

Moduladores de ROR gamma (ROR γ)

La presente solicitud se refiere a compuestos que son moduladores de ROR γ , a composiciones farmacéuticas que los comprenden, y a su uso para el tratamiento de las enfermedades o afecciones mediadas por ROR γ , en particular las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias.

Los linfocitos T cooperadores (LTC), desempeñan una función decisiva en el sistema inmunitario adaptativo, ya que coordinan la defensa contra determinados patógenos. A las estirpes de LTC productoras de interleucina 17 (IL-17), tales como los del tipo LTC17, se las ha implicado directamente en la patología de una multitud de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis atópica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y síndrome del colon irritable.

La interleucina 17 y la interleucina 23 (IL-23) son dos citocinas cruciales en la biología de los LTC17. La IL-17 es secretada por los LTC17 y es un potente inductor de la inflamación de tejidos; se ha demostrado que la IL-23 es un participante clave para la amplificación y estabilización de la proliferación de los linfocitos del tipo LTC17 a través del receptor de la IL-23 (IL-23R).

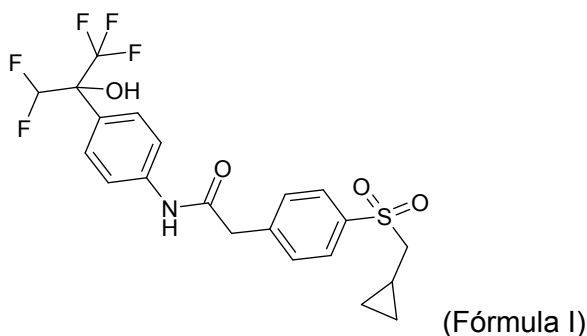
El receptor huérfano γ t relacionado con el receptor del ácido retinoico (ROR γ t) actúa con un regulador maestro del desarrollo de los LTC17 y también como un componente decisivo de las células productoras de IL-17 que no sean LTC17, tales como, por ejemplo, los linfocitos T $\gamma\delta$. La familia de genes ROR es parte de la superfamilia de receptores hormonales nucleares y consiste en tres miembros (ROR α , ROR β y ROR γ). Cada gen se expresa para producir diferentes isoformas, que difieren lo primero de todo en su secuencia del extremo amino. Se han identificado dos isoformas de ROR γ : ROR γ 1 y ROR γ 2 (también conocida como ROR γ t). El término ROR γ se utiliza aquí para describir tanto a ROR γ 1 como a ROR γ 2.

En la solicitud de patente internacional WO 2015/082533 se han descrito los compuestos moduladores de ROR γ .

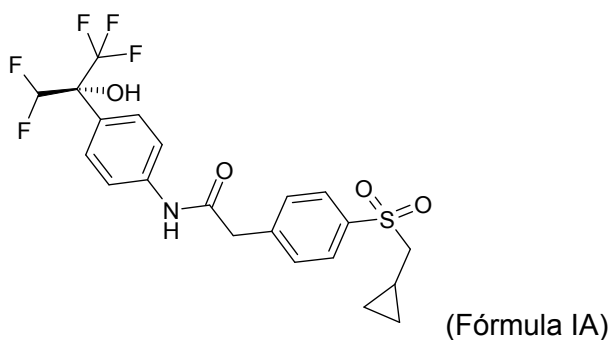
Dada la importante función de ROR γ en los trastornos inmunitarios e inflamatorios, es deseable preparar moduladores de ROR γ con perfiles de seguridad mejorados que se puedan utilizar para el tratamiento de enfermedades mediadas por ROR γ . La presente solicitud da a conocer tales nuevos compuestos moduladores de

RORy con perfiles de seguridad mejorados.

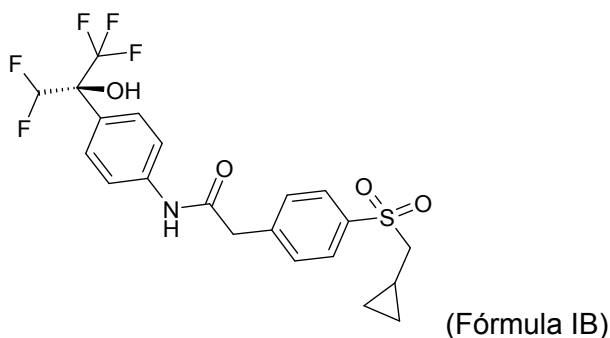
Así pues, la presente solicitud da a conocer nuevos compuestos moduladores de RORy representados por la (Fórmula I):



5 y la configuración absoluta del compuesto (I) corresponde a los compuestos de (Fórmula IA) o de (Fórmula IB):



2-{4-[ciclopropilmetil]sulfonil]fenil}-N-{4-[(1R)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil}acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.



10 2-{4-[(ciclopropilmetil)sulfonil]fenil}-N-{4-[(1S)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil}acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

A menos que se indique de otra manera, las siguientes definiciones se presentan para ilustrar y definir el significado y el alcance de los diferentes términos utilizados para describir los elementos de la presente solicitud en la presente memoria.

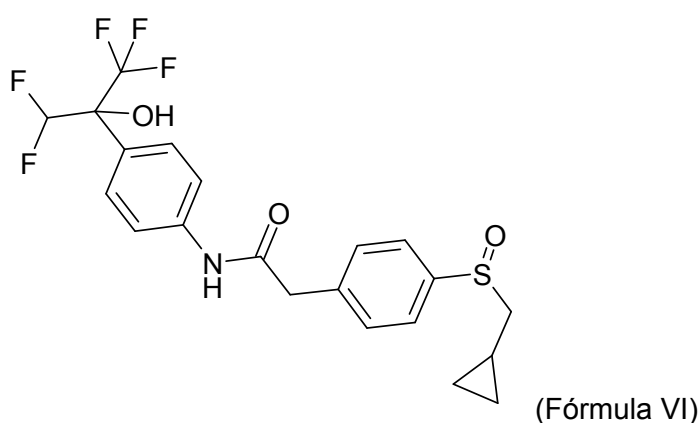
El término sal farmacéuticamente aceptable del compuesto representado por las arriba mencionadas (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) representa las sales

que son, dentro del alcance del criterio médico, idóneas para ser usadas en contacto con los tejidos de humanos y de animales inferiores sin ninguna inapropiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y que son proporcionadas para una proporción razonable de beneficios por riesgos. Las sales farmacéuticamente
5 aceptables se conocen bien en la técnica. La función ácido del compuesto se puede hacer reaccionar con una base orgánica o mineral, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o hidróxido de litio.

Además del compuesto representado por las arriba mencionadas (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB), una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, sus
10 solvatos y sus hidratos también caen dentro del alcance de la presente solicitud.

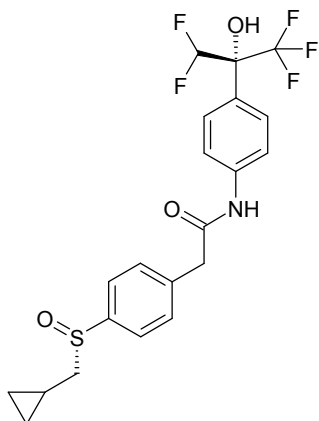
En otro aspecto de la presente solicitud, se descubrió que el compuesto de la presente solicitud (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) también se podía administrar como profármaco.

Los profármacos se definen como compuestos de (Fórmula VI), (Fórmula VIA),
15 (Fórmula VIB), (Fórmula VIC) o (Fórmula VID), que corresponden a los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) con un grupo sulfinilo en vez de un grupo sulfonilo. No se determinó la configuración absoluta de los centros quirales de los profármacos y se les asignó arbitrariamente. El experto en la técnica sabe que los sulfóxidos podrían mostrar una mayor hidrosolubilidad cuando se comparan con sus
20 compañeros con sulfona.



2-[4-(Ciclopropilmetilsulfinil)fenil]-N-[4-[1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.

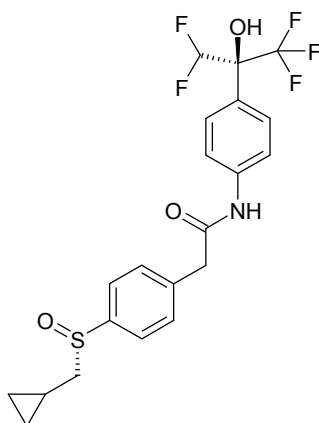
4



(Fórmula VIA)

(-)-2-[4-[(S)-Ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-N-[4-[(1R)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

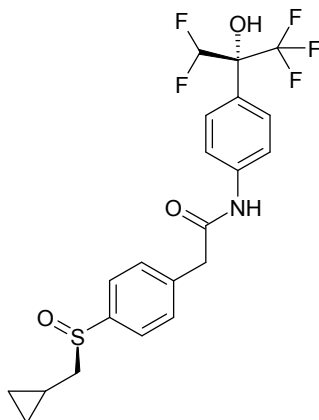
5



(Fórmula VIB)

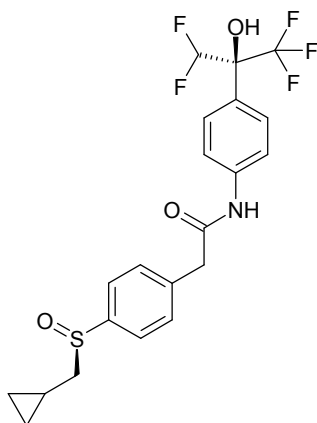
(-)-2-[4-[(S)-Ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-N-[4-[(1S)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10



(Fórmula VIC)

(+)-2-[4-[(*R*)-Ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-*N*-[4-[(1*R*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.



5

(Fórmula VID)

(+)-2-[4(*R*)-Ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-*N*-[4-(1*S*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Además, los compuestos de la presente solicitud no presentan ninguna
10 toxicidad significativa y, así pues, son idóneos para ser usados en un medicamento.

Los compuestos de la solicitud inhiben la actividad de ROR γ . La modulación de la actividad de ROR γ se puede medir, por ejemplo, mediante estudios biofísicos de desplazamiento del ligando (natural), ensayos bioquímicos AlphaScreen o FRET, ensayos celulares con el gen indicador GAL4, ensayo celular con el promotor de la IL-
15 17 como indicador, o ensayos funcionales por ELISA de IL-17, utilizando, por ejemplo, esplenocitos de ratón o células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de humano cultivadas en condiciones de polarización de los LTC17.

En tales ensayos, la interacción de un compuesto con ROR γ se puede determinar con la medición, por ejemplo, de la interacción modulada del compuesto
20 con los péptidos procedentes de cofactores con el dominio de fijación al ligando de ROR γ (Cl₅₀), o con la medición de los productos génicos de la transcripción mediada por ROR γ modulada por el compuesto mediante el uso de, por ejemplo, ensayos con el indicador luciferasa o ensayos por ELISA de la IL-17.

El experto en la técnica reconocerá que los valores de Cl₅₀ deseables
25 dependen del compuesto analizado. Por ejemplo, un compuesto con un valor de Cl₅₀ de menos de 10⁻⁵ M contra la diana biológica se suele considerar candidato para la selección de fármacos. En algunas realizaciones, este valor es inferior a 10⁻⁶ M.

El perfil de seguridad se valoró mediante la inhibición del canal de iones del gen relacionado con el éter a go-go (hERG) y la inhibición del CYP3A4.

El canal del gen relacionado con el éter a go-go de humanos (hERG, Kv 11.1) desempeña una función especialmente importante en la seguridad cardíaca y el
5 ensayo del pinzamiento zonal de membrana del hERG es un requisito regulador clave antes de realizar los primeros ensayos clínicos en los seres humanos (guía de la FDA).

La inhibición de la corriente del hERG (IKr), implicada en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco, se ha demostrado que prolonga el
10 potencial de acción cardíaco y que ocasiona la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma, lo que da lugar a un incremento del riesgo de arritmias ventriculares potencialmente mortales denominadas «Torsade de Pointes» en los humanos.

El ensayo de hERG, en el que se expresa el hERG en las células CHO, ofrece
15 información de la interacción de un compuesto con el canal hERG. La amplitud de las corrientes de cola de los canales de potasio hERG se mide con el control y con la solución del compuesto a diferentes concentraciones. A continuación, se determina el valor de la Cl_{50} a partir de la curva de respuesta a la dosis.

La identificación tan precoz como sea posible de la inhibición del CYP3A4 en el
20 descubrimiento de los fármacos es clave para impedir los posibles efectos tóxicos adversos relacionados con las interacciones entre fármacos (guía de la FDA).

En el ensayo de inhibición del CYP3A4, la Cl_{50} *in vitro* de un compuesto problema como inhibidor directo contra el CYP3A4 se determina midiendo la inhibición del recambio de los sustratos sonda (midazolam y testosterona) del CYP3A4 en sus
25 metabolitos específicos, a saber, 1'-hidroximidazolam, 6β-hidroxitestosterona, en microsomas hepáticos de humano.

El experto en la técnica reconocerá que los valores deseables de Cl_{50} dependen del compuesto analizado. Por ejemplo, cuanto más altos sean los valores de Cl_{50} en los ensayos anteriores, mejor será el perfil de seguridad, y disminuirán los
30 riesgos relacionados con problemas de seguridad cardíaca y con los posibles efectos tóxicos adversos relacionados con las interacciones entre los fármacos.

La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de los compuestos mezclados con

excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes terapéuticamente activos.

La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) o una sal farmacéuticamente
5 aceptable del mismo, de los compuestos mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes activos desde el punto de vista terapéutico.

La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB), o una sal
10 farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de (Fórmula IA) o (Fórmula IB), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente
15 aceptables.

Los excipientes deben ser «aceptables» en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no ser perjudiciales para los destinatarios de los mismos.

La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un agente adicional activo desde el punto de vista terapéutico.
20

La solicitud incluye además un compuesto de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) en combinación con uno o varios fármacos más.

La solicitud incluye además un compuesto de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) en combinación con uno o varios fármacos más.

25 Las composiciones incluyen, p. ej., las idóneas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, local o rectal, y similares, todas en formas de dosis unitarias para la administración.

Para la administración oral, el compuesto de la solicitud se podría presentar como unidades independientes, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos,
30 soluciones, suspensiones y similares.

Para la administración parenteral, la composición farmacéutica del compuesto de la solicitud se podría presentar en envases de una dosis unitaria o de varias dosis, p. ej., líquidos para inyección en cantidades predeterminadas, por ejemplo, en viales y ampollas cerrados herméticamente, y también se podrían conservar en una condición

liofilizada que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, p. ej., agua, antes del uso.

En mezcla con tales excipientes farmacéuticamente aceptables, el agente activo se podría comprimir en unidades de dosis sólidas, tales como píldoras, comprimidos, o procesarse en cápsulas o supositorios. Por medio de líquidos farmacéuticamente aceptables, el agente activo se puede aplicar como una composición líquida, p. ej., como una preparación para inyección, en forma de una solución, suspensión, emulsión, o como un aerosol, p. ej., un aerosol nasal.

Para fabricar unidades de dosis sólidas, se contempla el uso de aditivos convencionales, tales como sustancias de relleno, colorantes, aglutinantes poliméricos y similares. En general, se puede utilizar cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable que no interfiera con el funcionamiento de los compuestos activos. Los excipientes idóneos con los cuales el compuesto de la solicitud se puede administrar como composiciones sólidas incluyen lactosa, almidón, derivados de la celulosa y similares, o mezclas de los mismos, utilizadas en las cantidades idóneas. Para la administración parental, se podrían utilizar suspensiones acuosas, soluciones salinas isotónicas y soluciones inyectables estériles, que contienen agentes de dispersión farmacéuticamente aceptables y/o humectantes, tales como propilenglicol o butilenglicol.

La solicitud incluye además una composición farmacéutica, tal y como está descrito más arriba en la presente memoria, en combinación con material de acondicionamiento idóneo para dicha composición, en donde dicho material de acondicionamiento incluye instrucciones para el uso de la composición para ser usada tal y como está descrito más arriba en la presente memoria.

La dosis exacta y la pauta de administración del compuesto de la solicitud, o de una composición farmacéutica del mismo, podría variar con el compuesto concreto, la vía de administración, y la edad y situación de cada sujeto concreto al que se ha de administrar el medicamento.

En general, la administración parental requiere dosis más bajas que otros métodos de administración, que dependen más de la absorción. Sin embargo, una dosis para humanos contiene preferiblemente de 0,0001 a 100 mg por kilogramo de masa corporal. La dosis deseada se podría presentar como una dosis o como varias subdosis administradas a intervalos adecuados durante todo el día.

Los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la

solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar como medicamento.

Los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar como
5 medicamento.

Los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar como medicamento en terapia.

Los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o
10 una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar como medicamento en terapia.

Otro aspecto más de la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en terapia.

Otro aspecto más de la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en terapia.
15

Otro aspecto más de la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal
20 farmacéuticamente aceptable de los mismos, para el tratamiento de enfermedades mediadas por RORY o afecciones mediadas por RORY.

Otro aspecto más de la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para el tratamiento de enfermedades mediadas por RORY o afecciones
25 mediadas por RORY.

Otro aspecto de la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, en particular las enfermedades en las que los LTC17 y no los que no son LTC17, pero
30 que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función destacada.

Otro aspecto de la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, en particular las

enfermedades en las que los LTC17 y no los que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función destacada.

Estas incluyen, pero sin limitarse a ellas, el tratamiento de la artritis reumatoide, de la psoriasis, de las enteropatías inflamatorias, de la enfermedad de Crohn y de la
5 esclerosis múltiple.

En otro aspecto, los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en las que los LTC17 y/o los que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los
10 LTC17, desempeñan una función destacada, tales como, pero sin limitarse a ellas, las enfermedades respiratorias, la artrosis y el asma.

En otro aspecto, los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en las que los LTC17 y/o los
15 que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función importante, tales como, pero sin limitarse a ellas, las enfermedades respiratorias, la artrosis y el asma.

De igual forma, los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar para el
20 tratamiento de enfermedades infecciosas en las que los LTC17 y/o los que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función importante, tal como, pero sin limitarse a ella, la leishmaniosis mucosa.

De igual forma, los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar para el tratamiento de
25 enfermedades infecciosas en las que los LTC17 y/o los que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función destacada, tal como, pero sin limitarse a ella, la leishmaniosis mucosa.

Los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar
30 también para el tratamiento de otras enfermedades en las que los LTC17 y/o los que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función destacada, tales como, pero sin limitarse a ellas, la enfermedad de Kawasaki y la tiroiditis de Hashimoto.

Los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o

una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar también para el tratamiento de otras enfermedades en las que los LTC17 y/o los que no son LTC17, pero que expresan las citocinas distintivas de los LTC17, desempeñan una función destacada, tales como, pero sin limitarse a ellas, la enfermedad de Kawasaki y la
5 tiroiditis de Hashimoto.

Aún en otro aspecto, la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para el tratamiento de esclerosis múltiple, enteropatías inflamatorias, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis reumatoide, asma, artrosis,
10 enfermedad de Kawasaki, tiroiditis de Hashimoto, cáncer y leishmaniosis mucosa.

Aún en otro aspecto, la solicitud reside en el uso de compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para el tratamiento de esclerosis múltiple, enteropatías inflamatorias, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis reumatoide, asma, artrosis, enfermedad de
15 Kawasaki, tiroiditis de Hashimoto, cáncer y leishmaniosis mucosa.

En otro aspecto, los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la preparación de un medicamento se pueden utilizar en terapias para tratar o prevenir la esclerosis múltiple, las enteropatías inflamatorias, la enfermedad de Crohn, la
20 psoriasis y la artritis reumatoide, el asma, la artrosis, la enfermedad de Kawasaki, la tiroiditis de Hashimoto, el cáncer y la leishmaniosis mucosa.

En otro aspecto, los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la preparación de un medicamento se pueden utilizar en terapias con las que tratar o
25 prevenir la esclerosis múltiple, las enteropatías inflamatorias, la enfermedad de Crohn, la psoriasis y la artritis reumatoide, el asma, la artrosis, la enfermedad de Kawasaki, la tiroiditis de Hashimoto, el cáncer y la leishmaniosis mucosa.

En otro aspecto, los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se
30 pueden utilizar para tratar o prevenir la psoriasis.

En otro aspecto, los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar para tratar o prevenir la psoriasis.

Aún en otro aspecto, los compuestos de (Fórmula I), (Fórmula IA) o (Fórmula

IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden utilizar para tratar las enteropatías inflamatorias.

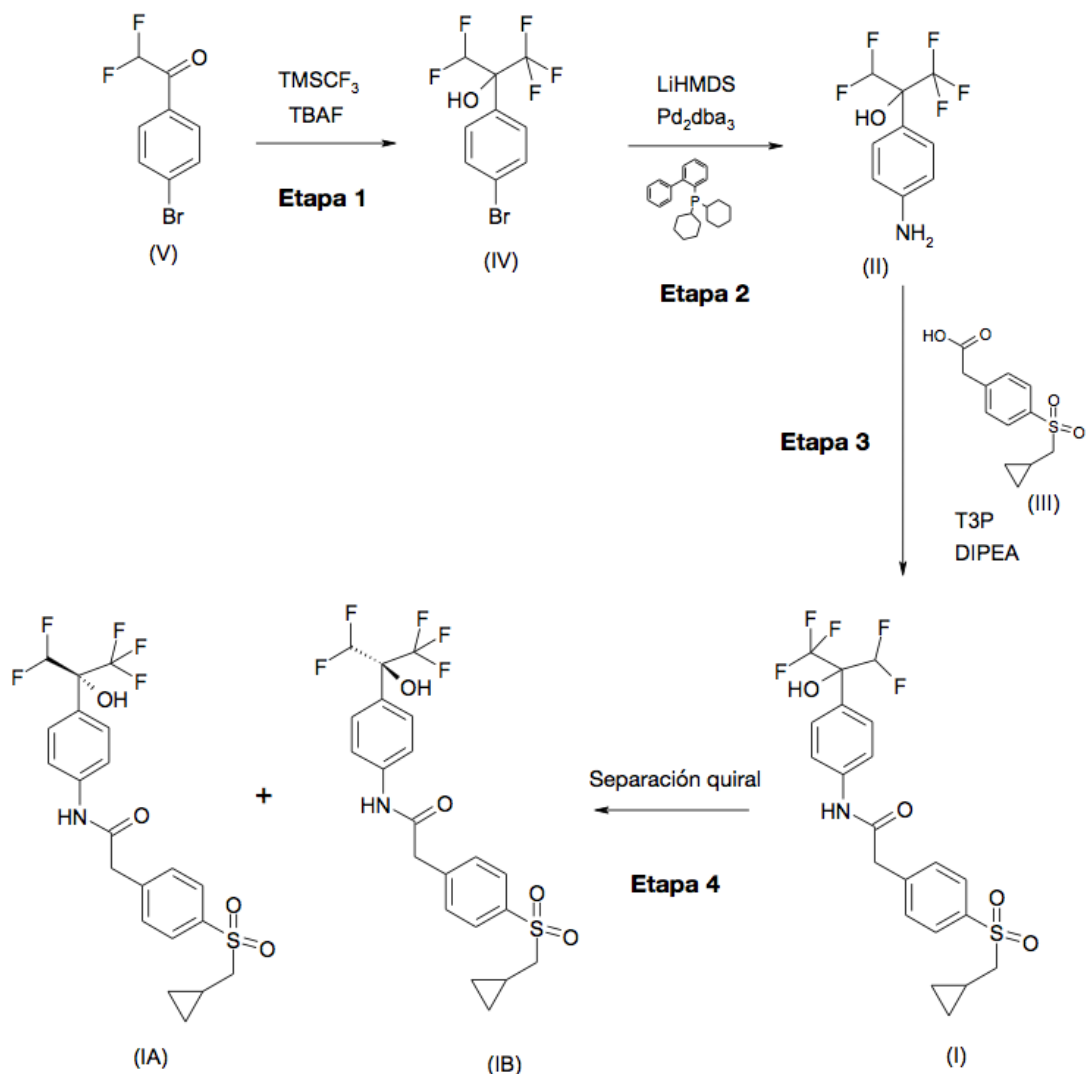
Aún en otro aspecto, los compuestos de (Fórmula IA) o (Fórmula IB) de acuerdo con la solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se
5 pueden utilizar para tratar las enteropatías inflamatorias.

Ejemplos

La presente solicitud se explicará con referencia a los ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente solicitud no se limita a los ejemplos que vienen a
10 continuación.

Los compuestos de la solicitud se pueden preparar con facilidad de acuerdo con el siguiente esquema de reacción o modificaciones del mismo, utilizando los materiales de partida que se encuentran con facilidad, reactivos o intermedios previamente descritos, y los procedimientos de síntesis convencionales.

15



Las abreviaturas utilizadas en este esquema y los detalles experimentales se recogen a continuación y se considera que el experto en la técnica de la química sintética conoce otras más.

- 5 Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria son las siguientes:
- TMSCF₃: Trifluorometiltrimetilsilano; TBAF: fluoruro de tetra-*N*-butilamonio; TMS: trimetilsililo; LiHMDS: bis(trimetilsilil)amida de litio; Pd₂(dba)₃: tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0); T3P: anhídrido 1-propanofosfónico; DIPEA: diisopropiletilamina; *N*-etil-*N*-isopropilpropán-2-amina; TA: temperatura ambiente;
- 10 DMF: dimetilformamida; CH₂Cl₂; DCM: diclorometano; THF: tetrahidrofurano; Et₂O: éter dietílico; DMSO: sulfóxido de dimetilo; EtOH: etanol; TLC: cromatografía en capa fina; EtOAc: acetato de etilo; ACN, CH₃CN: acetonitrilo; MeOH: metanol; TFA: ácido trifluoroacético; HCl: ácido clorhídrico; Et₃N, TEA: trietilamina; NaCl: cloruro de sodio; NaHCO₃: bicarbonato de sodio; H₂O: agua; MgSO₄: sulfato de magnesio; Na₂SO₄:

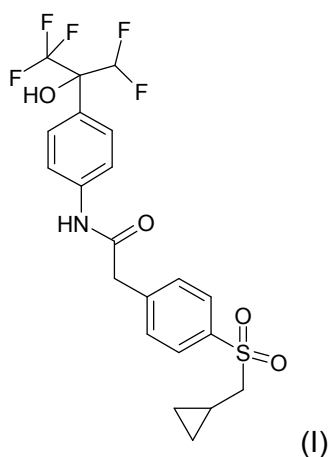
sulfato de sodio.

Los nombres químicos son los nombres preferidos por la IUPAC, generados con el programa informático Accelrys Draw 4.1.

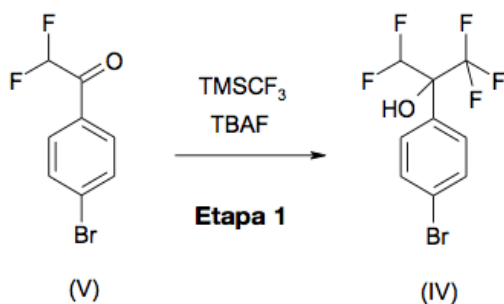
- 5 Si se hace referencia a un compuesto químico mediante el uso una estructura química y también de un nombre químico, y existe una ambigüedad entre la estructura y el nombre, predomina la estructura.

Ejemplo 1

- 10 2-[4-(Ciclopropilmetilsulfonil)fenil]-N-[4-[1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida



Etapas 1:



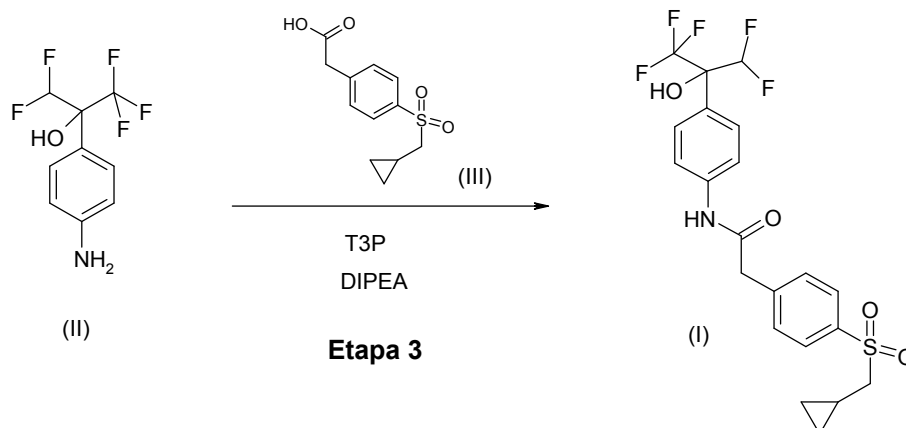
- 15 A una solución de 1-(4-bromofenil)-2,2-difluoroetanona (10,5 g) en 100 ml de THF a 0 °C en argón se le añadió TMSCF_3 (12,7 g) y luego se le añadió una solución a 1 M de TBAF en THF (90 ml) durante 45 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a TA, a continuación se diluyó con Et_2O (200 ml), se lavó con agua (2 × 200 ml), salmuera (100 ml), se secó y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando EtOAc del 0% al 20%
- 20

5 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 6,70 (t, $J = 53,1$ Hz, 2 H), 7,60 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,69 (d, $J = 9,2$ Hz, 2 H), 7,92 (s, 1 H).

A una solución de 2-(4-bromofenil)-1,1,1,3,3-pentafluoropropán-2-ol (11,4 g) en THF (100 ml) bajo argón se le añadió una solución a 1 M de LiHMDS en THF (112 ml), 2-(díciclohexilfosfino)bifenilo (1,6 g) seguido de la adición de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (2,16 g). La mezcla de reacción se agitó en reflujo durante 1 hora, a continuación se enfrió a 0 °C y se le añadió gota a gota una solución acuosa de HCl a 12 N (15 ml). Después de la agitación durante 1 hora a TA, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (400 ml) y luego se extrajo con EtOAc (2 × 300 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas y se concentraron a presión reducida. El producto se precipitó en DCM, se filtró y se lavó con una cantidad mínima de DCM para dar el producto deseado (4,75 g). El filtrado se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando EtOAc del 0% al 50% en ciclohexano como eluyente para dar 1,4 g del producto deseado. Se obtuvo el 2-(4-aminofenil)-1,1,1,3,3-pentafluoropropán-2-ol (6,15 g, 68%) como un sólido blanquecino.

25 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 5,27 (s, 2 H), 6,22-6,74 (m, 3 H), 7,11-7,35 (m, 3 H).

Etapas 3:



A una solución de 2-(4-aminofenil)-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropán-2-ol (0,55 g) en DCM (10 ml) se le añadió ácido 2-[4-(ciclopropilmetilsulfonil)fenil]acético (0,58 g) y *N*-etil-*N*-isopropilpropán-2-amina (1,19 ml) seguido de la adición gota a gota de una
 5 solución al 50% de T3P en DCM (0,8 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 horas. Se le añadió EtOAc (100 ml) y agua (100 ml). Se separó la capa orgánica, se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se trituró en DCM (5 ml), se filtró y se lavó con DCM al 10% en
 10 pentano (5 ml), y luego se secó para dar 0,72 g (66%) de 2-[4-(ciclopropilmetilsulfonil)fenil]-*N*-[4-[1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida como un sólido blanquecino.

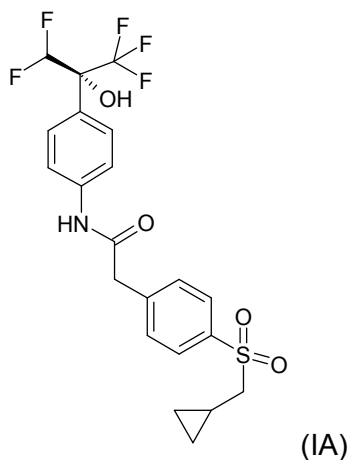
MS (ES⁺) *m/z* 478,1 [M+H]⁺.

15 Ejemplos 2 y 3

Los dos enantiómeros del ejemplo 1 se separaron por cromatografía quiral en una columna Chiralpak AD 20 μm, 76,5 × 350 mm y una fase móvil, EtOH:MeOH 90:10, 350 ml/min, con una detección por UV a 254 nm.

Se comenzó con 5 g de racemato en 500 ml de EtOH, se realizaron cinco
 20 inyecciones de la solución para producir, después de la concentración, 2,17 g del ejemplo 2 (primer enantiómero a eluir) y 2,02 g del ejemplo 3.

Ejemplo 2: compuesto de (Fórmula IA): (+)-2-[4-(ciclopropilmetilsulfonil)fenil]-*N*-[4-[(1*R*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.

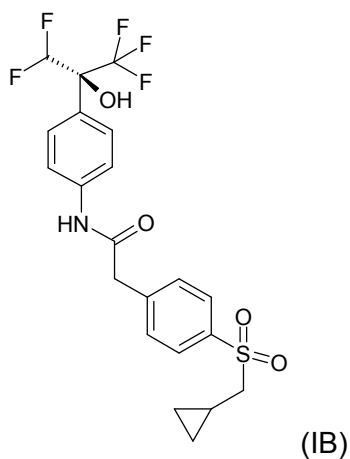


MS (ES⁺) m/z 478,1 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 0,11 (m, 2 H), 0,44 (m, 2 H), 0,82 (m, 1 H), 3,24 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 6,67 (t, J = 53,4 Hz, 2 H), 7,57 (d, J = 9,2 Hz, 2 H), 7,60 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,67 (d, J = 9,2 Hz, 2 H), 7,70 (s, 1 H), 7,86 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 10,42 (s, 1 H).

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20}$ = +1,5° (c = 3 mg/ml, DMSO).

10 Ejemplo 3: compuesto de (Fórmula IB): (–)-2-[4-(ciclopropilmetilsulfonil)fenil]-*N*-[4-[(1*S*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.



MS (ES⁺) m/z 478,0 [M+H]⁺.

15 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 0, 11 (m, 2 H), 0,44 (m, 2 H), 0,82 (m, 1 H), 3,24 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 6,67 (t, J = 53,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, J = 9,2 Hz, 2 H), 7,59 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,67 (d, J = 9,2 Hz, 2 H), 7,70 (s, 1 H), 7,86 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 10,42 (s, 1 H).

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20} = -4,6^\circ$ ($c = 3$ mg/ml, DMSO).

Ejemplo 4: difracción de rayos X de un único cristal

La configuración absoluta de los ejemplos 2 y 3 se ha determinado a partir de los datos de la difracción de rayos X de un único cristal (DRXUC) que utiliza la dispersión anómala y el análisis de las diferencias de Bijvoet.

De un experimento de evaporación lenta de una solución de los ejemplos 2 y 3 en cloroformo se ha aislado un único cristal de una calidad cristalográfica idónea para la determinación de la estructura cristalina a partir de los datos de difracción de un único cristal.

Configuración absoluta del ejemplo 2

Se han recogido los datos en un difractómetro de un único cristal Bruker Smart Apex. Se ha utilizado una fuente de rayos X de molibdeno microfoco $\text{I}\mu\text{S}$, que funciona a 50 kV y 0,6 mA, que emite una radiación de $\text{Mo-K}\alpha$ ($\lambda = 0,710731$ Å). Se ha colocado un detector de área de tipo circuito integrado acoplador de cargas (*chip* CCD: 4 K, 62 mm) a 6,0 cm. Gracias a un criostato de nitrógeno Oxford Cryosystems (Cryostream Plus 700 series) se ha podido llevar a cabo el experimento de DRXUC a 100 K. El único cristal con un tamaño de $25 \times 250 \times 250$ μm^3 se ha montado a partir de una gota de aceite Paratone NTM encima de un lazo MiTeGen de MylarTM con fondo bajo. Se ha recogido una esfera Ewald de reflexiones completa (3 barridos omega de 680 imágenes con un ancho de secuencia de $0,3^\circ$). El tiempo de acumulación se ha fijado en 80 s para cada imagen a adquirir.

La matriz de orientación y la celda unitaria se han fijado con el programa CELL_NOW (v2008/4). El perfil de reflexión 3D y la integración de todas las reflexiones se han realizado con el programa SAINT (v8.34A). El programa TWINABS (v2012/1) se ha utilizado para corregir los efectos de polarización y de Lorentz, y para la absorción de la muestra. Además, se han generado, respectivamente, los datos de HKLF4 y HKLF5 para la resolución y el refinado mediante la suite de programas SHEKXTL (v2014/7).

Los datos de la estructura del cristal son los siguientes:

- Triclínico, grupo espacial P1
- $a = 7,9892(13)$ Å, $b = 11,4301(18)$ Å, $c = 11,6936(19)$ Å
- $\alpha = 83,022(2)^\circ$, $\beta = 77,006(2)^\circ$, $\gamma = 81,071(2)^\circ$

- $V = 1023,7(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $T = 100(2) \text{ K}$,
- 11.704 reflexiones medidas ($3,6 \leq 2\theta \leq 58,2$), 11.704 únicas ($R_\sigma = 0,0229$)
- 736 parámetros y 3 restricciones

5

La R_1 final es del 2,7 % ($I > 2\sigma(I)$) y wR_2 es del 7,1 % (todos los datos) con Gof = 1,030.

El procedimiento estándar para determinar la estructura absoluta con las técnicas de difracción de rayos X se basa en la determinación del parámetro de Flack (x) con su incertidumbre estándar asociada como parte del procedimiento de refinado por mínimos cuadrados. Los valores esperados son 0 (dentro de 3 DE) para correcto y +1 para la estructura absoluta invertida. En el caso del ejemplo 2, compuesto de (Fórmula IA), x de Flack = 0,095(33) mediante el ajuste clásico a todas las intensidades y 0,072(21) de 3969 cocientes seleccionados (el método de Parsons es el que da una mayor precisión) indican que la configuración absoluta del ejemplo 2, compuesto de (Fórmula IA), se ha determinado de manera fiable.

Además, se aplicó un procedimiento de posrefinado basado en una estrategia de estadística bayesiana (de una manera completamente diferente a la estrategia de Flack). La utilización de una combinación de la estimación de verosimilitud máxima y de la estadística bayesiana no solo consigue una asignación cualitativa de la estructura absoluta, sino también una estimación cuantitativa de la fiabilidad de esa asignación. El análisis de la estructura absoluta del ejemplo 2, compuesto de la (Fórmula IA), mediante el uso del método de verosimilitud se ha realizado con el paquete de programas Olex2. El valor resultante es y de Hooft = 0,13(5), lo que indica que la estructura absoluta se ha determinado correctamente (análisis emparejados de Bijvoet con el uso de la distribución de la t de Student con cobertura de parejas de Bijvoet del 88%: 4.639 parejas utilizadas). Con el método también se ha calculado que la probabilidad de que la estructura esté invertida es igual a cero.

Así pues, estos resultados indican que la configuración absoluta del ejemplo 2, compuesto de (Fórmula IA), es R (probabilidad del 100%).

Configuración absoluta del ejemplo 3

Se han recogido los datos en un difractor de un único cristal Bruker Apex.

Se ha utilizado una fuente de rayos X de molibdeno microfoco de $1\mu\text{S}$, que funciona a 50 kV y 0,6 mA, que emite una radiación de $\text{Mo-K}\alpha$ ($\lambda = 0,710731 \text{ \AA}$). Se ha colocado un detector de área de tipo circuito integrado acoplador de cargas (*chip* CCD: 4 K, 62 mm) a 6,0 cm. Gracias a un criostato de nitrógeno Oxford Cryosystems (Cryostream Plus 700 series) se ha podido llevar a cabo el experimento de DRXUC a 100 K. El cristal único con un tamaño de $40 \times 150 \times 200 \mu\text{m}^3$ se ha montado a partir de una gota de aceite Paratone NTM encima de un lazo MiTeGen de MylarTM con fondo bajo. Se ha recogido una esfera Ewald de reflexiones completa (3 barridos omega de 680 imágenes con un ancho de secuencia de $0,3^\circ$). El tiempo de acumulación se ha fijado en 75 s para cada imagen a adquirir.

La matriz de orientación y la celda unitaria se han fijado con la suite de programas Bruker AXS Apex2 (v2014.11 0). El perfil de reflexiones 3D y la integración de todas las reflexiones se han realizado con el programa SAINT (v8.34A). El programa SADABS (v2014/5) se ha utilizado para corregir los efectos de polarización y de Lorentz, y para la absorción de la muestra. Se ha determinado el grupo espacial tentativo con el programa XPREP (v2014/2). El programa SHELXTL XT (v2014/4) se ha utilizado para resolver la estructura mediante el método de sincronización intrínseco. El programa SHELXTL XLMP (v2014/7) se ha utilizado para refinar la resolución mediante cálculos de mínimos cuadrados de toda la matriz en F^2 .

20

Los datos de la estructura del cristal son los siguientes:

- Triclínico, grupo espacial P1
- $a = 8,0022(5) \text{ \AA}$, $b = 11,4394(8) \text{ \AA}$, $c = 11,7044(8) \text{ \AA}$
- $\alpha = 83,0030(10)^\circ$, $\beta = 76,9840(10)^\circ$, $\gamma = 80,9850 (10)^\circ$
- $V = 1026,83(12) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $T = 100(2) \text{ K}$
- 10.430 reflexiones medidas ($3,6 \leq 2\theta \leq 57,8$), 8.932 únicas ($R_{\text{int}} = 0,0081$)
- 737 parámetros y 3 restricciones

25

La R_1 final fue del 2,5 % ($I > 2\sigma(I)$) y wR_2 fue del 6,8% (todos los datos) con Gof = 1,024.

30

El procedimiento estándar para determinar la estructura absoluta con las técnicas de difracción de rayos X se basa en la determinación del parámetro de Flack (x) con su incertidumbre estándar asociada como parte del procedimiento de refinado

por mínimos cuadrados. Los valores esperados son 0 (dentro de 3 DE) para correcto y +1 para la estructura absoluta invertida. En el caso del ejemplo 3, compuesto de (Fórmula IB), x de Flack = 0,063(47) mediante el ajuste clásico a todas las intensidades y 0,058(9) de 3969 cocientes seleccionados (el método de Parsons es el
 5 que da una mayor precisión) indican que la configuración absoluta del ejemplo 3, compuesto de (Fórmula IB), se ha determinado de manera fiable.

Además, se aplicó un procedimiento de posrefinado basado en una estrategia de estadística bayesiana. La utilización de una combinación de la estimación de verosimilitud máxima y de la estadística bayesiana no solo consigue una asignación
 10 cualitativa de la estructura absoluta, sino también una estimación cuantitativa de la fiabilidad de la asignación.

El análisis de la estructura absoluta del ejemplo 3, compuesto de (Fórmula IB), mediante el uso del método de verosimilitud se ha realizado con el paquete de programas Olex2. El valor resultante es y de Hooft = 0,059(8), lo que indica que la
 15 estructura absoluta se ha determinado correctamente (análisis emparejados de Bijvoet con el uso de la distribución de la t de Student con cobertura de parejas de Bijvoet del 75%: 4.049 parejas utilizadas). Con el método también se ha calculado que la probabilidad de que la estructura esté invertida es igual a cero.

Así pues, estos resultados indican que la configuración absoluta del ejemplo 3,
 20 compuesto de (Fórmula IB), es S (probabilidad del 100%).

Ejemplo 5: ensayo de RORy con el gen indicador GAL4

Los ejemplos 2-3 de la presente solicitud de compuesto de Fórmula IA y de compuesto de Fórmula IB y el ejemplo n.º 37 de la solicitud de patente internacional
 25 WO 2015/082533 se analizaron por su capacidad para inhibir la actividad de RORy en un ensayo de RORy con el gen indicador GAL4.

El procedimiento del ensayo se describe a continuación y los resultados se presentan en la tabla 1.

Se implantó un sistema indicador de un híbrido de GAL4 que emplea la lectura
 30 de la luciferasa para determinar la inhibición de RORy en las células 293FT. El dominio de fijación a ligando (LBD, por su nombre en inglés) de RORy se fusionó con el dominio de fijación al ADN (DBD, por su nombre en inglés) de GAL4 de levadura, y se colocó bajo el control del promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) de humano, con el uso del vector de expresión pFN26A (Promega) y los métodos

estándares de clonación de ADN recombinante. Para servir como control del ensayo, se generó un vector similar en el que el DBD de GAL4 se fusionó con la proteína 16 del virus del herpes simple (VP16), un activador transcripcional constitutivo.

Para monitorizar el efecto inhibitor de los compuestos sobre ROR γ , se utilizó una construcción indicadora transcripcional. El vector pGL4.35 (Promega) contiene nueve copias de la secuencia activadora delantera (UAS, por su nombre en inglés) de GAL4. Esta secuencia impulsa la transcripción del gen indicador de la luciferasa *luc2P* en respuesta a la fijación de una proteína de fusión que contiene el dominio de fijación al ADN de GAL4, como por ejemplo el expresado por los vectores de expresión GAL-ROR γ -LBD y GAL4-VP16 descritos más arriba. Para permitir que una proteína de fusión a GAL4 impulse la expresión de la luciferasa indicadora, el vector de expresión pGL4.35 y el vector de expresión de la proteína de fusión de GAL4 adecuado se transfectaron en masa en las células 293FT mediante las técnicas de transfección estándares.

El día después de la transfección, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, se les añadió el compuesto problema y las placas se incubaron durante una noche. Posteriormente, se cuantificó la actividad luciferasa de luciérnaga mediante el reactivo de detección de la luciferasa y la lectura de la luminiscencia.

Descripción detallada del ensayo

Las células 293FT (Invitrogen) se transfectaron con un vector de expresión de la proteína de fusión a GAL4 (tal y como se describe más arriba) y la construcción indicadora transcripcional (pGL4.35, Promega). Se añadieron gota a gota 60 μ l del reactivo de transfección *TransIT-293* (Mirus Bio) a 1.500 μ l del medio de suero reducido Opti-MEM I (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 5 a 20 minutos. Se añadieron 1.500 μ l de esta mezcla de reactivos a 5 μ g del vector de expresión de la proteína de fusión a GAL4 y 5 μ g de la construcción indicadora transcripcional, y se incubó a TA durante 20 minutos.

Para recoger las células 293FT de un matraz T75, primero se separaron las células del medio de cultivo. Posteriormente, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Lonza), tras lo cual se retiró el PBS. Para disociar las células, se le añadió al matraz 1 ml de TrypLE Express (Invitrogen), seguido de la incubación a TA hasta que las células comenzaron a desprenderse a simple vista. Las células se recogieron en 5 ml del medio de ensayo (medio de cultivo DMEM (Lonza), dializado con FBS al 10% (Invitrogen) y Pen/Strep (Lonza)) para conseguir una

suspensión de células individuales. Se sedimentaron 10×10^6 células y se resuspendieron en 10 ml del medio de ensayo. Posteriormente, la suspensión celular se añadió al tubo con la mezcla de transfección y luego se transfirió como un todo a un matraz T75 (Greiner), seguido de la incubación durante una noche (16-24 horas) a 37 °C y CO₂ al 5%.

Para el cribado del compuesto, se recogieron las células (tal y como se describe más arriba) y se contaron. Se sedimentaron 13×10^6 células, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 17,3 ml del medio de ensayo para obtener una suspensión celular de $0,75 \times 10^6$ células/ml. Se sembraron en placa 80 µl de la suspensión celular (60.000 células) por pocillo en placas de cribado de 96 pocillos tratadas para cultivo de tejidos con fondo plano y blanco (Greiner).

Los compuestos problema se diluyeron, comenzando a partir de una solución madre de sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 10 mM, en diluciones seriadas en DMSO hasta la concentración problema final a 500×. Posteriormente, estas soluciones se diluyeron hasta la concentración problema final a 5× en dos etapas de dilución de 10 veces en el medio de ensayo. La concentración de DMSO de la solución del compuesto problema a 5× era del 1%. Se le añadieron 20 µl de la solución del compuesto problema a 5× a cada pocillo problema de la placa de 96 pocillos previamente sembrados con una suspensión celular de 80 µl, lo que da lugar a la concentración problema final con el DMSO al 0,2%.

Las placas se incubaron durante una noche (de 16 a 24 horas) a 37 °C y CO₂ al 5%.

Para la lectura de la luciferasa, el reactivo de la luciferasa (Britelite Plus, Perkin Elmer) se reavivó a TA. A cada pocillo problema de las placas de cribado se le añadieron 100 µl del reactivo Britelite Plus diluido 2,5 veces, seguido de la incubación a TA durante 10 minutos. La señal de luminiscencia de la luciferasa se midió con un lector de microplacas Wallac Victor (Perkin Elmer).

Los valores de la mediana de la concentración inhibidora máxima (CI₅₀) para los compuestos problema se calcularon a partir de la señal de la luciferasa mediante el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software).

Ejemplo 6: ensayo de la IL-17 de las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP)

Los ejemplos 2-3 de la presente solicitud y el ejemplo n.º 37 de la solicitud de

patente internacional WO 2015/082533 se ensayaron por su capacidad para inhibir la producción de la IL-17A en las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 que se aislaron de la sangre de humano. El procedimiento del ensayo se describe a continuación y los resultados se presentan en la tabla 1.

Este ensayo está diseñado para medir la cantidad de IL-17A secretada desde las CMSP estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 con el objetivo de medir la inhibición de la producción de la IL-17A mediada por ROR γ .

10 *Descripción detallada del ensayo*

El medio de ensayo consiste en RPMI 1640 al 90% (Lonza), suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (FBS, Lonza) y 100 U/ml de la solución de penicilina/estreptomicina.

El anticuerpo anti-CD3 (BD Pharmingen) se diluyó a 10 μ g/ml en PBS (Lonza).

15 Se le añadieron 30 μ l de la solución de anti-CD3 a 10 μ g/ml a los 60 pocillos interiores de una placa de 96 pocillos con fondo en U tratadas para el cultivo de células (Greiner). Las placas se incubaron durante una noche (de 16 a 24 horas) a 37 °C y CO₂ al 5%.

Las células mononucleares de la sangre periférica se separaron de la capa leucocitaria (Sanquin) utilizando el medio de separación PREMIUM Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se resuspendieron en el medio de ensayo a 37 °C.

Los compuestos problema se diluyeron, comenzando a partir de una solución madre de sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 10 mM, con diluciones seriadas en DMSO hasta la concentración problema final a 200 $\times$. Posteriormente, estas soluciones se diluyeron en dos etapas de dilución en el medio de ensayo hasta la concentración problema final a 5 $\times$. La concentración del DMSO de la solución del compuesto problema a 5 $\times$ era del 2,5%.

El anticuerpo anti-CD28 (BD Pharmingen) se diluyó a 10 μ g/ml en el medio de ensayo. Las CMSP se diluyeron a una concentración de $2,2 \times 10^6$ células/ml en el medio de ensayo a 37 °C.

Para el cribado del compuesto, las placas revestidas con anti-CD3 se lavaron dos veces con PBS, los pocillos se aspiraron posteriormente con vacío. A cada pocillo de cribado se le añadieron 90 μ l de la suspensión de CMSP, 30 μ l de la solución de

anti-CD28 y 30 μ l de la solución del compuesto problema a 5 $\times$, lo que da lugar a la concentración problema final con el DMSO al 0,5%. Todos los pocillos exteriores se llenaron con PBS para impedir la evaporación. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C y CO₂ al 5%.

- 5 Después de la incubación, las placas se sedimentaron a 1.500 rpm durante 4 minutos y se recogió el sobrenadante. Posteriormente, la cantidad de IL-17A en los sobrenadantes se determinó con el kit AlphaLISA para IL-17A (Perkin Elmer) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 10 Los valores de la mediana de la concentración inhibidora máxima (CI₅₀) para los compuestos problema se calcularon a partir de la señal de IL-17A con el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software).

Tabla 1

Ejemplo n.º	pIC ₅₀ del ensayo de ROR γ con el gen indicador <i>GAL4</i>			pIC ₅₀ del ensayo de IL-17 en las CMSP		
	Media	Desviación estándar	Número de experimentos	Media	Desviación estándar	Número de donantes humanos
37	7,9	0,2	5	7,9	0,2	11
2	7,4	0,2	5	7,2	0,2	11
3	7,9	0,2	5	7,6	0,3	11

- 15 Ejemplo 7: Protocolo del canal hERG

Los ejemplos 2-3 de la presente solicitud y el ejemplo 37 de la solicitud de patente internacional WO 2015/082533 se ensayaron *in vitro* frente al canal de potasio hERG (gen humano relacionado con el éter a go-go). El procedimiento del ensayo se describe a continuación y los resultados se presentan en la tabla 2.

- 20

Descripción detallada del ensayo

- 25 Se descongelaron las células CHO (de ovario de hámster chino) congeladas que expresan de forma estable los canales hERG y se sembraron sobre portaobjetos de vidrio en placas de Petri. Las células se cultivaron en medio F12 de HAM complementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina a 100 UI/ml, estreptomicina a 100 μ g/ml y G418 a 500 μ g/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA) en una atmósfera de aire al

95%/CO₂ al 5% a 37 °C. Las células CHO estaban listas para el pinzamiento zonal de membrana después de cultivarlas durante 1 a 5 días. Las corrientes del hERG se registraron a temperatura ambiente con la técnica de pinzamiento zonal de membrana de toda la célula con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los electrodos (resistencia de 1 a 3 MΩ) se adaptaron de tubos capilares de vidrio TW150F (World Precision Instruments, Sarasota, FL) y se llenaron con una solución que contiene (en mM): aspartato de potasio 120; KCl 20; Na₂ATP 4; HEPES 5; MgCl₂ 1; pH 7,2 ajustado con KOH. La solución de registro externa contenía (en mM): NaCl 130; KCl 4; acetato de sodio 2,8; MgCl₂ 1; HEPES 10; glucosa 10; CaCl₂ 1 a pH 7,4 ajustado con NaOH. Las corrientes de hERG se desencadenaron con pulsos de despolarización de 2 s hasta +20 mV seguido de la repolarización a -40 mV durante 1,6 s desde un potencial de mantenimiento de -80 mV a una frecuencia de 0,1 Hz. Las corrientes se analizaron utilizando la suite de programas informáticos pCLAMP (Molecular Devices). Los valores de CI₅₀ de los fármacos se obtuvieron utilizando las corrientes de cola del pico durante la etapa de -40 mV mediante el ajuste no lineal de los datos por mínimos cuadrados (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

Ejemplo 8: protocolo de inhibición de CYP3A4

Los ejemplos 2-3 de la presente solicitud y el ejemplo n.º 37 de la solicitud de patente internacional WO 2015/082533 se analizaron por la inhibición de CYP3A4 mediante el uso de dos sondas diferentes: midazolam y testosterona.

El procedimiento del ensayo se describe a continuación y los resultados se presentan en la tabla 2.

Descripción detallada del ensayo

El compuesto problema disuelto en DMSO a las concentraciones seleccionadas se añadió a un tampón de fosfato (50 mM, pH 7,4) que contenía microsomas de hígado de humano (0,1 mg/ml), MgCl (6 mM) y EDTA (0,5 mM), y el sustrato de la sonda del CYP3A, o bien midazolam (3 μM). El compuesto problema se evaluó a las concentraciones de 1, 3, 10 y 30 μM, y la concentración de DMSO final en la incubación fue del 0,5%. Después de la adición de NADPH a 1 M, la mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min (midazolam) o 30 min (testosterona). La reacción se terminó con la adición del estándar interno que contiene CH₃CN frío, se centrifugó y la formación del metabolito específico de CYP3A (1'-hidroximidazolam o bien 6-β-hidroxitestosterona) se cuantificó mediante UPLC-MS/MS. Se calculó la actividad

relativa del CYP3A a cada concentración problema y se determinaron los valores de la Cl_{50} con XLfit.

Tabla 2

Ejemplo n.º	Ensayo de inhibición de CYP3A4 Cl_{50} ; μM		Ensayo de inhibición de hERG Cl_{50} ; μM
	Sonda de midazolam	Sonda de testosterona	
37	10	2,8	4,3
2	24	13	14,2
3	>30	16	11,2

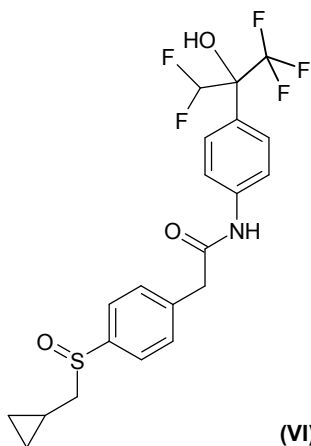
5

La presente solicitud da a conocer nuevos compuestos moduladores de ROR γ , ejemplos 2 y 3, que inhiben la actividad de ROR γ y para los cuales la inhibición de hERG y la inhibición de CYP3A4 disminuyó en comparación con el compuesto de la técnica anterior (ejemplo 37 de la solicitud de patente internacional WO 2015/082533).

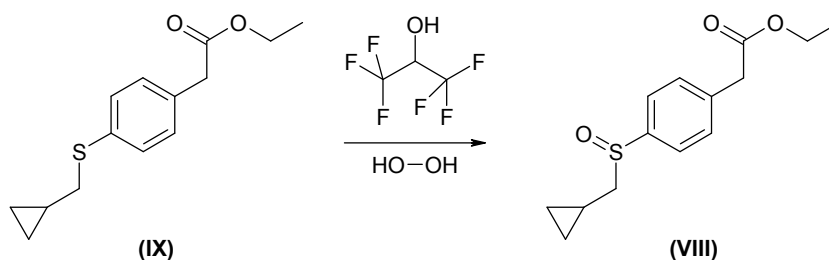
10 Así pues, parece que los compuestos de (Fórmula IA) y de (Fórmula IB) limitan los riesgos de los problemas de seguridad cardíaca y los posibles efectos tóxicos adversos relacionados con las interacciones entre los fármacos, respectivamente, al mismo tiempo que se mantiene la actividad de modulación de ROR γ .

15 Ejemplos 9, 10, 11, 12 y 13: Síntesis de los profármacos:

Ejemplo 9: compuesto de (Fórmula VI): 2-[4-(ciclopropilmetilsulfinil)fenil]-N-[4-[1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.



20

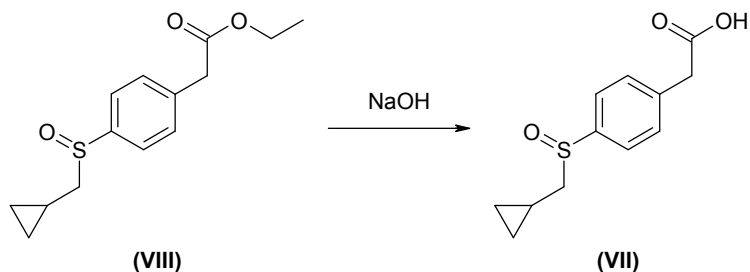
Etapla 1:

En un matraz de 100 ml de fondo redondeado con tres cuellos colocado en argón se añadió peróxido de hidrógeno (2,64 ml, 25,88 mmol, 30% en agua) gota a gota a una solución de 2-[4-(ciclopropilmetilsulfanil)fenil]acetato de etilo (3 g, 11,98 mmol) en 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropán-2-ol (12,53 ml, 113,84 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a TA, luego se le añadió una solución acuosa al 10% de tiosulfato de sodio (50 ml), seguido de salmuera (10 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se tomó en ACN (15 ml), se concentró a presión reducida y se secó a gran vacío para obtener 3,16 g de 2-[4-(ciclopropilmetilsulfinil)fenil]acetato de etilo como un sólido blanco.

MS (ES⁺) *m/z* 267,1 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,62 (d, *J* = 8,28 Hz, 2 H), 7,46 (d, *J* = 8,28 Hz, 2 H), 4,09 (q, *J* = 7,03 Hz, 2 H), 3,76 (s, 2 H), 2,72-2,87 (m, 2 H), 1,18 (t, *J* = 7,15 Hz, 3 H), 0,82-0,96 (m, 1 H), 0,45-0,61 (m, 2 H), 0,19-0,36 (m, 2 H).

20

Etapla 2:

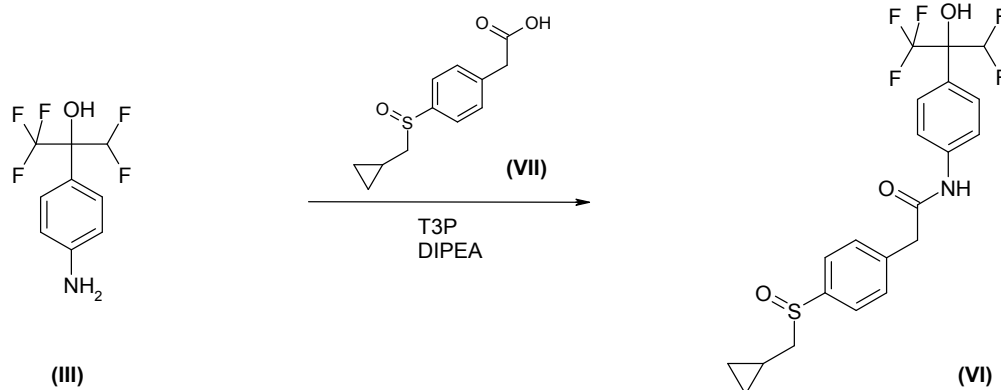
En un matraz de 100 ml de fondo redondeado se añadió una solución acuosa a 1 M de hidróxido de sodio (5,41 ml, 5,41 mmol) a una solución de 2-[4-(ciclopropilmetilsulfinil)fenil]acetato de etilo (400 mg, 1,50 mmol) en EtOH (25 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a TA y luego se concentró al vacío. El

residuo se tomó en agua y después se acidificó con una solución acuosa de HCl a 1 N hasta alcanzar pH 1. La capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para obtener 306 mg de ácido 2-[4-(ciclopropilmetilsulfinil)fenil]acético como un sólido blanco.

MS (ES⁺) m/z 239,1 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,61 (d, J = 8,28 Hz, 2 H), 7,46 (d, J = 8,28 Hz, 2 H), 3,66 (s, 2 H), 2,71-2,89 (m, 2 H), 0,85-0,96 (m, 1 H), 0,46-0,64 (m, 2 H), 0,20-0,36 (m, 2 H).

Etapas 3:



Se añadieron 2-(4-aminofenil)-1,1,1,3,3-pentafluoropropán-2-ol (151,8 mg, 0,63 mmol), *N*-etil-*N*-isopropilpropán-2-amina (0,33 ml, 1,89 mmol) y 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrisfosfinano (50% en DCM, 0,48 ml, 0,82 mmol, gota a gota) a una solución de ácido 2-[4-(ciclopropilmetilsulfinil)fenil]acético (150 mg, 0,63 mmol) en DCM (25 ml), que anteriormente se había colocado en argón en un baño con hielo. Después de agitar durante 30 minutos, se retiró el baño con hielo y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a TA. A continuación, se le añadieron DCM y agua, y se extrajo dos veces la capa acuosa con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ con una solución de HCl acuosa a 0,5 N, con agua y, finalmente, con salmuera. La capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando del 98% al 95% de DCM en MeOH como eluyente para dar 206 mg de 2-[4-(ciclopropilmetilsulfinil)fenil]-*N*-[4-[1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida como una espuma

blanquecina.

MS (ES⁺) *m/z* 462,0 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 10,35 (s, 1 H), 7,45-7,79 (m, 9 H), 6,38-
5 6,88 (m, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,67-2,90 (m, 2 H), 0,75-0,96 (m, 1 H), 0,45-0,62 (m, 2 H),
0,14-0,37 (m, 2 H).

Ejemplos 10, 11, 12 y 13:

Los estereoisómeros VIA y VID se separaron de VI mediante cromatografía
10 quiral en una columna Chiralpak AD 20 μm, 350 × 76,5 mm y una fase móvil,
Heptano:EtOH 50:50, 400 ml/min con detección por UV a 254 nm.

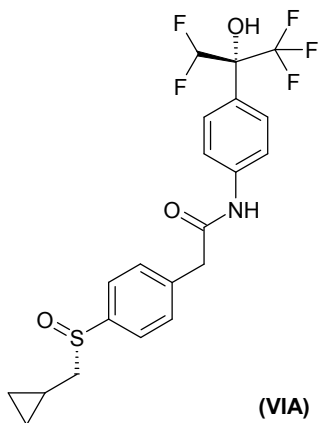
Se comenzó a partir de 160 mg del racemato en 100 ml de heptano:EtOH
50:50, se inyectó una vez la solución para producir, después de la concentración, 34
mg del ejemplo 10 (primer enantiómero a eluir), 35 mg del ejemplo 13 (último
15 enantiómero a eluir) y 70 mg de una mezcla de los ejemplos 11 y 12.

Los estereoisómeros VIB y VIC se separaron de la correspondiente mezcla por
cromatografía quiral en una columna Cellulose-4, 5 μm, 250 × 4,6 mm y una fase
móvil, heptano:EtOH 70:30, 45 ml/min con detección por UV a 254 nm.

Se comenzó a partir de 70 mg de la mezcla en 8 ml de EtOH, se inyectó cuatro
20 veces la solución para producir, después de la concentración, 29 mg de VIB (primer
enantiómero a eluir) y 30 mg de VIC.

Ejemplo 10: compuesto de (Fórmula VIA): (–)-2-[4-[(*S*)-
ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-*N*-[4-[(1*R*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-
hidroxietil]fenil]acetamida.

25 La configuración absoluta se asignó arbitrariamente.



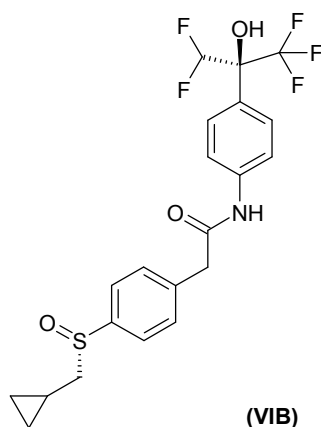
MS (ES⁺) *m/z* 462,2 [M+H]⁺.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 10,35 (s, 1H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 6,64 (t, J = 53,2 Hz, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, J = 6,9 y 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, J = 7,7 y 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49-0,58 (m, 2 H), 0,23-0,33 (m, 2 H).

5 Rotación óptica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -63,6^\circ$ (c = 3,8 mg/ml, DMSO).

Ejemplo 11: compuesto de (Fórmula VIB): (–)-2-[4-[(*S*)-ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-*N*-[4-[(1*S*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.

10 La configuración absoluta se asignó arbitrariamente.



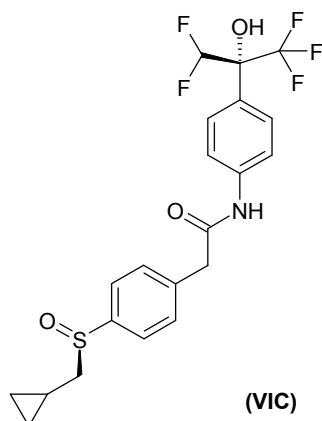
MS (ES⁺) m/z 462,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 6,64 (t, J = 53,2 Hz, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, J = 6,9 y 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, J = 7,7 y 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49-0,58 (m, 2 H), 0,23-0,33 (m, 2 H).

Rotación óptica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -83,1^\circ$ (c = 4,2 mg/ml, DMSO).

Ejemplo 12: compuesto de (Fórmula VIC): (+)-2-[4-[(*R*)-ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-*N*-[4-[(1*R*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.

La configuración absoluta se asignó arbitrariamente.



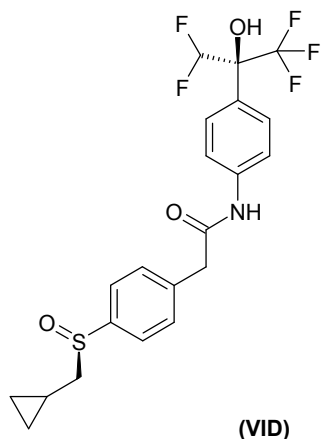
MS (ES⁺) m/z 462,0 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 6,64 (t, J = 53,4 Hz, 1 H),
 5 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, J = 6,9 y 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, J = 7,7 y 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49-0,58 (m, 2 H), 0,23-0,33 (m, 2 H).

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20}$ = +85,6° (c = 5,8 mg/ml, DMSO).

Ejemplo 13: compuesto de (Fórmula VID): (+)-2-[4-[(*R*)-
 10 ciclopropilmetilsulfinil]fenil]-*N*-[4-[(1*S*)-1-(difluorometil)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil]fenil]acetamida.

La configuración absoluta de asignó arbitrariamente.



MS (ES⁺) m/z 462,0 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 6,64 (t, J = 53,4 Hz, 1 H),
 15 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, J = 6,9 y 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, J = 7,7 y 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49-0,58 (m, 2 H), 0,23-0,33 (m, 2 H).

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20}$ = +60,9° (c = 3,8 mg/ml, DMSO).

Ejemplo 14: Solubilidad equilibrada acuosa

Preparación de la muestra

5 El compuesto estudiado se pesó con precisión con una concentración deseada de 2 mg/ml en tampón de fosfato acuoso (50 mM a pH = 7,4). La solución se agitó durante una noche (agitador rocanrol) a TA y se protegió de la luz (unas 24 horas). La solución se filtró en el dispositivo del filtrado de la placa (microplaca Millipore "Silvinert" con el filtro PTFE integrado; 0,45 µm) y el filtrado se dosificó mediante el método de
10 LC/UV.

Preparación de referencia (estándar)

El compuesto estudiado se pesó con exactitud con una concentración deseada de 0,1 mg/ml en DMSO. La solución se trató con ultrasonidos a TA y se protegió de la
15 luz. La solución de referencia se dosificó mediante un método de LC/UV y se midió el pH de la fracción solubilizada.

Tabla 3

Ejemplo n.º	Solubilidad pH 7,5* (µg/ml)
2	<1,0
3	<1,0
9	99,4
10	94,8
11	92,5
12	94,4
13	93,0

*pH de la fracción solubilizada.