nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzilalconio o acetato de clorhexidina.  
15 Alternativamente, para la administración oftálmica, los compuestos pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

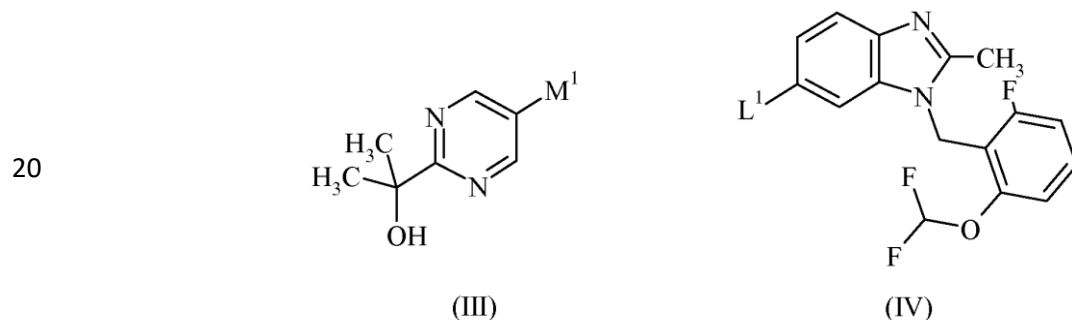
Para la administración rectal, los compuestos de uso en la presente invención pueden formularse convenientemente como supositorios. Estos pueden prepararse mezclando el componente  
20 activo con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y así se fundirá en el recto para liberar el componente activo. Tales materiales incluyen, por ejemplo, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

25 La cantidad de un compuesto de uso en la invención

requerida para la profilaxis o el tratamiento de una afección particular variará dependiendo del compuesto elegido y la afección del paciente a tratar. En general, sin embargo, las dosis diarias pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg a 1000 mg/kg, típicamente de 100 ng/kg a 100 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.01 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal, para administración oral o bucal, de aproximadamente 10 ng/kg a 50 mg/kg de peso corporal para administración parenteral, y de aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 1000 mg, por ejemplo de aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 1000 mg, para administración nasal o por inhalación o insuflación.

Si se desea, un compuesto de acuerdo con la presente invención puede coadministrarse con otro agente farmacéuticamente activo, por ejemplo una molécula antiinflamatoria.

El compuesto de fórmula (I) anterior puede prepararse mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula (IV):



en donde  $L^1$  representa un grupo saliente adecuado, y  $M^1$  representa un resto de ácido borónico- $B(OH)_2$  o un éster cíclico del mismo formado con un diol orgánico, por ejemplo

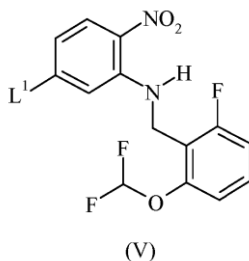
pinacol, 1,3-propano-diol o neopentilglicol; en la presencia de un catalizador de metal de transición.

El grupo saliente  $L^1$  es típicamente un átomo de halógeno, por ejemplo bromo.

5 El catalizador de metal de transición que se usa en la reacción entre el compuesto (III) y (IV) es adecuadamente [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II), dicloro[1,1'-bis(di-terc-butilfosfino)ferroceno]paladio (II), tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0), o Complejo de bis[3-  
10 (difenilfosfanil)ciclopenta-2,4-dien-1-il]hierro-dicloropaladio-diclorometano. La reacción se realiza adecuadamente en la presencia de una base, por ejemplo una base inorgánica tal como carbonato de sodio o carbonato de potasio o fosfato de potasio. La reacción se lleva a cabo  
15 convenientemente a una temperatura elevada en un solvente adecuado, por ejemplo un éter cíclico tal como 1,4-dioxano.

Los intermediarios de fórmula (IV) anterior se pueden preparar mediante un proceso de dos pasos que comprende: (i) reducir el grupo nitro en un compuesto de fórmula (V):

20



en donde  $L^1$  es como se definió anteriormente; y (ii)  
25 haciendo reaccionar el derivado de amina obtenido de este

modo con ácido acético.

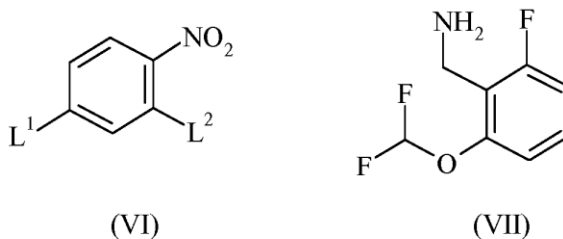
El paso (i) del procedimiento anterior puede efectuarse convenientemente por hidrogenación catalítica del compuesto (V), que típicamente comprende tratar el compuesto (V) con  
5 hidrógeno gaseoso en la presencia de un catalizador de hidrogenación tal como paladio sobre carbono.

Alternativamente, la reducción del compuesto (V) puede efectuarse por tratamiento con hierro o cinc elemental, típicamente a una temperatura elevada en la presencia de  
10 ácido acético.

Alternativamente, la reducción del compuesto (V) puede efectuarse por tratamiento con cloruro de estaño (II), típicamente a una temperatura elevada en la presencia de un ácido mineral tal como ácido clorhídrico.

15 El paso (ii) del procedimiento anterior se efectúa convenientemente calentando el derivado de amina resultante en ácido acético.

Los compuestos intermediarios de fórmula (V) anterior se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula  
20 (VI) con un compuesto de fórmula (VII):



25 en donde  $L^1$  es como se definió anteriormente, y  $L^2$

representa un grupo desplazable.

El grupo desplazable  $L^2$  es típicamente un átomo de halógeno, por ejemplo fluoro.

La reacción se realiza adecuadamente en la presencia de  
5 una base, por ejemplo una base inorgánica tal como carbonato de potasio. La reacción se lleva a cabo convenientemente a una temperatura elevada en un solvente adecuado, por ejemplo, una amina cíclica tal como 1-metil-2-pirrolidinona.

Cuando no estén disponibles comercialmente, los  
10 materiales de partida de fórmula (III), (VI) y (VII) pueden prepararse por métodos análogos a los descritos en los ejemplos adjuntos, o por métodos estándar bien conocidos de la técnica.

Cuando se obtiene una mezcla de productos a partir de  
15 cualquiera de los procesos descritos anteriormente para la preparación de compuestos de acuerdo con la invención, el producto deseado puede separarse del mismo en una etapa apropiada mediante métodos convencionales tales como HPLC preparativa; o cromatografía en columna que utiliza, por  
20 ejemplo, sílice y/o alúmina junto con un sistema de solvente apropiado.

Durante cualquiera de las secuencias sintéticas anteriores, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas en  
25 cuestión. Esto se puede lograr por medio de grupos

protectores convencionales, como los descritos en Protective Groups in Organic Chemistry, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; and T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 3<sup>rd</sup> edition, 1999. Los  
5 grupos protectores pueden eliminarse en cualquier etapa posterior conveniente utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención neutralizan potentemente la actividad de TNF $\alpha$  en una línea  
10 celular reportera derivada de HEK-293 disponible comercialmente conocida como HEK-Blue™ CD40L. Esta es una línea celular transfectada con HEK-293 estable que expresa SEAP (fosfatasa alcalina embrionaria secretada) bajo el control del promotor mínimo INF $\beta$  fusionado a cinco sitios de  
15 unión NF- $\kappa$ B. La secreción de SEAP por estas células se estimula de forma dependiente de la concentración por TNFa. Cuando se probó en el bioensayo HEK-293, también denominado en el presente documento como el ensayo del gen reportero, los compuestos de la presente invención exhiben un valor de  
20 IC<sub>50</sub> mejor que 50 nM.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención inhiben potentemente la unión de un conjugado de fluorescencia a TNF $\alpha$  cuando se prueban en el ensayo de polarización de fluorescencia descrito en el presente  
25 documento. De hecho, cuando se probaron en ese ensayo, los

compuestos de la presente invención exhiben un valor de IC<sub>50</sub> mejor que 20 nM.

### **Ensayo de polarización de fluorescencia**

#### *Preparación del compuesto (A)*

5        1-(2,5-Dimetilbencil)-6-[4-(piperazin-1-ilmetil)fenil]-  
2-(piridin-4-il-metil)-1H-bencimidazol en lo sucesivo  
denominado "Compuesto (A)"- se puede preparar por el  
procedimiento descrito en el Ejemplo 499 de WO 2013/186229; o  
por un procedimiento análogo al mismo.

#### 10        *Preparación de conjugado de fluorescencia*

El compuesto (A) (27.02 mg, 0.0538 mmol) se disolvió en  
DMSO (2 ml). 5(-6) carboxi-fluoresceína succinimil éster  
(24.16 mg, 0.0510 mmol) (número de catálogo de Invitrogen:  
C1311) se disolvió en DMSO (1 ml) para dar una solución de  
15 color amarillo brillante. Las dos soluciones se mezclaron a  
temperatura ambiente, la mezcla se volvió de color rojo. La  
mezcla se agitó a temperatura ambiente. Poco después de  
mezclar una alícuota de 20 µl se eliminó y diluyó en una  
mezcla 80:20 de AcOH:H<sub>2</sub>O para análisis de LC-MS en el sistema  
20 1200R-6140 LC-MS. El cromatograma mostró dos picos de elución  
cercanos en tiempos de retención de 1.42 y 1.50 minutos,  
ambos con masa (M + H)<sup>+</sup> = 860.8 amu, correspondientes a los  
dos productos formados con el grupo de carboxifluoresceína  
sustituido en 5 y 6. Un pico adicional en el tiempo de  
25 retención de 2.21 minutos tenía una masa de (M + H)<sup>+</sup> = 502.8

amu, correspondiente al Compuesto (A). No se observó ningún pico para el 5(-6) carboxifluoresceína succinimil éster sin reaccionar. Las áreas de los picos fueron 22.0%, 39.6% y 31.4% para las tres señales, lo que indica una conversión de 61.6% a los dos isómeros del conjugado de fluorescencia deseado en ese punto de tiempo. Se extrajeron 20  $\mu$ l de alícuotas adicionales después de varias horas y luego, después de agitar durante la noche, se diluyeron como antes y se sometieron a análisis LC-MS. El porcentaje de conversión se determinó como 79.8% y 88.6% respectivamente en estos puntos de tiempo. La mezcla se purificó en un sistema de HPLC preparativo dirigido por UV. Las fracciones purificadas reunidas se liofilizaron para eliminar el exceso de solvente. Después de liofilizar, se recuperó un sólido naranja (23.3 mg), equivalente a 0.027 mmol de conjugado de fluorescencia, que corresponde a un rendimiento global del 53% para la reacción y la purificación por HPLC preparativa.

*Inhibición de unión del conjugado de fluorescencia a TNF $\alpha$*

Los compuestos se probaron a 10 concentraciones a partir de 25  $\mu$ M en una concentración de ensayo final de DMSO al 5%, mediante incubación previa con TNF $\alpha$  durante 60 minutos a temperatura ambiente en Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05%, antes de la adición de conjugado de fluorescencia y una incubación adicional durante 20 horas a temperatura

ambiente. Las concentraciones finales de TNF $\alpha$  y el conjugado de fluorescencia fueron 10 nM y 10 nM, respectivamente, en un volumen de ensayo total de 25  $\mu$ l. Las placas se leyeron en un lector de placas capaz de detectar polarización de fluorescencia (por ejemplo, un lector de placas Analyst HT o un lector de placas Envision). Se calculó un valor de IC<sub>50</sub> utilizando XLfit™ (modelo logístico de 4 parámetros) en ActivityBase.

Cuando se probó en el ensayo de polarización de fluorescencia, se encontró que el compuesto del Ejemplo adjunto exhibía un valor de IC<sub>50</sub> mejor que 20 nM.

Por lo tanto, cuando se probó en el ensayo de polarización de fluorescencia, se encontró que el compuesto del Ejemplo adjunto exhibía un valor de IC<sub>50</sub> entre 0.1 nM y 20 nM.

### **Ensayo de gen reportero**

#### *Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$*

La estimulación de las células HEK-293 por TNF $\alpha$  conduce a la activación del mecanismo de NF- $\kappa$ B. La línea celular reportera utilizada para determinar la actividad de TNF $\alpha$  se adquirió de InvivoGen. HEK-Blue™ CD40L es una línea celular transfectada con HEK-293 estable que expresa SEAP (fosfatasa alcalina embrionaria secretada) bajo el control del promotor mínimo de IFN $\beta$  fusionado a cinco sitios de unión NF- $\kappa$ B. La secreción de SEAP por estas células se estimula de manera

dependiente de la dosis por  $\text{TNF}\alpha$ , con una  $\text{EC}_{50}$  de 0.5 ng/mL para  $\text{TNF}\alpha$  humano. Los compuestos se diluyeron a partir de concentrados de DMSO 10 mM (concentración de ensayo final 0.3% de DMSO) para generar una curva de dilución en serie  
5 triplicada de 10 puntos (por ejemplo, concentración final 30,000 nM a 2 nM). El compuesto diluido se preincubó con  $\text{TNF}\alpha$  durante 60 minutos antes de la adición a una placa de microtitulación de 384 pozos y se incubó durante 18 h. La concentración final de  $\text{TNF}\alpha$  en la placa de ensayo fue de 0.5  
10 ng/ml. La actividad de la SEAP se determinó en el sobrenadante usando un sustrato colorimétrico, por ejemplo medio de detección de QUANTI-Blue™ o HEK-Blue™ (InvivoGen). El porcentaje de inhibiciones para diluciones de compuestos se calculó entre un control de DMSO y la inhibición máxima  
15 (por exceso de compuesto de control) y un valor de  $\text{IC}_{50}$  calculado utilizando XLfit™ (modelo logístico de 4 parámetros) en ActivityBase.

Cuando se probó en el ensayo del gen indicador, se encontró que el compuesto del Ejemplo adjunto exhibía un  
20 valor de  $\text{IC}_{50}$  mejor que 50 nM.

Por lo tanto, cuando se probó en el ensayo del gen reportero, se encontró que el compuesto del Ejemplo adjunto exhibía un valor de  $\text{IC}_{50}$  entre 0.5 nM y 50 nM.

El siguiente ejemplo ilustra la preparación del  
25 compuesto de acuerdo con la invención.

**EJEMPLOS****Abreviaturas**

DCM: diclorometano                      EtOAc: acetato de etilo

DMSO: dimetilsulfóxido    h: hora

5                      LCMS: Espectrometría de Masas de Cromatografía Líquida

GCMS: Espectrometría de masas de Cromatografía de gases

M: masa                                      RT: tiempo de retención

**Nomenclatura**

Los compuestos fueron nombrados con la ayuda de ACD/Name

10    Batch (Network) versión 12.0 y/o Accelrys Draw 4.0.

**Condiciones analíticas*****LCMS****Método 1*

Waters Acquity-SQD, Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x  
15    50 mm, 1.7 µm

Fase móvil A: formiato de amonio 10 mM + amoníaco al  
0.1%

Fase móvil B: 95% de acetonitrilo + 5% de H<sub>2</sub>O + 0.1% de  
amoníaco

20                      Velocidad de flujo: 1.0 mL/min

Temperatura de la columna: 40°C

|                       |        |    |    |
|-----------------------|--------|----|----|
| Programa de gradiente | Tiempo | A% | B% |
|                       | 0.00   | 95 | 5  |
|                       | 0.50   | 95 | 5  |
| 25                    | 1.75   | 5  | 95 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.00 | 5 | 95 |
|------|---|----|

|      |    |   |
|------|----|---|
| 2.25 | 95 | 5 |
|------|----|---|

LCMS SC\_ACID

Columna: Waters XSelect (C18, 30 x 2.1 mm, 3.5 µm)

5 válvula: 1

Velocidad de flujo: 1 ml/minuto

Temperatura de la columna: 35°C

Eluyente A: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo

Eluyente B: ácido fórmico al 0.1% en agua.

10 Gradiente Lin.: t = 0 min 5% A, 1 = 1.6 min 98% A, t = 3 min 98% A

Detección: DAD (220-320 nm)

Detección: MSD (ESI pos/neg) rango de masa: 100-800

Detección: ELSD (PL-ELS 2100): flujo de gas 1.2 mL/min,

15 temperatura del gas: 70°C, neb: 50°C LCMS UN\_ACIDO

Columna: Waters XSelect (C18, 50 x 2.1 mm, 3.5 µm)

válvula: 2

Velocidad de flujo: 0.8 ml/minuto

Temperatura de la columna: 35°C

20 Eluyente A: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo

Eluyente B: ácido fórmico al 0.1% en agua

Gradiente Lin.: t = 0 min 5% A, t = 3.5 min 98% A, t = 6 min 98% A

Detección: DAD (220-320 nm)

25 Detección: MSD (ESI pos/neg) rango de masa: 100-800

Detección: ELSD (PL-ELS 2100): flujo de gas 1.2 ml/min,  
temperatura del gas: 70°C, neb: 50°C

### GCMS

#### *Método S*

5 Instrumento: Agilent 6890N

Columna: Rxi-5MS 20m, ID 180 µm, df 0.18 µm

|                               |                         |                              |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Temp. Inicial: 60°C           | Tiempo Inicial:1.0 min  | Retraso del solvente         |
| índice: 50°C/min              | Temp. Final: 250°C      | Tiempo final: 3.05 min       |
| Proporción de división:20:1   | Temp. de inyector:250°C | Vol. de inyección:1µL        |
| 10 Detección:MSD(EI-positivo) | Temp. de detector:280°C | Intervalo de masa:<br>50-550 |
| Detección:FID                 | Temp. de detector:300°C |                              |

### INTERMEDIARIO 1

#### 2-(Difluorometoxi)-6-fluorobenzonitrilo

A una solución de 2-fluoro-6-hidroxibenzonitrilo (14.78 g,  
15 108 mmol) en 1,4-dioxano (120 ml) se le añadió hidróxido de sodio  
(25.9 g, 647 mmol) en agua (120 ml). La mezcla se calentó a 65°C  
y se pasó clorodifluorometano (13.98 g, 162 mmol) a través de la  
solución a través de una vela de filtro. La mezcla de reacción se  
dejó enfriar a temperatura ambiente y los precipitantes formados  
20 se separaron por filtración. Las capas del filtrado se separaron  
y la fase orgánica se combinó con la capa orgánica de una  
repetición del mismo experimento, a partir de 2-fluoro-6-  
hidroxibenzonitrilo (20.0 g, 146 mmol). La capa orgánica  
combinada se lavó con salmuera (2 x 100 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se  
25 filtró y se concentró al vacío. La suspensión resultante se

diluyó con dietil éter (80 ml) y se lavó con agua (3 x 40 ml) y salmuera (2 x 40 ml), luego se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtró y se concentró al vacío, para dar el compuesto del título (34.2 g, 68%) como un aceite amarillo, que se usó sin purificación adicional.  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) 7.88 (td, J 8.6, 6.8 Hz, 1H), 7.50 (t, J 72.0 Hz, 1H), 7.43 (t, J 8.8 Hz, 1H), 7.34 (d, J 8.6 Hz, 1H). GCMS (Método S)  $[\text{M}]^+$  187, TR 3.40 minutos (95.5%).

### **INTERMEDIARIO 2**

#### **[2-(Difluorometoxi)-6-fluorofenilmetanamina**

En una autoclave de acero bajo una atmósfera de argón, se agregó níquel Raney (~8 g, 50% en peso de suspensión en agua) a una solución del Intermediario I (44.5 g, 214 mmol, 90% puro) en amoníaco metanólico (7M, 400 ml). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de hidrógeno de 10 bar hasta que no se observó un consumo adicional de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró sobre una capa de Kieselguhr, luego el filtrado se concentró parcialmente (> 225 mbar, 40°C) para dar el compuesto del título (146.1 g) como un líquido verde, que se usó sin purificación adicional. GCMS (Método S)  $[\text{M-H}]^+$  190, RT 3.35 minutos (87% de pureza).

### **INTERMEDIARIO 3**

#### **5-Bromo-N-[2-(difluorometoxi)-6-fluorobencil]-2-nitroanilina**

Se añadió carbonato de potasio (22.11 g, 160 mmol) a una

solución de 4-bromo-2-fluoro-1-nitrobenzo (32 g, 145 mmol) e Intermediario 2 (30.6 g, 160 mmol) en 1-metil-2-pirrolidinona (320 ml). La mezcla resultante se agitó a 80°C durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (~750 ml) y agua (~750 ml). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (7 x 200 ml) y salmuera (2 x 250 ml), luego se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron, se concentraron al vacío y se evaporaron conjuntamente de dietil éter, para dar el compuesto del título (68.6 g) como un sólido amarillo oscuro/naranja, que se usó sin purificación adicional.  $\delta_H$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.35 (br s, 1H), 8.02 (d, J 9.1 Hz, 1H), 7.44-7.23 (m, 2H), 7.02 (t, J 8.8 Hz, 2H), 6.78 (dd, J 9.1, 1.9 Hz, 1H), 6.63 (t, J 72.8 Hz, 1H), 4.58 (d, J 5.8 Hz, 2H). LCMS (SC\_ACIDO) [M + H]<sup>+</sup> 391/393 (patrón de Br), RT 2.31 minutos (85% de pureza).

#### **INTERMEDIARIO 4**

6-Bromo-1-[2-(difluorometoxi)-6-fluorobencil]-2-metil-1H-benzimidazol

Se añadió polvo de zinc (34.4 g, 527 mmol) a una solución del Intermediario 3 (68.68 g, 176 mmol) en ácido acético (350 mL). La mezcla resultante se agitó a reflujo durante 1 h, después de lo cual se añadió cuidadosamente zinc adicional (34.4 g, 527 mmol). La mezcla de reacción se

calentó a reflujo durante 18 h más, luego se enfrió a temperatura ambiente sin agitar. La suspensión espesa se filtró sobre un filtro de vidrio y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se concentró al vacío y el residuo oleoso se agitó en etanol (500 ml) durante 2 h. El sólido blanco que cristalizó se recogió por filtración y se suspendió en DCM (600 ml). Las capas orgánicas se lavaron con agua (3 x 200 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron a vacío, para dar el compuesto del título (31.1 g, 45%) como un sólido blanco.  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) 7.57 (d, J 1.8 Hz, 1H), 7.55-7.43 (m, 2H), 7.35 (t, J 72.7 Hz, 1H), 7.25 (dd, J 8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.23-7.15 (m, 1H), 7.15-7.09 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 2.53 (s, 3H). LCMS (AN\_ACID)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  385/387 (patrón de Br), TR 1.79 minutos (98% de pureza).

15

### EJEMPLO 1

2-(5-{1-[2-(Difluorometoxi)-6-fluorobencil-2-metil-1H-bencimidazol-6-il]pirimidin-2-il}propan-2-ol

Una solución del Intermediario 4 (12,88 g, 33,4 mmol), 2-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il]propan-2 (9.72 g, 36.8 mmol) y carbonato de sodio (10.63 g, 100 mmol) se lavó con argón en una mezcla de 1,4-dioxano (250 ml) y agua (25 ml). Se añadió [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II) (0.819 g, 1.003 mmol) y la mezcla resultante se agitó a reflujo durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la

25

mezcla de reacción se combinó con la mezcla de reacción de una repetición del mismo experimento, a partir del Intermediario 4 (18.26 g, 47.4 mmol) y 2-[5-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il]propan-2-ol (13.77 g, 52.1 mmol), después se agitó durante la noche. Los sólidos (sales), que incluyen la mayor parte del contenido de agua, se eliminaron por decantación y se lavaron con dietil éter. Las capas orgánicas combinadas se diluyeron con dietil éter hasta un volumen de ~1000 ml, después se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por filtración sobre un tapón de sílice (50-100% de EtOAc en heptano) y las fracciones que contenían el producto se concentraron al vacío hasta un volumen de ~100-200 ml, después de lo cual el producto comenzó a cristalizar. Los sólidos se separaron por filtración, se lavaron con acetato de etilo y se secaron, para dar el compuesto del título (24.8 g, 69%) en forma de un sólido blanco cremoso. Los filtrados combinados se concentraron al vacío y se trituraron en dietil éter durante la noche. El precipitado se filtró y se secó, para dar una segunda cosecha del compuesto del título (5.82 g, 16%) como un sólido de color beige.  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) 9.03 (s, 2H), 7.78 (br s, 1H), 7.65 (d, J 8.3 Hz, 1H), 7.56 (dd, J 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.54 7.45 (m, 1H), 7.37 (t, J 73.1 Hz, 1H), 7.24-7.11 (m, 2H), 5.55 (s, 2H), 5.11 (s, 1H), 2.58 (s, 3H),

1.55 (s, 6H). LCMS (UN\_ÁCIDO)  $[M + H]^+$  443, RT 2.26 minutos (pureza del 99%).

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solici<itante para llevar a la práctica  
5 la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.