

COMPUESTOS DE IMIDAZO-PIPERIDINA FUSIONADA COMO INHIBIDORES DE JAK

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La invención está dirigida a un compuesto inhibidor de la JAK quinasa que es de utilidad para el tratamiento de múltiples enfermedades, en particular enfermedades oftalmológicas, de la piel y respiratorias. La invención también está dirigida a formas cristalinas del compuesto, a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho compuesto, a métodos de uso de dicho compuesto para tratar enfermedades susceptibles al tratamiento con un inhibidor de JAK y a procesos e intermediarios que son de utilidad para preparar el compuesto.

Estado del arte

una gran cantidad de enfermedades o condiciones, en particular de aquellas enfermedades caracterizadas por una inflamación. Muchas de las citoquinas implicadas en enfermedades actúan a través de vías de señalización que dependen de la familia Janus de tirosina quinasas (JAK), que emiten las señales a través de la familia de factores de transcripción de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT).

La inflamación cumple un rol preponderante en muchas enfermedades oftalmológicas que incluyen uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabética, enfermedad de ojo seco, degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena retinal o queratoconjuntivitis atópica. La uveítis abarca múltiples condiciones inflamatorias intraoculares y a menudo es autoinmune, que surgen sin un disparador infeccioso conocido. Se estima que

la condición afecta aproximadamente 2 millones de pacientes en los EEUU. En algunos pacientes, la inflamación crónica asociada con la uveítis conduce a la destrucción de tejido y es la quinta causa principal de ceguera en los EEUU. Las citoquinas elevadas en los ojos de los pacientes con uveítis que envían señales a través de la vía JAK-STAT incluyen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-23 e IFN- γ . (Horai y Caspi, *J Interferon Cytokine Res*, **2011**, 31, 733-744; Ooi et al, *Clinical Medicine and Research*, **2006**, 4, 294-309). Las terapias existentes para la uveítis a menudo son subóptimas y hay un control pobre de muchos de los pacientes. Los esteroides, si bien a menudo son eficaces, están asociados con cataratas y una mayor presión intraocular/glaucoma.

La retinopatía diabética (DR) es causada por daños de los vasos sanguíneos en la retina. Es la causa más común de pérdida de la visión entre las personas con diabetes. Las vías angiogénicas, así como inflamatorias, cumplen un rol importante en la enfermedad. A menudo, la DR progresará en un edema macular diabético (DME), la causa más frecuente de pérdida visual en los pacientes con diabetes. Se estima que la condición afecta aproximadamente a un 1,5 millones de pacientes tan solo en los EEUU, entre los cuales aproximadamente un 20% sufre la enfermedad en ambos ojos. Se cree que las citoquinas que envían señales a través de la vía JAK-STAT, tal como IL-6, así como otras citoquinas, tales como IP-10 y MCP-1 (como alternativa denominadas CCL2), cuya producción está dirigida en parte por la señalización de la vía JAK-STAT, cumplen un rol en la inflamación asociada con DR/DME (Abcouwer, *J Clin Cell Immunol*, **2013**, suplemento 1, 1-12; Sohn et al., *American Journal of Ophthalmology*, **2011**, 152, 686-694; Owen y Hartnett, *Curr Diab Rep*, **2013**, 13, 476-480; Cheung et al, *Molecular Vision*, **2012**, 18,

830-837; Dong et al, *Molecular Vision*, **2013**, 19, 1734-1746; Funatsu et al, *Ophthalmology*, **2009**, 116, 73-79). Las terapias existentes para el DME son subóptimas: tratamientos anti-VEGF intravítreas solamente son eficaces en una fracción de pacientes y los esteroides están asociados con cataratas y una mayor presión intraocular.

La enfermedad de ojo seco (DED) es un trastorno de múltiples factores que afecta aproximadamente a 5 millones de pacientes en los EEUU. Se cree que la inflamación de la superficie ocular cumple un rol importante en el desarrollo y la propagación de esta enfermedad. Los niveles elevados de citoquinas tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IFN- γ se han notado en los fluidos oculares de los pacientes con DED (Stevenson et al, *Arch Ophthalmol*, **2012**, 130, 90-100), y los niveles a menudo se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Se cree asimismo que la degeneración macular relacionada con la edad y la queratoconjuntivitis atópica también están asociados con las citoquinas dependientes de JAK.

La oclusión de la vena retinal (RVO) es una enfermedad inhabilitante de la visión muy prevalente. La obstrucción del flujo de sangre retinal puede conducir al daño de la vasculatura retinal, a hemorragias e isquemia tisular. Aunque las causas de la RVO son de múltiples factores, se ha demostrado que los mediadores vasculares así como inflamatorios son importantes (Deobhakta et al, *International Journal of Inflammation*, **2013**, ID del artículo 438412). Se han detectado citoquinas que emiten señales a través de la vía JAK-STAT, tal como IL-6 e IL-13, así como otras citoquinas, tal como MCP-1, cuya producción está dirigida en parte por la señalización de la vía JAK-STAT, a niveles elevados en los tejidos oculares de los pacientes con RVO (Shchuko et al,

Indian Journal of Ophthalmology, **2015**, 63(12), 905-911). Aunque muchos pacientes con RVO se tratan mediante fotocoagulación, esta es una terapia inherentemente destructiva. Los agentes anti-VEGF también se usan, pero solamente son eficaces en una fracción de los pacientes. También se ha demostrado que las medicaciones esteroides que reducen el nivel de inflamación en el ojo (implantes de triamcinolona acetona y dexametasona) proveen resultados beneficiosos en los pacientes con algunas formas de RVO, pero también se ha mostrado que causa cataratas y una mayor presión intraocular/glaucoma.

La dermatitis atópica (AD) es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel común que afecta aproximadamente 14 millones de personas solamente en los EEUU. Se estima que la AD afecta un 10-20% de los niños y 1-3% de los adultos en los países desarrollados (Bao et al., *JAK-STAT*, **2013**, 2, e24137) y su prevalencia está aumentando. La AD se ha asociado con una elevación de las citoquinas proinflamatorias que se basan en la vía JAK-STAT, en particular, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN γ (Bao et al., Leung et al., *The Journal of Clinical Investigation*, **2004**, 113, 651-657). Además, se ha mostrado que un aumento de la expresión de la IL-31, otra citoquina cuyas señales actúan a través de parejas con JAK, cumple un rol en la pruritis asociada con el estado crónico de la AD. (Sunkoly et al., *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2006**, 117, 411-417)

El asma es una enfermedad crónica de las vías aéreas para la cual no hay prevención ni cura. La enfermedad se caracteriza por presentar inflamación, fibrosis, hipersensibilidad y remodelación de las vías aéreas, todas las cuales contribuyen a la limitación del flujo de aire. Se estima que 300

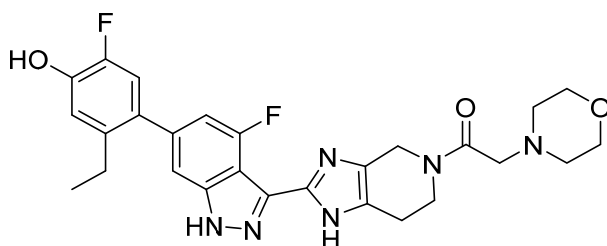
millones de personas en todo el mundo padecen de asma y se estima que el número de personas con asma aumentará en más de 100 millones para el año 2025. Aunque la mayoría de los pacientes pueden lograr un control de los síntomas del asma mediante el uso de corticosteroides inhalados que se pueden combinar con un modificador de leucotrienos y/o un agonista beta de acción prolongada, existe un subconjunto de pacientes con asma severo cuya enfermedad no se puede controlar con las terapias convencionales. Las citoquinas implicadas en la inflamación del asma cuyas señales comprometen la vía JAK-STAT incluyen IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), interferón- γ (IFN γ) y el factor estimulante de colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).

Dada la cantidad elevada de citoquinas en las enfermedades inflamatorias y que cada citoquina está asociada con una pareja particular de JAK, un inhibidor químico con actividad contra todos los miembros de la familia JAK podría tener una gran utilidad en el tratamiento de enfermedades oftalmológicas, de la piel y respiratorias. Persiste la necesidad de un potente inhibidor de pan-JAK.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención provee un compuesto inhibidor de JAK útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

En particular, en un aspecto, la invención provee 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona de la fórmula



1

en lo sucesivo el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también provee formas cristalinas del compuesto, la Forma 1 y la Forma 2.

La invención también provee una composición farmacéutica que comprende el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad oftalmológica en un mamífero, donde dicho método comprende administrar al mamífero el compuesto **1**, o una composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la enfermedad oftalmológica es uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabética, enfermedad de ojo seco, degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena retinal y queratoconjuntivitis atópica. En particular, la enfermedad oftalmológica es edema macular diabética o uveítis.

En aún otro aspecto del método, la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la piel, en particular dermatitis atópica, donde dicho método comprende aplicar el compuesto **1**, o una composición farmacéutica de la invención, a la piel del mamífero.

En un aspecto adicional, la invención provee un método de tratamiento

de una enfermedad respiratoria en un mamífero, donde dicho método comprende administrar el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica de la invención, al mamífero.

En aspectos independientes y diferentes, en la invención también se proveen los procesos de síntesis y los intermediarios que se describen en la presente, que son útiles para preparar el compuesto **1**.

La invención también provee el compuesto **1** descrito en la presente para usar en una terapia médica, así como el uso del compuesto de la invención en la elaboración de una formulación o un medicamento para tratar una enfermedad oftalmológica, una enfermedad de la piel o una enfermedad respiratoria en un mamífero.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Diversos aspectos de la presente invención se ilustran con referencia a los dibujos adjuntos.

En la Figura 1 se muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de la Forma cristalina 2 del compuesto **1** (de aquí en adelante denominada Forma 2).

En la Figura 2 se muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma cristalina 2.

En la Figura 3 se muestra un trazado de un análisis termogravimétrico (TGA) de la Forma cristalina 2.

En la Figura 4 se muestra una isoterma de sorción de humedad dinámica (DMS) de la Forma cristalina 2 observada a una temperatura de aproximadamente 25 °C

En la Figura 5 se muestra una imagen de microscopía de luz polarizada

de la Forma 2.

En la Figura 6 se muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de la Forma 1 del compuesto **1** (de aquí en adelante denominada Forma 2).

En la Figura 7 se muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma cristalina 1.

En la Figura 8 se muestra un trazado de un análisis termogravimétrico (TGA) de la Forma cristalina 1.

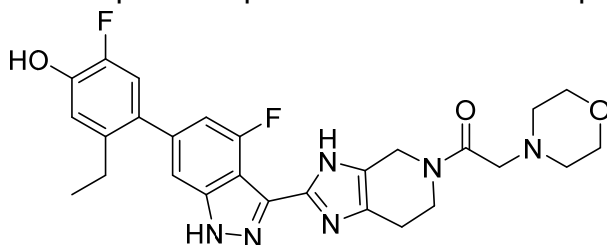
En la Figura 9 se muestra una isoterma de sorción de humedad dinámica (DMS) de la Forma cristalina 1 observada a una temperatura de aproximadamente 25 °C

En la Figura 10 se muestra una imagen de microscopía de luz polarizada de la Forma 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las estructuras químicas se nombran en la presente de acuerdo con las convenciones de la IUPAC implementadas en el programa de computación ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA).

Aún más, la porción imidazo de la unidad tetrahidroimidazopiridina en la estructura del compuesto de la presente existe en formas tautoméricas. El compuesto se podría representar de manera equivalente como



tetrahidroimidazopiridina. Por lo tanto, esta estructura se denomina 1-(2-(6-(2-

etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-3,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona. También se puede denominar 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona. Definiciones

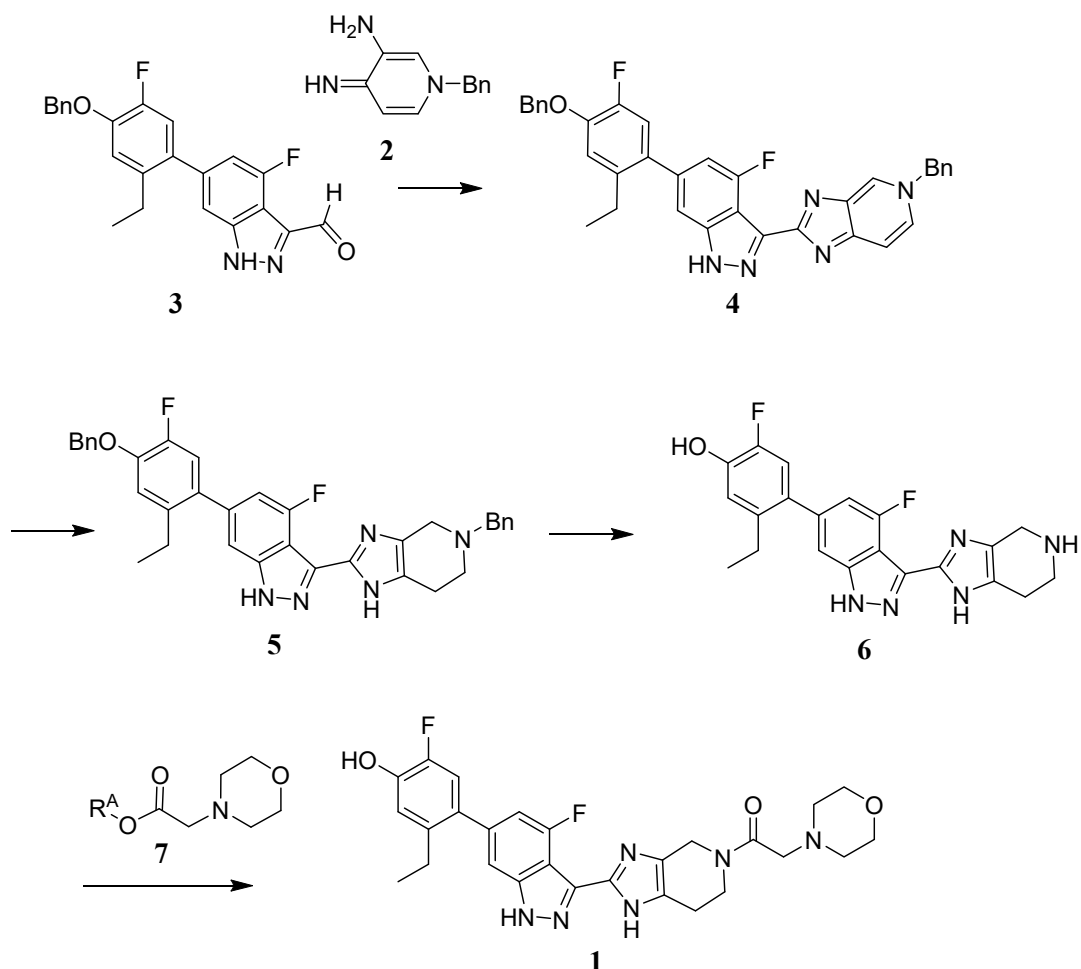
Al describir esta invención, incluyendo sus diversos aspectos y formas de realización, los siguientes términos tienen las definiciones que se ofrecen a continuación, a menos que se indique de otra manera.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para efectuar un tratamiento cuando se administra a un paciente que necesita del tratamiento.

En particular, se podrá apreciar que el compuesto **1** se puede preparar mediante una variedad de rutas de proceso en donde los reactivos se combinan en órdenes distintos para proveer intermediarios diferentes en la ruta para producir los productos finales.

La preparación de 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (compuesto **1**) se describe con detalle en los ejemplos adjuntos. Los pasos más importantes se resumen en el Esquema 1

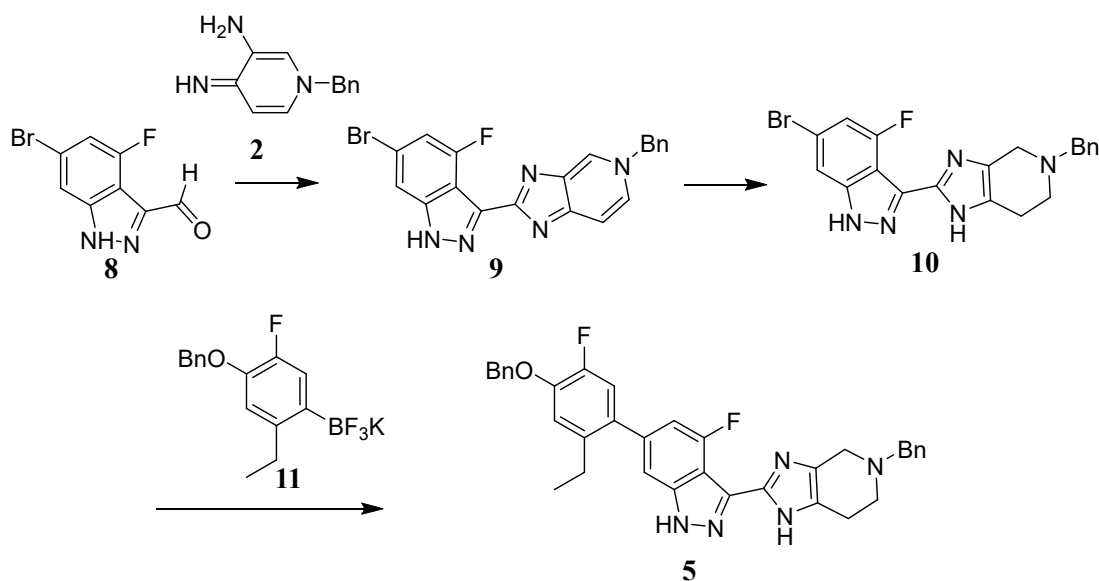
Esquema 1



donde el reactivo **7** es 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo 2-morfolinacetato, es decir la variable R^A representa al agente de activación 2,5-dioxopirrolidinilo, como se describe en el Ejemplo 1. Como alternativa, el ácido morfolin-4-ilacético, es decir R^A representa hidrógeno, se usa como el reactivo **7**, bajo las típicas condiciones de formación de enlaces amida, como se describe en el Ejemplo 4.

El intermediario **3** se puede preparar como se describe más adelante en las Preparaciones 1 y 3. En el Esquema 2 se ilustra un método de preparación alternativo del intermediario protegido clave **5**.

Esquema 2



El aldehído de bromoindazol **8** se puede hacer reaccionar con el compuesto imina protegido con bencilo **2** para proveer el intermediario **9**. La reacción típicamente tiene lugar en la presencia de bisulfito de sodio, a una temperatura de entre aproximadamente 130 °C y aproximadamente 140 °C por entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 horas o hasta que la reacción se haya completado sustancialmente. El compuesto **9** se reduce usando un agente reductor, tal como borohidruro de sodio, para proveer el compuesto **10**, que se combina con el feniltrifluoroborato protegido **11** bajo las típicas condiciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura para proveer el intermediario **5**. La reacción se conduce típicamente a una temperatura elevada en la presencia de un catalizador de paladio. El miembro de Suzuki **11**, que se muestra en el Esquema 2 como la sal trifluoroborato de potasio, se puede preparar mediante reacción del boronato correspondiente (Intermediario **1-5** en la Preparación 1, más adelante) con difluoruro ácido de potasio para proveer el intermediario **11**. Como alternativa, se puede usar el intermediario de boronato en lugar del trifluoroborato **11**.

En un aspecto adicional del método, la invención provee un compuesto de la fórmula **5** y un compuesto de la fórmula **6**, que son de utilidad en la preparación de un compuesto de la fórmula **1**.

Formas cristalinas

En otro aspecto, la invención provee 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (**1**) en una forma cristalina.

Forma 1

La forma cristalina **1** de la invención es una forma cristalina libre del compuesto **1**. En un aspecto, la Forma **1** se caracteriza por presentar un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) que tiene picos de difracción significativos, entre otros picos, a valores 2θ de $8,16 \pm 0,20$, $8,97 \pm 0,20$, $15,29 \pm 0,20$, $16,70 \pm 0,20$, $18,00 \pm 0,20$ y $20,18 \pm 0,20$. La Forma **1** se puede caracterizar además por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluyendo tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales, a valores 2θ seleccionados entre $7,69 \pm 0,20$, $10,66 \pm 0,20$, $11,46 \pm 0,20$, $11,91 \pm 0,20$, $15,80 \pm 0,20$, $17,02 \pm 0,20$, $18,83 \pm 0,20$, $22,39 \pm 0,20$, $22,98 \pm 0,20$, $24,89 \pm 0,20$ y $26,54 \pm 0,20$. En otro aspecto, la Forma **1** se caracteriza por presentar un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción a valores 2θ seleccionados entre $8,16 \pm 0,20$, $8,97 \pm 0,20$, $15,29 \pm 0,20$, $16,70 \pm 0,20$, $18,00 \pm 0,20$ y $20,18 \pm 0,20$.

Como es bien conocido en el campo de la difracción de rayos X de polvo, las posiciones de los picos del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y la geometría del instrumento, que las alturas relativas de los

picos. Por consiguiente, en un aspecto, la forma cristalina 1 se caracteriza por presentar un patrón de difracción de rayos X de polvo en donde las posiciones de los picos son sustancialmente acordes con las que se muestran en la Figura 6.

En otro aspecto, la Forma cristalina 1 se caracteriza por presentar su comportamiento cuando se la expone a una temperatura alta. Según se muestra en la Figura 7, el trazado de calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto presenta un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, en el rango de entre aproximadamente 210 °C y aproximadamente 234 °C, o en el rango de entre aproximadamente 215 °C y aproximadamente 229 °C, o en el rango de entre aproximadamente 220 °C y aproximadamente 224 °C. La forma cristalina 1 se caracteriza por presentar un trazado de calorimetría diferencial de barrido registrado a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto que presenta un máximo en el flujo de calor endotérmico con un pico en aproximadamente 221,7 °C. El trazado del análisis termogravimétrico (TGA) de la Figura 8 no muestra una pérdida de peso significativa a temperaturas por debajo del inicio de la descomposición a aproximadamente 293 °C.

En la Figura 9 se muestra un trazado de sorción de humedad dinámica (DMS) representativo para la forma cristalina libre, Forma 1, de la invención. La Forma cristalina 1 mostró una pequeña histéresis entre dos ciclos de sorción y desorción. La Forma 1 mostró una ganancia de peso de aproximadamente 0,99% en el rango de humedad de entre 5% y 70% de humedad relativa y aproximadamente 1,32% de ganancia de peso en el rango de humedad de entre 5% y 90% de humedad relativa a temperatura ambiente, como se

muestra en la Figura 9. Se considera que la Forma 1 es ligeramente higroscópica.

Se ha mostrado que la Forma cristalina 1 es estable tras la exposición a una temperatura y humedad elevadas. Después de 36 semanas a condiciones aceleradas de 40 °C y 75% de humedad relativa, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la pureza química.

La Forma 1 se puede preparar disolviendo el compuesto **1** en etanol tras calentamiento, seguido por adición de acetonitrilo, en donde la relación de acetonitrilo a etanol es de aproximadamente 1:1, o de entre aproximadamente 1:3 y 3:1. Luego se calienta la mezcla resultante, seguido por agitación a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C por entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 30 horas, o durante aproximadamente 16 horas. Después se filtra el sólido y se seca para proveer la Forma 1.

La Forma 1 también se puede preparar mediante mezclado del compuesto **1** con etanol y agitación de la mezcla a una temperatura de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 80 °C por aproximadamente entre 2 y 30 minutos, o aproximadamente 10 minutos, seguido por adición lenta de acetonitrilo a una temperatura de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 80 °C, en donde la relación en volumen de acetonitrilo a etanol es de entre aproximadamente 3:1 y 1:1 o de aproximadamente 1,5:1. Se pueden agregar semillas de la Forma 1 y la mezcla de reacción se agita a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C por entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 30 horas, o durante aproximadamente 18 horas. Después se filtra el sólido y se seca para proveer

la Forma 1.

Forma 2

La forma cristalina 2 de la invención es una forma cristalina libre del compuesto **1**. En un aspecto, la Forma 2 se caracteriza por presentar un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) que tiene picos de difracción significativos, entre otros picos, a valores 2θ de $10,61 \pm 0,20$, $11,84 \pm 0,20$, $14,94 \pm 0,20$, $18,26 \pm 0,20$ y $19,06 \pm 0,20$. La Forma 2 también se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción adicionales a valores 2θ de $13,32 \pm 0,20$, $17,69 \pm 0,20$ y $21,10 \pm 0,20$. La Forma 2 se puede caracterizar además por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluyendo tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre $10,85 \pm 0,20$, $16,14 \pm 0,20$, $16,35 \pm 0,20$, $18,43 \pm 0,20$, $19,20 \pm 0,20$, $19,49 \pm 0,20$, $20,72 \pm 0,20$, $21,94 \pm 0,20$, $22,64 \pm 0,20$, $23,64 \pm 0,20$, $25,19 \pm 0,20$ y $28,08 \pm 0,20$.

En otro aspecto, la Forma 2 se caracteriza por presentar un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción a valores 2θ seleccionados entre $10,61 \pm 0,20$, $11,84 \pm 0,20$, $13,32 \pm 0,20$, $14,94 \pm 0,20$, $17,69 \pm 0,20$, $18,26 \pm 0,20$, $19,06 \pm 0,20$ y $21,10 \pm 0,20$.

Como es bien conocido en el campo de la difracción de rayos X de polvo, las posiciones de los picos del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y la geometría del instrumento, que las alturas relativas de los picos. Por consiguiente, en un aspecto, la forma cristalina 2 se caracteriza por presentar un patrón de difracción de rayos X de polvo en donde las posiciones de los picos son sustancialmente acordes con las que se muestran en la Figura

1.

La estructura de la Forma cristalina 2 también se ha caracterizado mediante análisis de difracción de rayos X de un solo cristal. Los cristales pertenecen a un sistema cristalino ortorómbico y al grupo espacial *Pbca*. Las dimensiones de la celda unitaria son: $a = 9,7245(11) \text{ \AA}$, $b = 16,8197(14) \text{ \AA}$, $c = 32,604(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, volumen = $5332,8(10) \text{ \AA}^3$. La densidad calculada es de $1,302 \text{ g/cm}^3$. Los cristales contienen ocho moléculas por celda unitaria. La estructura confirma que los cristales no contienen agua u otras moléculas de solvente y la estructura molecular es consistente con la estructura del compuesto del Ejemplo 1 descrito en la presente. Los picos de difracción de rayos X de polvo predichos a partir de las posiciones atómicas derivadas son acordes con los resultados observados.

En otro aspecto, la Forma cristalina 2 se caracteriza por presentar su comportamiento cuando se la expone a una temperatura alta. Según se muestra en la Figura 2, el trazado de calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto presenta un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, en el rango de entre aproximadamente $268 \text{ }^\circ\text{C}$ y aproximadamente $277 \text{ }^\circ\text{C}$, o en el rango de entre aproximadamente $270 \text{ }^\circ\text{C}$ y aproximadamente $275 \text{ }^\circ\text{C}$, o en el rango de entre aproximadamente $271 \text{ }^\circ\text{C}$ y aproximadamente $274 \text{ }^\circ\text{C}$. La forma cristalina 2 se caracteriza por presentar un trazado de calorimetría diferencial de barrido registrado a una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto que presenta un máximo en el flujo de calor endotérmico con un pico en aproximadamente $272 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

El trazado del análisis termogravimétrico (TGA) de la Figura 3 no

muestra una pérdida de peso significativa a temperaturas por debajo del inicio de la descomposición a aproximadamente 269 °C.

En la Figura 4 se muestra un trazado de sorción de humedad dinámica (DMS) representativo para la forma cristalina libre, Forma 2, de la invención. La Forma cristalina 2 no mostró histéresis entre dos ciclos de sorción y desorción y demostró una tendencia excepcionalmente pequeña de higroscopicidad. La Forma 2 mostró una ganancia de peso de aproximadamente 0,18 % en el rango de humedad de entre 5% y 90% de humedad relativa y aproximadamente 0,12 % de ganancia de peso en el rango de humedad de entre 5% y 70% de humedad relativa a temperatura ambiente, como se muestra en la Figura 4. Se considera que la Forma 2 no es higroscópica.

La Forma 2 se puede preparar mediante disolución del compuesto **1** del ejemplo 1 en DMSO (por ejemplo, a una relación de 1 g del compuesto **1** para entre 1 y 3 ml, o aproximadamente 2 ml de DMSO) a una temperatura de entre aproximadamente 45 y 75 °C, o a aproximadamente 60 °C, seguido por adición de metanol, en donde la relación en volumen de metanol a DMSO es de entre aproximadamente 1:4 y aproximadamente 1:1, o de aproximadamente 1:2. Luego se agrega la mezcla homogénea por gotas a una solución premezclada de metanol y agua (en donde la relación de metanol a DMSO es de entre 1,5 y 3 a 1), a una temperatura de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 90 °C, o de aproximadamente 75 °C, en donde la relación en volumen de la solución premezclada de metanol a agua es de entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 1:2, o de aproximadamente 1:0,9. Luego se deja la mezcla con agitación a una temperatura de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 90 °C, o de aproximadamente 75 °C, por entre

aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, o aproximadamente 1 hora. Luego se puede agregar agua lentamente a una temperatura de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 90 °C, o de aproximadamente 75 °C, en donde la relación en volumen de agua a metanol es de entre 2 y 4. Después la lechada resultante se enfría lentamente hasta temperatura ambiente (típicamente, una temperatura de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 °C), típicamente durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 horas o aproximadamente 6 horas. La lechada se mantiene luego a temperatura ambiente y luego se filtra y se lava con una mezcla de agua y metanol de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 90%, o de aproximadamente 70% de agua, para proveer la Forma 2.

En un aspecto, la invención provee un método para preparar la Forma cristalina 2 que comprende:

(a) formar una mezcla homogénea de 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona en un solvente aprótico polar o en un solvente polar miscible en agua o en una mezcla de un solvente aprótico polar y un solvente polar miscible en agua, a una temperatura de entre 45 y 75 °C;

(b) agregar la mezcla homogénea a una mezcla de un solvente miscible en agua y agua, a una temperatura de entre 60 y 90 °C para obtener una segunda mezcla;

(c) agregar lentamente agua a la segunda mezcla a una temperatura de entre 60 y 90 °C para formar una lechada; y

(d) aislar la forma cristalina a partir de la lechada.

En algunos aspectos, el solvente aprótico polar del paso (a) se

selecciona del grupo que consiste en DMSO, DMF, NMP, DMAc y nitrometano, el solvente polar miscible en agua del paso (a) se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, acetona, metanol, etanol y THF, y el solvente miscible en agua del paso (b) se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, acetona, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, THF, DMSO, DMF, NMP, DMAc y nitrometano. En algunos aspectos, el solvente aprótico polar del paso (a) es DMSO, el solvente polar miscible en agua del paso (a) es metanol y el solvente miscible en agua del paso (b) es metanol.

En algunos aspectos, la lechada obtenida en el paso (c) se enfría hasta una temperatura de entre aproximadamente 20 y 25 °C antes del paso (d).

Como alternativa, la Forma 2 se puede formar mediante agitación del compuesto **1** obtenido en el Ejemplo 1 en una mezcla de un solvente miscible en agua polar y agua, a una temperatura de entre 60 y 90 °C. En algunos aspectos, la relación de solvente a agua es de aproximadamente 1:1, o de entre 2:1 y 0,5:1. En algunos aspectos, el solvente miscible en agua polar se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, acetona, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, THF, DMSO, DMF, NMP, DMAc y nitrometano.

Composiciones farmacéuticas

El compuesto **1**, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, típicamente se usa en la forma de una composición o formulación farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar ventajosamente a un paciente a través de cualquier ruta de administración aceptable, que incluye, pero en un sentido no taxativo, los modos de administración oral, por inhalación, inyección óptica, tópica (incluyendo transdérmica), rectal, nasal y

parenteral.

Cuando se describen las composiciones y los usos de las mismas, el compuesto **1** también se puede denominar en la presente como el "agente activo".

En algunos aspectos, la divulgación provee una composición farmacéutica que comprende el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la Forma 1 o la Forma 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es adecuada para su aplicación en el ojo. En algunos aspectos, la composición es adecuada para su inyección en el ojo. En algunos aspectos, la composición es adecuada para una inyección intravítrea. En algunos aspectos, la composición es una suspensión. En algunos aspectos, la composición es una suspensión cristalina. En algunos aspectos, la composición es una suspensión de la Forma 1 o la Forma 2.

Cuando se desee una administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, en forma de cápsulas, tabletas, píldoras y semejantes), las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente comprenderán el agente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente o como alternativa, dichas formas de dosificación sólidas pueden comprender rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, fosfato dicálcico, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes desintegrantes, tales como croscarmelosa de sodio, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y/o carbonato de sodio;

agentes que demoran la solubilización, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y/o arcilla bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y/o mezclas de los mismos; agentes colorantes; y agentes amortiguadores.

También puede haber agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes presentes en las composiciones farmacéuticas de esta invención. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y semejantes; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y semejantes; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y semejantes. Los agentes de recubrimiento para las tabletas, las cápsulas, las píldoras y semejantes incluyen los que se emplean para los recubrimientos entéricos, tales como ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ésteres de ácido metacrílico, trimetilato de acetato de celulosa, carboximetiletilcelulosa, succinato y acetato de hidroxipropil metil celulosa y semejantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden

formular para lograr una liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropil metil celulosa en proporciones variables u otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener opcionalmente agentes opacantes y se pueden formular de modo que liberen el ingrediente activo solamente, o con preferencia, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente de una manera demorada. Los ejemplos de composiciones de embebimiento que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también se puede encontrar en una forma microencapsulada, de ser apropiado, con uno o más de los excipientes descritos previamente.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen, a modo ilustrativo, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elíxires farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación líquidas típicamente comprenden el agente activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (especialmente aceite de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, castor y sésamo), ácido oleico, glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Como alternativa, algunas formulaciones líquidas se pueden convertir, por ejemplo, mediante secado por aspersión, a un polvo, que se usa para preparar formas de dosificación sólidas mediante procedimientos convencionales.

Las suspensiones, además del ingrediente activo, pueden contener agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de éstos.

El compuesto **1** también se puede administrar por vía parenteral (por ejemplo, por medio de una inyección subcutánea, intramuscular o intraperitoneal). Para la administración parenteral, el agente activo típicamente se mezcla con un vehículo apropiado para la administración parenteral, lo que abarca, a modo de ejemplo, las soluciones acuosas estériles, la solución salina, los alcoholes de bajo peso molecular, tales como el propilenglicol o el polietilenglicol, los aceites vegetales, la gelatina, los ésteres de ácidos grasos, tales como el oleato de etilo, y semejantes. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más antioxidantes, solubilizadores, estabilizadores, preservantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes amortiguadores o agentes dispersantes. Estas formulaciones se pueden esterilizar usando un medio inyectable estéril, un agente esterilizante, filtración, irradiación o calor.

El compuesto **1** también se puede formular como una suspensión o solución acuosa estéril para una inyección ocular. Los excipientes útiles que se pueden incluir en dicha formulación acuosa incluyen Polisorbato 80, polímeros de celulosa tales como carboximetilcelulosa, hidroxipropilo metilcelulosa, metilcelulosa, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, acetato de sodio, citrato de sodio, histidina, α - α -trehalosa dihidratado, sacarosa, Polisorbato 20, hidroxipropil- β -ciclodextrina, cloruro de

benzalconio, Amberlite IRP-69, éteres (laurílico, estearílico y oleílico) de polietilenglicol, sal de sodio del ácido etilendiamintetracético, taurocolato de sodio, saponinas y Cremophor EL, policarbofil-cisteínas, goma de xantán, goma Gellan, ácido hialurónico, liposomas y fosfato de sodio. Se pueden incluir mejoradores de la permeabilidad, agentes tensioactivos, ácidos biliares, ciclodextrinas tal como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, y agentes quelantes en la formulación. También se pueden incluir oligonucleótidos cilíndricos con una superficie externa hidrofílica y una superficie interna lipofílica que tienen la capacidad para formar complejos con un agente activo en la formulación. El alcohol bencílico puede servir como un conservante y se puede incluir cloruro de sodio para ajustar la tonicidad. Además, se puede agregar ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio a la solución para ajustar el pH. Las formulaciones acuosas para inyecciones oculares se pueden preparar libres de conservantes.

La formulación ocular puede permitir una liberación sostenida del ingrediente activo en el ojo. La formulación ocular se puede formular como una emulsión (aceite en agua o agua en aceite), una suspensión o un ungüento. La formulación en suspensión puede contener al compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como una forma cristalina, por ejemplo la Forma 1 o la Forma 2, o en un estado amorfo.

El compuesto **1** también se puede formular para que sea adecuado para una dosificación como gotas oftálmicas o como un implante intravítrea. El implante puede permitir el suministro de niveles terapéuticos constantes del fármaco. Los implantes de reservorios típicamente se efectúan con un núcleo del fármaco peleteado rodeado por sustancias no reactivas tales como silicona, etileno-acetato de vinilo (EVA) o alcohol polivinílico (PVA); estos implantes no

son biodegradables y pueden suministrar cantidades continuas de un fármaco durante meses y hasta años. También se pueden usar implantes de matrices. Se utilizan típicamente para suministrar una dosis de carga seguida por dosis más reducidas del fármaco por un período de tiempo de entre 1 día y 6 meses. Más comúnmente se elaboran con los copolímeros de ácido poliláctico (PLA) y/o ácido poliláctico glicólico (PLGA), que se degradan en agua y dióxido de carbono. También se puede usar iontoforesis. Se trata de una técnica no invasiva en la cual se aplica una pequeña corriente eléctrica para favorecer la penetración del fármaco ionizado en el tejido.

La tecnología de células encapsuladas (ECT), que es un sistema de administración basado en células, también se puede usar para suministrar el agente terapéutico en el ojo. Típicamente, se envasan células modificadas genéticamente en un tubo hueco de una membrana semipermeable, que impide la entrada de células inmunológicas y permite que los nutrientes y las moléculas terapéuticas difundan libremente a través de la membrana. Se sellan los dos extremos de la sección del polímero, y se coloca un bucle de titanio sobre el extremo del anclaje, que se implanta en el pars plana y se ancla en la esclera.

El compuesto **1** se puede formular en cualquier forma que permita el suministro en la parte posterior del ojo. Los ejemplos de modos de administración son conocidos en la literatura (Kuno et al, *Polymers*, **2011**, 3, 193-221, del Amo et al, *Drug Discovery Today*, **2008**, 13, 135-143, Short, *Toxicologic Pathology*, **2008**, 36, 49-62). Dichos modos de administración incluyen, pero en un sentido no taxativo, la administración supracoroidal que permite el suministro en la coroide y la retina a través del espacio

supracoroidal, el suministro sub-Tenon, el suministro periocular, lentes de contacto, tapones lacrimales y tapones de esclera. El compuesto **1** también se puede administrar mediante una inyección periocular, supraescleral, retrobulbar, peribulbar o subconjuntiva.

El compuesto **1** se puede suministrar como una emulsión, micro o nanoesferas poliméricas, liposomas, micro o nanopartículas, microesferas, micelas o dendrímeros. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como polilactida y PLGA. El compuesto **1** se puede encapsular.

Además, el compuesto **1** se puede formular para una administración tópica en la piel como un ungüento o una crema. Las formulaciones de ungüentos son preparaciones semisólidas que tienen una base de un material oleoso o de grasa que típicamente es translúcido. Los materiales oleosos adecuados para usar en las formulaciones de ungüentos incluyen vaselina (jalea de petróleo), cera de abejas, manteca de cacao, manteca de karité y alcohol cetílico. Los ungüentos además pueden incluir opcionalmente emolientes y mejoradores de la penetración, si se deseara.

Las formulaciones de crema se pueden preparar como emulsiones que comprenden una fase de aceite y una fase acuosa, típicamente incluyen agua purificada. Los componentes de formulaciones de cremas pueden incluir: bases de aceite, tales como vaselina, aceites minerales, aceites vegetales y animales y triglicéridos; bases de cremas, tales como alcoholes de lanolina, ácido esteárico y alcohol cetoestearílico; una base de gel, tal como alcohol polivinílico; solventes, tales como, propilenglicol y polietilenglicol; emulsionantes, tales como polisorbatos, estearatos, tales como estearato de

glicerilo, octilhidroxiestearato, estearato de polioxilo, éteres estearílicos de PEG, palmitato de isopropilo y monoestearato de sorbitán; estabilizantes, tales como polisacáridos y sulfito de sodio; emolientes (es decir, humectantes), tales como triglicéridos de cadena mediana, miristato de isopropilo y dimeticona; agentes endurecedores, tales como alcohol cetílico y alcohol estearílico; agentes antimicrobianos, tales como metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, ácido sórbico, diazolidinilurea e hidroxianisol butilado; mejoradores de la penetración, tales como *N*-metilpirrolidona, propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol y semejantes; y agentes quelantes, tal como edetato disódico.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración por inhalación. Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración por inhalación típicamente tomarán la forma de un aerosol o un polvo. Dichas composiciones generalmente se administran usando dispositivos de administración bien conocidos, tales como un nebulizador de inhalación, un inhalador de dosis medidas, un inhalador de polvo seco o un dispositivo de administración similar.

Cuando se las administra por inhalación usando un recipiente presurizado, las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente comprenden el ingrediente activo y un propelente apropiado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. Además, la composición farmacéutica puede tomar la forma de una cápsula o un cartucho (por ejemplo, de gelatina), que comprende el compuesto **1** y un polvo apropiado para usar en un inhalador de polvo. Las bases de polvo apropiadas incluyen, a modo de ejemplo, lactosa o

almidón.

Los siguientes ejemplos no taxativos ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención:

Forma de dosificación sólida oral de comprimidos

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se mezcla en seco con celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona y crosscarmellosa sódica en una relación de 4:5:1:1 y se comprime en comprimidos para proveer una dosificación unitaria de, por ejemplo, 5 mg, 20 mg o 40 mg de agente activo por comprimido.

Forma de dosificación sólida oral de cápsulas

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se combina con celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona y crosscarmellosa sódica en una relación de 4:5:1:1 mediante granulación húmeda y se cargó en cápsulas de gelatina o de hidroxipropilmetilcelulosa para proveer una dosificación unitaria de, por ejemplo, 5 mg, 20 mg o 40 mg de agente activo por cápsula.

Formulación líquida

Se forma una formulación líquida que comprende al compuesto **1** (0,1%), agua (98,9%) y ácido ascórbico (1,0%) mediante adición de un compuesto de la invención a una mezcla de agua y ácido ascórbico.

Forma de dosificación oral con recubrimiento entérico

El compuesto **1** se disuelve en una solución acuosa que contiene polivinilpirrolidona y se recubre por aspersion sobre esferas de celulosa microcristalina o azúcar en una relación de 1:5 p/p de agente activo:esferas y luego se aplica aproximadamente 5% de aumento de peso de un recubrimiento

entérico que comprende un copolímero acrílico. Las esferas con el recubrimiento entérico se cargan en cápsulas de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa para proveer una dosificación unitaria de, por ejemplo, 30 mg del agente activo por cápsula.

Forma de dosificación oral con recubrimiento entérico

Se aplica un recubrimiento entérico que comprende una combinación de Eudragit-L® y Eudragit-S®, o acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa a una forma de dosificación oral de comprimidos o a una forma de dosificación oral de cápsula descritas precedentemente.

Formulación acuosa para inyecciones oculares

Cada ml de una suspensión acuosa estéril incluye entre 5 mg y 50 mg del compuesto **1**, cloruro de sodio para la tonicidad, 0,99% (p/v) de alcohol bencílico como conservante, 0,75% de carboximetilcelulosa de sodio y 0,04% de Polisorbato. Se puede incluir hidróxido de sodio o ácido clorhídrico para ajustar el pH entre 5 y 7,5.

Formulación acuosa para inyecciones oculares

Una suspensión acuosa libre de conservante estéril incluye entre 5 mg/ml y 50 mg/ml del compuesto **1** en fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 40 mM, 0,03% de Polisorbato 20 y 5% de sacarosa.

Formulación de ungüento para una administración tópica

El compuesto **1** se combina con vaselina, C₈-C₁₀ triglicérido, octilhidroxiestearato y N-metilpirrolidona en una relación que proporcione una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de ungüento para una administración tópica

El compuesto **1** se combina con vaselina blanca, propilenglicol, mono y

diglicéridos, parafina, hidroxitolueno butilado y edetato disódico de calcio en una relación que proporcione una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de ungüento para una administración tópica

El compuesto **1** se combina con aceite mineral, parafina, carbonato de propileno, vaselina blanca y cera blanca para proveer una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de cremas para una administración tópica

Se combina aceite mineral con el compuesto **1**, propilenglicol, palmitato de isopropilo, Polisorbato 60, alcohol cetílico, monoestearato de sorbitán, estearato de polioxilo 40, ácido sórbico, metilparabeno y propilparabeno para formar una fase de aceite, que se combina con agua purificada mediante mezclado con cizalla para proveer una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de cremas para una administración tópica

Una formulación de cremas comprende el compuesto **1**, alcohol bencílico, alcohol cetílico, ácido cítrico anhidro, mono y diglicéridos, alcohol oleílico, propilenglicol, cetostearilsulfato de sodio, hidróxido de sodio, alcohol estearílico, triglicéridos y agua contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de cremas para una administración tópica

Una formulación de cremas comprende el compuesto **1**, alcohol cetostearílico, miristato de isopropilo, propilenglicol, cetomacrogol 1000, dimeticona 360, ácido cítrico, citrato de sodio y agua purificada, con imidurea, metilparabeno y propilparabeno como conservantes, contiene entre 0,05% y

5% en peso del agente activo.

Se ha demostrado que el compuesto **1** es un inhibidor potente de la familia JAK de enzimas: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2.

Enfermedades oftalmológicas

Se ha demostrado que muchas enfermedades oftalmológicas están asociadas con elevaciones de las citoquinas proinflamatorias que se basan en la vía JAK-STAT. Dado que el compuesto **1** presenta una inhibición potente de las cuatro enzimas JAK, se espera que inhiba potentemente la señalización y los efectos patógenos de numerosas citoquinas (tales como IL-6, IL-2 e IFN- γ), que envían señales a través de JAK, así como prevenga el aumento de otras citoquinas (tales como MCP-1 y IP-10), cuya producción está dirigida por la señalización de la vía JAK-STAT.

En particular, el compuesto **1** mostró valores de pIC₅₀ de 6,4 o más (valores de IC₅₀ de 400 nM o menos) para inhibir la señalización de IL-6, IL-2 e IFN γ en los ensayos celulares que se describen en los Ensayos 3 a 6, que incluyen ensayos que registran la inhibición de los efectos corriente abajo de una elevación de las citoquinas.

El estudio farmacocinético del Ensayo 7 demostró una exposición sostenida en ojos de conejo después de una sola inyección intravítrea y una concentración en plasma que es por lo menos tres órdenes de magnitud más baja que la observada en el tejido vítreo.

Además, la dosificación intravítrea del compuesto **1** ha demostrado una inhibición significativa de pSTAT3 inducida por IL-6 en el tejido retinal/coroide de rata, así como una inhibición significativa y sostenida de IP-10 inducida por IFN- γ en los tejidos vítreos así como retinales/coroides de conejo. La

dosificación intravítrea del compuesto **1** ha demostrado una inhibición significativa y sostenida de pSTAT1 inducida por IFN- γ en el conejo.

Se espera que la inhibición sostenida de JAK ocular en la ausencia de niveles sistémicos significativos darán como resultando una actividad anti-inflamatoria local potente en el ojo sin efectos adversos inducidos sistémicamente. Por consiguiente, se espera que el compuesto **1** sea beneficioso en numerosas enfermedades oftalmológicas que incluyen, pero en un sentido no taxativo, uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabética, enfermedad de ojo seco, degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena retinal y queratoconjuntivitis atópica.

En particular, la uveítis (Horai y Caspi, *J Interferon Cytokine Res*, **2011**, 31, 733-744), la retinopatía diabética (Abcouwer, *J Clin Cell Immunol*, **2013**, Suplemento 1, 1-12), el edema macular diabético (Sohn et al., *American Journal of Ophthalmology*, **2011**, 152, 686-694), la enfermedad de ojo seco (Stevenson et al, *Arch Ophthalmol*, **2012**, 130, 90-100), la oclusión de la vena retinal (Shchuko et al, *Indian Journal of Ophthalmology*, **2015**, 63(12), 905-911) y la degeneración macular relacionada con la edad (Knickelbein et al, *Int Ophthalmol Clin*, **2015**, 55(3), 63-78) se caracterizan por la elevación de determinadas citoquinas proinflamatorias que emiten señales a través de la vía JAK-STAT. Por lo tanto, el compuesto **1** puede aliviar la inflamación ocular asociada y el revertir el progreso de la enfermedad o proveer un alivio de los síntomas en estas enfermedades.

Entonces, en un aspecto, la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad oftalmológica en un mamífero, donde dicho método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende 1-(2-(6-

(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéutico, en el ojo del mamífero. En un aspecto, la enfermedad oftalmológica es uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabética, enfermedad de ojo seco, degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena retinal o queratoconjuntivitis atópica. En un aspecto, el método comprende administrar el compuesto **1** mediante inyección intravítrea.

Enfermedades inflamatorias de la piel

La dermatitis atópica se ha asociado, por ejemplo, con una elevación de las citoquinas proinflamatorias que se basan en la vía JAK-STAT, en particular, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN γ . Además de la inhibición de citoquinas en los ensayos celulares citados precedentemente, el compuesto **1** presentó un valor de IC₅₀ de 13 nM para la inhibición de IL-13, como se describe en el Ensayo 2. Aún más, las formulaciones modelo de cremas y ungüentos del compuesto **1** han demostrado niveles dérmicos sostenidos durante al menos 2 días en ratones y por lo menos 7 días en minicerdos sin una exposición detectable en plasma.

Se espera que los niveles dérmicos sostenidos del compuesto **1** en la ausencia de niveles sistémicos significativos darán como resultado una potente actividad anti-inflamatoria y anti-prurítica local en la piel sin efectos adversos inducidos sistémicamente. Por ello, se espera que el compuesto **1** sea beneficioso en numerosas condiciones dérmicas inflamatorias o pruríticas que incluyen, pero en un sentido no taxativo, alopecia areata, vitiligo, linfoma cutáneo de células T, prurigo nodular, liquen plano, amiloidosis cutánea

primaria localizada, penfigoide ampolloso, manifestaciones en la piel de la enfermedad de huésped versus injerto, penfigoide, lupus discoide, granuloma anular, liquen simple crónico, pruritus vulvar/escrotal/perianal, liquen escleroso, picazón por neuralgia post herpética, liquen planopilaris y foliculitis descalvante. En particular, la alopecia areata (Xing et al., *Nat Med.* **2014** Sep; 20(9): 1043-9), vitiligo (Craiglow et al, *JAMA Dermatol.*, **2015** Oct; 151(10): 1110-2), linfoma de células T cutáneo (Netchiporouk et al., *Cell Cycle.*, **2014**; 13(21): 3331-5), prurigo nodular (Sonkoly et al., *J Allergy Clin Immunol*, **2006** Feb; 117(2): 411-7), liquen plano (Welz-Kubiak et al., *J Immunol Res.*, **2015**; 2015: 854747), amiloidosis cutánea primaria localizada (Tanaka et al., *Br J Dermatol.*, **2009** Dic; 161(6): 1217-24), penfigoide ampolloso (Feliciani et al., *Int J Immunopathol Pharmacol.*, **1999** May-Ago; 12(2): 55-61) y manifestaciones en la piel de la enfermedad de huésped versus injerto (Okiyama et al., *J Invest Dermatol*, **2014** Abr; 134(4): 992-1000) se caracterizan por la elevación de determinadas citoquinas que emiten señales a través de la activación de JAK. Por lo tanto, el compuesto **1** puede aliviar la inflamación dérmica asociada o el prurito inducido por estas citoquinas. En particular, se espera que el compuesto **1** sea de utilidad para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias de la piel.

Entonces, en un aspecto, la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la piel en un mamífero (por ejemplo, un humano), donde dicho método comprende aplicar una composición farmacéutica que comprende 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo

farmacéutico, a la piel del mamífero. En un aspecto, la enfermedad inflamatoria de la piel es dermatitis atópica.

El compuesto **1** también se puede usar en combinación con antibióticos Gram-positivos, tales como mupirocina y ácido fusídico, para tratar las enfermedades inflamatorias de la piel. Por ello, en un aspecto la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la piel en un mamífero, donde dicho método comprende aplicar el compuesto **1** y un antibiótico Gram-positivo a la piel del mamífero. En otro aspecto, la invención provee una composición farmacéutica que comprende 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un antibiótico Gram-positivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Enfermedades respiratorias

Las citoquinas que emiten señales a través de la vía JAK-STAT, en particular IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), γ -interferón (IFN γ) y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) también se han implicado en la inflamación por asma y en otras enfermedades respiratorias inflamatorias. Según se describió precedentemente, se ha mostrado que el compuesto **1** es un potente inhibidor de las enzimas JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 y también ha demostrado una inhibición potente de las citoquinas proinflamatorias en los ensayos celulares.

Por ello, en un aspecto la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad respiratoria en un mamífero (por ejemplo, un humano), donde dicho método comprende administrar al mamífero 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-

hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En un aspecto, la enfermedad respiratoria es asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, neumonitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (CF), neumonitis, intersticial pulmón enfermedades (incluyendo fibrosis pulmonar idiopática), lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterante o sarcoidosis. En otro aspecto, la enfermedad respiratoria es asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica .

En un aspecto adicional, la enfermedad respiratoria es una infección pulmonar, una infección por helmintos, hipertensión arterial pulmonar, sarcoidosis, linfangioleiomiomatosis, bronquiectasia o una enfermedad pulmonar infiltrante. En aún otro aspecto, la enfermedad respiratoria es neumonitis inducida por fármacos, neumonitis inducida por hongos, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, granulomatosis eosinofílica con poliangitis, neumonía eosinofílica aguda idiopática, neumonía eosinofílica crónica idiopática, síndrome hipereosinofílico, síndrome de Löffler, bronquiolitis obliterante, neumonía organizada o neumonitis inducida por inhibidor de punto de control inmunológico.

La invención también provee un método de tratamiento de asma en un mamífero, donde dicho método comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede ser de utilidad para tratar enfermedades de pulmón eosinofílicas. La inflamación eosinofílica de las vías aéreas es un rasgo característico de enfermedades denominadas en su conjunto enfermedades de pulmón eosinofílicas (Cottin et al., *Clin. Chest. Med.*, **2016**, 37(3), 535-56). Las enfermedades eosinofílicas se han asociado con la señalización de IL-4, IL-13 e IL-5. Las enfermedades eosinofílicas de pulmón incluyen infecciones (en especial infecciones por helmintos), neumonitis inducida por fármacos (inducida por ejemplo por fármacos terapéuticos tales como antibióticos, fenitoína, o l-triptofano), neumonitis inducida por hongos (por ejemplo aspergilosis broncopulmonar alérgica), neumonitis por hipersensibilidad y granulomatosis eosinofílica con poliangitis (antes conocida como síndrome de Churg-Strauss). Las enfermedades eosinofílicas de pulmón de etiología desconocida incluyen neumonía eosinofílica aguda idiopática, neumonía eosinofílica crónica idiopática, síndrome hipereosinofílico y síndrome de Löffler.

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede ser de utilidad para tratar PAH. Se ha asociado un polimorfismo en el gen de IL-6 con niveles elevados de IL-6 y un mayor riesgo de desarrollar hipertensión arterial pulmonar (PAH) (Fang et al., *J Am Soc Hypertens.*, **2017**, 11(3), 171-177). Al corroborar el rol de la IL-6 en la PAH, la inhibición de la cadena del receptor de IL-6 gp130 alivió la enfermedad en el modelo de rata de PAH (Huang et al., *Can J Cardiol.*, **2016**, 32(11), 1356.e1-1356.e10).

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede ser de utilidad para tratar enfermedades pulmonares no alérgicas tal como sarcoidosis y linfangioleiomiomatosis. Las citoquinas, tales

como IFN γ , IL-12 e IL-6, se han relacionado con un rango de enfermedades pulmonares no alérgicas, tal como sarcoidosis, y lingangioleiomiomatosis (El-Hashemite et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2005**, 33, 227-230, y El-Hashemite et al., *Cancer Res.*, **2004**, 64, 3436-3443).

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede ser de utilidad para tratar la bronquiectasia y enfermedades pulmonares infiltrantes que son enfermedades asociadas con una inflamación neutrofílica crónica. Algunas citoquinas están asociadas con una inflamación neutrofílica (por ejemplo IL-6, IFN γ).

La activación patológica de células T es crítica en la etiología de múltiples enfermedades respiratorias. Las células T autorreactivas cumplen un rol en la bronquiolitis obliterante con neumonía organizada (también denominada COS). De manera similar a COS, la etiología de los rechazos de trasplantes de pulmón está ligada a la activación de células T aberrante de las células T del receptor por el pulmón donante trasplantado. Los rechazos de trasplante de pulmón se pueden producir tan temprano como una disfunción primaria de injerto (PGD), una neumonía organizada (OP), el rechazo agudo (AR) o una bronquiolitis linfocítica (LB) o se pueden producir años más tarde después del trasplante de pulmón como una disfunción de aloinjerto de pulmón agudo (CLAD). La CLAD era conocida previamente como una bronquiolitis obliterante (BO) pero ahora se considera como un síndrome que puede tener diferentes manifestaciones patológicas que incluyen BO, CLAD restrictiva (rCLAD o RAS) y disfunción neutrofílica de aloinjertos. La disfunción de aloinjerto de pulmón agudo (CLAD) es un desafío importante en el manejo a largo plazo de los receptores de trasplantes de pulmón ya que hace que un

pulmón trasplantado pierda progresivamente la funcionalidad (Gauthier y col., *Curr Transplant Rep.*, 2016, 3(3), 185-191). La CLAD responde pobremente al tratamiento y por lo tanto persiste la necesidad de compuestos eficaces con capacidad para prevenir o tratar esta condición. Hay varias citoquinas dependientes de JAK, tales como IFN γ e IL-5, que están sobreexpresadas en la CLAD y en el rechazo de trasplantes de pulmón (Berastegui et al, *Clin Transplant.*, **2017**, 31, e12898). Además, los niveles elevados en pulmón de quimoquinas de CXCR3, tales como CXCL9 y CXCL10, que se encuentran corriente abajo con respecto a la señalización de IFN dependiente de JAK, están ligados a resultados peores en los pacientes con trasplantes de pulmón (Shino et al, *PLOS One*, **2017**, 12 (7), e0180281). Se ha mostrado que la inhibición de JAK es eficaz en el rechazo de trasplante de riñón (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, **2012**, 12, 2446-56). Por ello, el compuesto **1** pueden ser potencialmente eficaces en el tratamiento o la prevención del rechazo de transplante de pulmón y CLAD. Los eventos de activación de células T similares a los descritos como la base del rechazo de trasplantes de pulmón también se consideran como impulsores principales de la enfermedad pulmonar de injerto versus huésped (GVHD) que se puede producir después de trasplantes de células madre hematopoyéticas. De manera similar a CLAD, la GVHD de pulmón es una condición progresiva crónica con resultados extremadamente pobres y actualmente no hay tratamientos aprobados. Un estudio de encuestas retrospectivo, multicéntrico, de 95 pacientes con GVHD aguda o crónica refractaria a esteroides que recibieron el inhibidor sistémico de JAK ruxolitinib como terapia de rescate demostró una respuesta completa o parcial a ruxolitinib en la mayoría de los

pacientes, inclusive aquellos con GVHD de pulmón (Zeiser et al, *Leukemia*, **2015**, 29, 10, 2062-68). Más recientemente, la neumonitis inducida por inhibidores del punto de control inmunológico, otra enfermedad pulmonar mediada por células T, surgió con el uso aumentado de inhibidores de puntos de control inmunológicos. En los pacientes con cáncer tratados con estos agentes estimulantes de células T, se puede desarrollar una neumonitis fatal. El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede ofrecer potencialmente un nuevo tratamiento para estas enfermedades respiratorias severas no atendidas.

Enfermedades gastrointestinales

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede ser de utilidad como un inhibidor de JAK en una variedad de enfermedades adicionales. .. Dado que muchas citoquinas proinflamatorias envían señales a través de la activación de JAK, el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden aliviar la inflamación y proporcionar un alivio de los síntomas. *Otras enfermedades*

El compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede ser de utilidad para tratar otras enfermedades tales como otras enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes o cánceres.

Terapia combinada

Las clases de agentes que son de utilidad para una terapia combinada incluyen, pero en un sentido no taxativo, un inhibidor de calicreína plasmático esteroide antiangiogénico, un antiinflamatorio, un inhibidor del ligando del factor de crecimiento placentario, un inhibidor del ligando de VEGF-A, un inhibidor del ligando-2 de angiopoyetina, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa beta,

un estimulador del receptor de la tirosina quinasa Tek, un inhibidor de calcineurina, un inhibidor del ligando de VEGF, un inhibidor del complejo 1 de mTOR, un inhibidor de mTOR, un antagonista de IL-17, un modulador de calmodulina, un antagonista del receptor de FGF, un antagonista del receptor de PDGF, un antagonista del receptor de VEGF, un inhibidor del ligando de TNF alfa, un agente de unión a TNF, un estimulante de proteoglicano 4, un inhibidor del ligando de VEGF-C, un inhibidor del ligando de VEGF-D, un antagonista de CD126, un inhibidor de la cascada del complemento, un agonista de glucocorticoides, un inhibidor del factor C5 del complemento, un antagonista del receptor de cannabinoides, un modulador del receptor-1 de esfingosina-1-fosfato, un modulador del receptor-3 de esfingosina-1-fosfato, un modulador del receptor-4 de esfingosina-1-fosfato, un modulador del receptor-5 de esfingosina-1-fosfato, un inhibidor de acetaldehído deshidrogenasa, un inhibidor de tirosina quinasa Flt3, un inhibidor de la tirosina quinasa Kit, un inhibidor de la proteína quinasa C, un ligando de la hormona adrenocorticotrófica, un inhibidor del ligando del factor 1 derivado de células del estroma, un agonista de la inmunoglobulina G1; un inhibidor del ligando de la interleuquina-1 beta, un estimulador de mucina; un modulador del factor nuclear kappa B, un estimulador de la proteína-4 de linfocitos T citotóxicos, un inhibidor de la glicoproteína de la superficie de células T CD28, un estimulador de la lipoproteína lipasa; un agonista de PPAR alfa, un agonista del receptor de adenosina A3, un antagonista del receptor de angiotensina II, un antagonista del receptor de VEGF, un ligando de interferón beta, un modulador de SMAD-2; un inhibidor del ligando TGF beta 1, un agonista del receptor de somatostatina, un inhibidor de la subunidad alfa del receptor de IL-2, un inhibidor del ligando

de VEGF-B, un ligando de timosina beta 4, un antagonista del receptor de angiotensina II AT-1, un antagonista de la quimoquina CCR2, un inhibidor de amina oxidasa de cobre de membrana, un antagonista de CD11a, un inhibidor de ICAM-1, un antagonista del factor de crecimiento 1 tipo insulina, un inhibidor de calicreína, un estimulador de la fucosiltransferasa 6, un modulador de la GDP fucosa sintetasa, un inhibidor del gen de GHR, un inhibidor del gen de IGF1, un antagonista del receptor de VEGF-1, un agonista de albúmina, un antagonista de IL-2, un antagonista de CSF-1; un antagonista del receptor de PDGF, un antagonista del receptor de VEGF-2, un inhibidor de mTOR, un agonista de PPAR alfa, un inhibidor de Rho GTPasa, un inhibidor de la proteína quinasa asociada a Rho, un inhibidor de C3 del complemento, un inhibidor del factor de transcripción de EGR-1, un modulador del factor nuclear relacionado con el eritroide 2, un inhibidor del factor nuclear kappa B, un antagonista de la integrina alfa-V/beta-3, un agonista del receptor de eritropoyetina, un agonista del péptido 1 de glucagón, un estimulador del gen de TNFRSF1A, un inhibidor del ligando-2 de angiopoyetina, un inhibidor de alfa-2 antiplasmina, un antagonista de colágeno, un inhibidor de fibronectina, un antagonista de laminina, un estimulador de plasmina, un ligando del factor de crecimiento nervioso, un antagonista del receptor de FGF1, un antagonista del receptor de FGF3, un inhibidor de la tirosina quinasa itk, un inhibidor de la tirosina quinasa Lck, un inhibidor del receptor de la tirosina quinasa Ltk, un antagonista del receptor alfa del PDGF, un antagonista del receptor beta del PDGF, un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, un antagonista del receptor de VEGF-3, un inhibidor de la amina oxidasa de cobre de membrana, un agonista del receptor de somatostatina 2, un agonista del receptor de somatostatina 4, un

agonista del receptor de somatostatina 5, un inhibidor de la proteína quinasa C alfa, un inhibidor de la proteína quinasa C beta, un inhibidor de la proteína quinasa C delta, un inhibidor de la proteína quinasa C épsilon, un inhibidor de la proteína quinasa C theta, un modulador de anquirina, un estimulador de mucina, un agonista del purinoceptor P2Y2, un inhibidor de la proteína alfa-1 de la unión estrecha, un antagonista de la quimoquina CCR3; un inhibidor del ligando de eotaxina, un inhibidor del canal de sodio sensible a amilorida, un antagonista del receptor de PDGF, un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, un inhibidor de la proteína del epitelio del pigmento retiniano, un inhibidor de una metaloproteasa de la matriz, un antagonista del receptor de PDGF, un antagonista del receptor beta de PDGF, un inhibidor del ligando de PDGF-B, un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento, un inhibidor de moléculas de adhesión celular, un modulador de integrina, un antagonista de la quimoquina CXCR4, un inhibidor de una proteína que contiene un dominio de bucle enrollado, un modulador de Hsp 90, un inhibidor de una proteína quinasa asociada a Rho, un inhibidor del gen de VEGF, un inhibidor de endogлина, un antagonista de la quimoquina CCR3, un modulador del canal de potasio maxi K, un estimulador del canal de potasio maxi K, un agonista de PGF2 alfa, un agonista del receptor prostanoide, un modulador del canal de cloruro 2 regulado por voltaje, un antagonista del receptor de C5a del complemento, un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa, un inhibidor del ligando de interleuquina 18, un estimulador del canal de cationes M8 TRP, un agonista del receptor de CNTF, un inhibidor del gen de TRPV1, un estimulador de la desoxirribonucleasa I, un inhibidor del gen de IRS1, un inhibidor de una proteína quinasa asociada a Rho, un inhibidor de la poli ADP ribosa polimerasa

1, un inhibidor de la poli ADP ribosa polimerasa 2, un inhibidor de la poli ADP ribosa polimerasa 3, un agonista VR1 vanilloide, un estimulador del gen de NFAT5, un estimulador de mucina, un inhibidor de la Syk tirosina quinasa, un agonista del adrenoceptor alfa 2, un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de la deposición de la proteína amiloide, un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa-3, un estimulador de PARP, un inhibidor de la deposición tau, un inhibidor del gen DDIT4, un modulador de la síntesis de hemoglobina, un inhibidor del ligando de interleuquina-1 beta, un antagonista de TNF, un estimulador del canal de potasio regulado por voltaje KCNQ, un antagonista del receptor de NMDA, un inhibidor de ciclooxigenasa 1, un inhibidor de ciclooxigenasa, un agonista del receptor 5-HT 1a, un inhibidor de canales de calcio, un modulador del ligando FGF-2, un inhibidor de la fosfoinositida 3-quinasa, un antagonista de CD44, un modulador de hialuronidasa, un agonista de ácido hialurónico, un antagonista de IL-1, un antagonista del receptor de IL-1 tipo I, un inhibidor del factor P del complemento, un antagonista de tubulina, un antagonista de beta amiloide, un estimulador del gen de IL2, un inhibidor de la I-kappa B quinasa beta, un modulador del factor nuclear kappa B, un inhibidor del inhibidor 1 del activador de plasminógeno, un ligando de FGF-2, un modulador de proteasa y un modulador de corticotropina.

Los agentes específicos que se pueden usar en combinación con el compuesto inhibidor de JAK de la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, lanadelumab, aflibercept, RG-7716, AKB-9778, ciclosporina, bevacizumab, everolimus, secukinumab, fluocinolona acetónida, RP-101, lactato de escualamina, lubricina humana recombinante, OPT-302, sarilumab, dexametasona, eculizumab, fingolimod, adalimumab, reproxalap, midostaurina,

corticotropina, olaptosed pegol, canakinumab, recoflavona, abatacept, fenofibrato, piclidenosona, OpRegen, candesartán, golimumab, pegaptanib, interferón-beta, disitertida, acetato de octreotida, anecortave, basiliximab, triamcinolona acetona supracoroidal, RGN-259, difluprednato, HL-036, avacincaptad pegol de sodio, irbesartán, propagermanio, triamcinolona acetona, azitromicina, BI-1467335, lifitegrast, loteprednol etabonato, teprotumumab, KVD-001, TZ-101, atesidorseno, Nov-03, bevacizumab , AVA-101, RU-101, voclosporina, vorolanib, sirolimus, fenofibrato de colina, VX-210, APL-2, CPC-551, elamipretida, SF-0166, cibinetida, elamipretida, liraglutida, EYS-606, nesvacumab, aflibercept, ocriplasmina, filgotinib, cenegermina, adipocell, brolucizumab, ranibizumab, aflibercept, terapia fotodinámica con padeliporfina, pazopanib, ASP-8232, veldoreotida, sotrastaurina, abicipar pegol, dicuafosol tetrasódico, HCB-1019, conbercept, bertilimumab, SHP-659, THR-317, ALK-001, PAN-90806, interferón alfa-2b, fluocinolona, malato de sunitinib, emixustat, hl-con1, TB-403, minociclina, células MA09-hRPE, pegpleranib de sodio, pegvisomant, luminato, burixafor, H-1129, carotuximab, AXP-1275, ranibizumab, unoprostona de isopropilo, tesidolumab, micofenolato de sodio con recubrimiento entérico, tadekinig alfa, triamcinolona acetona, ciclosporina, ST-266, AVX-012, NT-501-ECT, tivanisirán, verteporfina, dornasa alfa, aganirseno, ripasudilo, fosfato de rucaparib, zucapsaicina, tetratiomolibdato, diclofenac, LHA-510, AGN-195263, tacrolimus, rebamipida, R-348, tartrato de brimonidina, vizomitina, T-89, LME-636, BI-1026706, rimexolona, tobramicina, TOP-1630, talaporfina, bromfenac de sodio, triamcinolona acetona, davunetida, loteprednol etabonato, XED-60, EG-Mirotina, APD-209, adenovir, PF-04523655, hidroxycarbamida, navamepent,

retinalamina, CNTO-2476, ranibizumab, flupirtina, B27PD, S-646240, GLY-230, hidralazina, nepafenac, DexNP, trehalosa, ácido hialurónico, dexametasona-Ca depot de de liberación sostenida, naluzotán, hialuronidasa, hialuronato de sodio, isunaquinra, somatostatina, CLG-561, OC-10X, UCA-002, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante, pemirolast, VM-100, MB-11316, alfa luminol monosódico, ranibizumab, IMD-1041, LMG-324, HE-10, cinhialuronato de sodio, BDM-E, células mesenquimáticas precursoras, disulfiram, CTC-96, PG-101, Beifushu, quimiotripsina.

En la presente, también se provee una composición farmacéutica que comprende el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes terapéuticos adicionales. El agente terapéutico se puede seleccionar entre las clases de agentes especificados antes y del listado de agentes específicos que se describió antes. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es adecuada para una administración oftalmológica. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es una composición líquida o en suspensión.

Además, en un aspecto del método, la invención provee un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un mamífero que comprende administrar al mamífero el compuesto **1**, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Cuando se usan en una terapia combinada, los agentes se pueden formular en una composición farmacéutica individual, o bien los agentes se pueden proveer en composiciones separadas que se administran en forma simultánea o en momentos separados, por la misma ruta de administración o por diferentes rutas. Dichas composiciones se pueden envasar por separado o

se pueden envasar juntas como un kit. Dichos dos o más agentes terapéuticos en el kit se pueden administrar por la misma ruta de administración o por rutas de administración diferentes.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos de síntesis y biológicos se ofrecen para ilustrar la invención, y no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la misma. En los ejemplos que siguen, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados, a menos que se indique de otra manera. Las abreviaturas que no se definen a continuación tienen sus significados normalmente aceptados.

ACN = acetonitrilo

DCC = diciclohexilcarbodiimida

DIPEA = *N,N*-diisopropiletilamina

DMAc = dimetilacetamida

DMF = *N,N*-dimetilformamida

DMSO = sulfóxido de dimetilo

EtOAc = acetato de etilo

HATU = hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio

LDA = diisopropilamida de litio

min = minuto(s)

MTBE = éter metílico ter-butílico

NBS = *N*-bromosuccinimida

NMP = *N*-Metil-2-pirrolidona

RT = temperatura ambiente

THF = tetrahidrofurano

bis(pinacolato)diboro = 4,4,5,5,4',4',5',5'-octametil-
[2,2']bi[[1,3,2]dioxaborolanilo]

$\text{Pd(dppf)Cl}_2\text{-CH}_2\text{Cl}_2$ = complejo dicloro(1,1'-bis(difenilfosfino)-ferroceno)-
dipaladio(II) con diclorometano

Los reactivos y solventes se adquirieron de proveedores comerciales (Aldrich, Fluka, Sigma, etc.), y se usaron sin ninguna purificación adicional. El progreso de las mezclas de reacción se monitoreó mediante cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alta presión analítica (HPLC analítica) y espectrometría de masas. Las mezclas de reacción se purificaron como se describe específicamente en cada reacción; normalmente las mismas se purificaron por extracción y otros métodos de purificación tales como cristalización dependiente de la temperatura y del solvente, y precipitación. Además, las mezclas de reacción se purificaron en forma rutinaria por cromatografía en columna o por HPLC preparativa, típicamente usando empaquetamientos de columna C18 o BDS y eluyentes convencionales. Las condiciones típicas de HPLC preparativa se describen más adelante.

La caracterización de los productos de reacción rutinariamente se llevó a cabo por espectrometría de masas y ^1H -RMN. Para el análisis por RMN, se disolvieron las muestras en solvente deuterado (tal como CD_3OD , CDCl_3 , o d_6 -DMSO), y los espectros de ^1H -RMN se adquirieron con un instrumento Varian Gemini 2000 (400 MHz) bajo condiciones de observación estándares. La identificación por espectrometría de masas de los compuestos se llevó a cabo mediante un método de ionización por electroatomización (ESMS) con un instrumento Applied Biosystems (Foster City, CA) modelo API 150 EX o un

instrumento Waters (Milford, MA) 3100, acoplados a sistemas de autopurificación.

Condiciones de HPLC preparativa

Columna: C18,5 μm . 21,2 x 150 mm o C18, 5 μm 21 x 250 o C14,5 μm 21 x 150 mm

Temperatura de columna: Temperatura ambiente

Velocidad de flujo: 20,0 ml/min

Fases móviles: A = Agua + 0,05 % de TFA

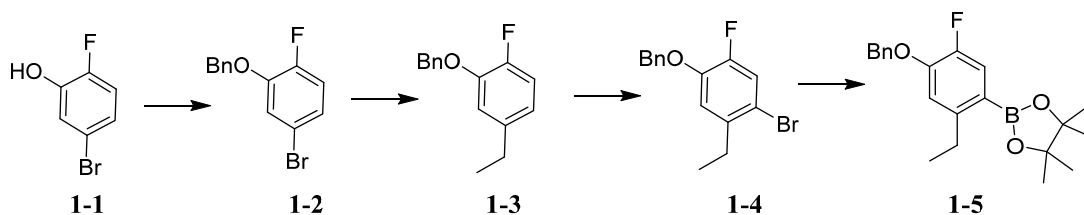
B = ACN + 0,05 % de TFA,

Volumen de inyección: (100-1500 μl)

Longitud de onda del detector: 214 nm

Los compuestos crudos se disolvieron en 1:1 de agua:ácido acético a aproximadamente 50 mg/ml. Se llevó a cabo una corrida de prueba a escala analítica de 4 minutos usando una columna C18 de 2,1 x 50 mm seguida por una corrida a escala preparativa de 15 ó 20 minutos usando 100 μl de inyección con el gradiente en base al % de retención de B de la corrida de prueba a escala analítica. Los gradientes exactos dependieron de la muestra. Las muestras con impurezas que corrían cercanas se verificaron con una columna de C18 de 21 x 250 mm y/o una columna C14 de 21 x 150 mm para una mejor separación. Las fracciones que contienen el producto deseado se identificaron mediante análisis por espectroscopía de masas.

Preparación 1:2-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (1-5)



(a) 2-(benciloxi)-4-bromo-1-fluorobenceno (**1-2**)

Se llevaron a cabo dos reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. Una mezcla de 5-bromo-2-fluorofenol (**1-1**) (850 g, 4,5 mol), bromuro de bencilo (837 g, 4,9 mol) y carbonato de potasio (923 g, 6,7 mol) en ACN (5 l) se agitó a 20 °C por 12 h. Las reacciones se combinaron y se concentraron, se diluyeron con agua (8 l), y se extrajeron con EtOAc (3 x 3 l). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (3 l), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se purificó a través de una almohadilla de gel de sílice (eluída con éter de petróleo:EtOAc 3:1) para dar el intermediario del título (1,83 kg, 73% de rendimiento) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,38-7,46 (m, 5H), 7,15 (dd, $J = 7,6, 2,0$ Hz, 1H), 6,98-7,15 (m, 1H), 5,12 (s, 2H).

(b) 2-(benciloxi)-4-etil-1-fluorobenceno (**1-3**)

Se llevaron a cabo seis reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una solución del producto del paso previo (200 g, 711 mmol) en THF (100 ml) se agregó carbonato de potasio (197 g, 1,4 mol). La mezcla de la reacción se purgó 3 veces con nitrógeno, seguido por la adición de $\text{Pd(dppf)Cl}_2\text{-CH}_2\text{Cl}_2$ (11,6 g, 14,2 mmol). La mezcla de la reacción se enfrió a 0 °C, se agregó dietilzinc por goteo (1 M, 1,07 l), y la mezcla de la reacción se agitó a 70 °C por 1 h. Las reacciones se combinaron, se enfriaron a 20 °C y se vertieron en agua (7 l) lentamente. A la mezcla se agregó HCl acuoso 4 M a pH 6. La capa orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 2 l).

La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (5 l), se secó sobre sulfato de sodio, se concentró y se purificó a través de una almohadilla de gel de sílice (eluído con éter de petróleo:EtOAc 50:1)) para dar el intermediario del título (900 g, 92% de rendimiento) como un aceite amarillo claro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,29-7,43 (m, 5H), 6,94-6,97 (m, 1H), 6,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,70 (m, 1H), 5,09 (s, 2H), 2,52-2,58 (m, 2H), 1,17 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

(c) 1-(benciloxi)-4-bromo-5-etil-2-fluorobenceno (**1-4**)

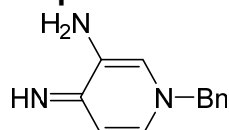
Se llevaron a cabo cuatro reacciones en paralelo y se combinaron. A una solución de 2-(benciloxi)-4-etil-1-fluorobenceno (**1-3**) (293 g, 1,3 mol) en ACN (1 l) se agregó NBS (249 g, 1,4 mol) en porciones a 20 °C. La mezcla de la reacción se agitó a 20 °C por 2 h. La mezcla de las reacciones se combinaron y se concentraron. El residuo se diluyó con agua (5 l) y se extrajo con EtOAc (2 x 5 l). La fase orgánica se lavó con salmuera (4 l), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluído con éter de petróleo:EtOAc 100:1-10:1) para dar el intermediario del título (1,4 kg, 89% de rendimiento) como un aceite amarillo claro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,29-7,38 (m, 5H), 7,2 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 6,8 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,06 (s, 2H), 2,6 (q, $J = 7,6$ Hz, 2 H), 1,1 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

(d) 2-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (**1-5**)

Se llevaron a cabo siete reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una solución del producto del paso previo (200 g, 647 mmol) en dioxano (2 l) se agregó acetato de potasio (190 g, 1,9 mol), bis(pinacolato)diboro (181 g, 712 mmol) y $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10,6 g, 12,9

mmol) bajo nitrógeno a 20 °C. La mezcla se agitó a 120 °C por 2 h. Las mezclas de reacción se combinaron, se concentraron, se diluyeron con agua (5 l), y se extrajeron con EtOAc (3 x 4 l). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluído con éter de petróleo:EtOAc 1:0 - 5:1) para dar el compuesto del título (1,35 kg, 84% de rendimiento) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33-7,51 (m, 6H), 6,82 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 2,85 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,33 (s, 12H), 1,15 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).

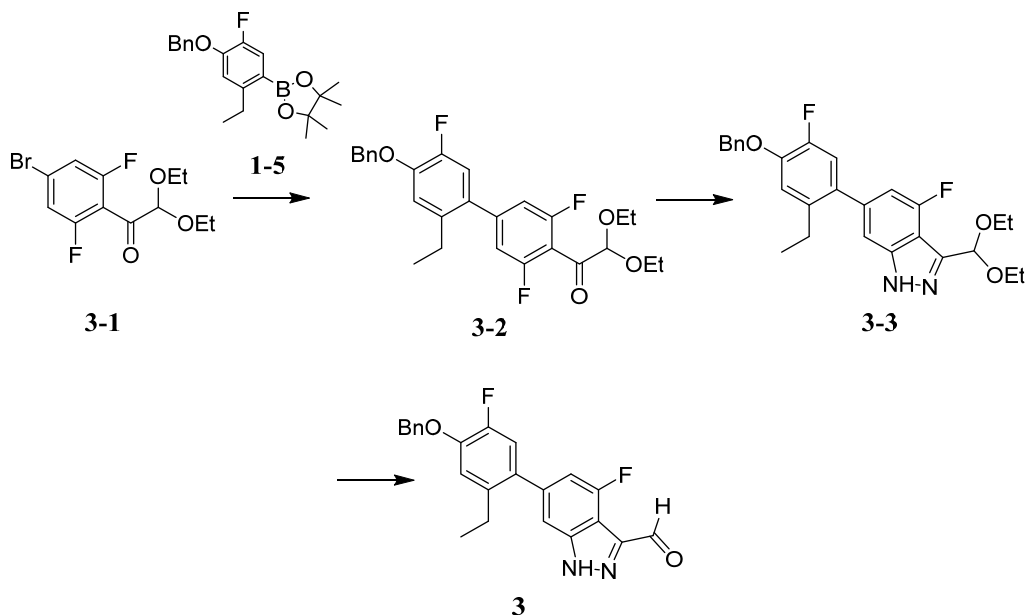
Preparación 2:1-bencil-4-imino-1,4-dihidropiridin-3-amina (2)



2

A una solución de piridin-3,4-diamina (400 g, 3,67 mol) en ACN (3 l) se agregó bromuro de bencilo (596 g, 3,49 mol) en porciones a 0 °C y la mezcla de la reacción se agitó por 30 min y luego a 20 °C por 12 h, y se filtró. La torta de filtrado se lavó con ACN (500 ml) y se secó para dar la sal HBr del compuesto del título (600 g, 2,14 mol, 58% de rendimiento) como un polvo blanco. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,83 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,32-7,40 (m, 5H), 6,76 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,28 (s, 2H).

Preparación 3:6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-fluoro-1H-indazol-3-carbaldehído (3)



(a) 1-(4-Bromo-2,6-difluorofenil)-2,2-dietoxietan-1-ona (**3-1**)

Se llevaron a cabo nueve reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. Una solución de 1-bromo-3,5-difluorobenceno (100 g, 518 mmol) en THF (700 ml) se desgasificó y se purgó tres veces con nitrógeno. Luego, se agregó LDA 2 M (311 ml) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la mezcla de la reacción se agitó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 0,5 h bajo nitrógeno. Se agregó por goteo una solución de 2,2-dietoxiacetato de etilo (96 g, 544 mmol) en THF (200 ml) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo nitrógeno y la mezcla de la reacción se agitó por 1 h. Las reacciones se combinaron y se vertieron en cloruro de amonio saturado helado (10 l) en porciones y se extrajo con EtOAc (3 x 3 l). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (5 l), se secó sobre sulfato de sodio, se concentró, y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluído con éter de petróleo EtOAc 1:0 - 100:1) para dar el compuesto del título (1,26 kg, 84% de rendimiento) como un aceite amarillo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,12 (d, $J = 7,2\text{ Hz}$, 2H), 5,15 (s, 1H), 3,61-3,7 (m, 4H), 1,2 (t, $J = 7,2\text{ Hz}$, 6H).

(b) 1-(4'-(benciloxi)-2'-etil-3,5,5'-trifluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2,2-

dietoxietan-1-ona (**3-2**)

Se llevaron a cabo cinco reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una mezcla de 1-(4-bromo-2,6-difluorofenil)-2,2-dietoxietan-1-ona (**3-1**) (189 g, 586 mmol) en etanol (150 ml) y tolueno (1,5 l) se agregó agua (150 ml), carbonato de sodio (84,8 g, 800 mmol) y 2-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (**1-5**) (190 g, 533 mmol) a 20 °C. La suspensión se desgasificó bajo vacío y se purgó con nitrógeno varias veces. Se agregó Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ (13 g, 16 mmol) y la mezcla de la reacción se purgó con nitrógeno varias veces y se agitó a 120 °C por 2 h. Las reacciones se combinaron, se enfriaron a 20 °C, se vertieron en agua (5 l) y se extrajeron con EtOAc (3 x 4 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 l), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, se concentraron, y se purificaron mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluído con éter de petróleo:EtOAc 100:1 - 5:1) para dar el intermediario del título (880 g, 70% de rendimiento) como un aceite amarillo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36-7,48 (m, 5H), 6,94-6,96 (m, 2H), 6,86-6,92 (m, 2H), 5,29 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 3,67-3,77 (m, 4H), 2,52 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,25 (t, *J* = 6,8 Hz, 6H), 1,07 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

(c) 6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-3-(dietoximetil)-4-fluoro-1*H*-indazol (**3-3**)

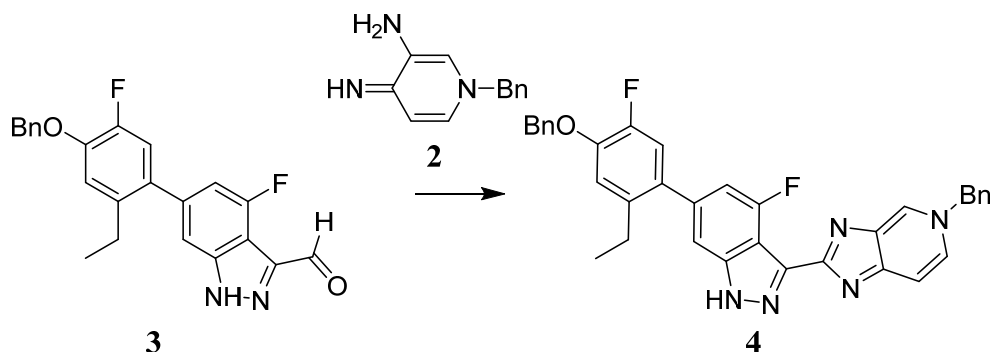
Se llevaron a cabo cuatro reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una solución del producto del paso previo (220 g, 466 mmol) en THF (2 l) se agregó monohidrato de hidrazina (47,6 g, 931 mmol) a 20 °C. La mezcla de la reacción se agitó a 100 °C por 12 h. Se combinaron cuatro reacciones y se enfriaron a 20 °C y se concentraron. El residuo se disolvió en

EtOAc (5 l) y se lavó con HCl 0,1 M (2 x 1,5 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,5 l), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para dar el intermediario del título (900 g, crudo) como una goma amarilla, que se usó directamente en el siguiente paso. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,36-7,48 (m, 5H), 6,94-6,96 (m, 2H), 6,86-6,92 (m, 2H), 5,29 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 3,67-3,77 (m, 4H), 2,52 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,25 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H), 1,07 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

(d) 6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-carbaldehído (**3**)

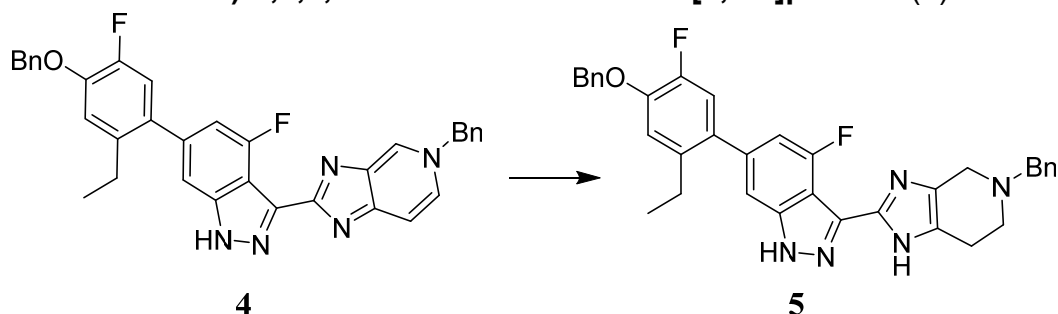
Se llevaron a cabo tres reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una solución del producto del paso previo (300 g, 643 mmol) en acetona (1,5 l) se agregó por goteo HCl 4 M (16 ml) a 20 °C y la mezcla de la reacción se agitó a 20 °C por 0,17 h. Las reacciones se combinaron, se concentraron, se diluyeron con MTBE (1l) y se filtraron. La torta de filtrado se lavó con MTBE (2 x 300 ml) y se secó bajo presión reducida para dar el intermediario del título (705 g, crudo) como un sólido amarillo, que se usó directamente en el siguiente paso. (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$ 393,13 encontrado 393,1. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 14,51 (s, 1H), 10,17 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,40-7,42 (m, 4H), 7,24 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 7,06 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,25 (s, 2H), 2,52-2,53 (m, 2H), 1,03 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

Preparación 4: 5-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridina (4**)**



Se llevaron a cabo cuatro reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una solución de 6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-carbaldehído (**3**), el producto de la Preparación 3 (172 g, 440 mmol) en DMF (1,1 l) se agregó bisulfito de sodio (68,6 g, 659 mmol) y 1-bencil-4-imino-1,4-dihidropiridin-3-amina (**2**) (136 g, 484 mmol) a 20 °C y la mezcla de la reacción se agitó a 150 °C por 2 h. Se combinaron cuatro reacciones y la mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se vertió en agua (10 l) y se filtró. La torta de filtrado se secó bajo presión reducida para dar el intermediario del título (990 g, crudo) como un sólido amarillo, que se usó directamente sin purificación. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₅H₂₇F₂N₅O 572,2 encontrado 572,3.

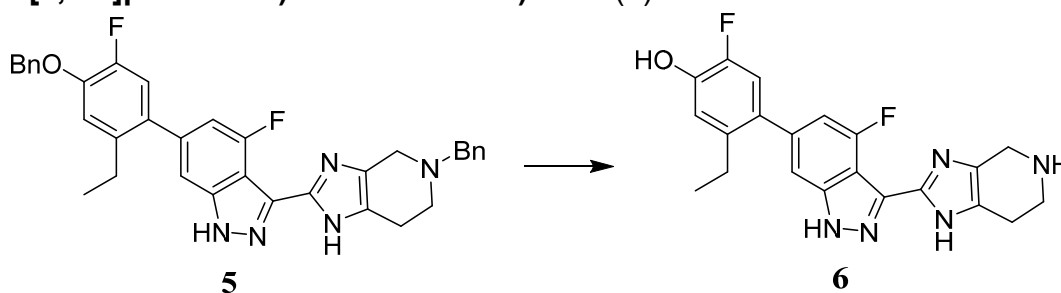
Preparación 5: 5-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridina (5**)**



Se llevaron a cabo tres reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una mezcla de 5-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-

fluoro-1*H*-indazol-3-il)-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridina (**4**), el producto de la Preparación 4 (330 g, 577 mmol) en metanol (1,5 l) y THF (1 l) se agregó borohidruro de sodio (267 g, 6,9 mol) en porciones a 20 °C y la mezcla de la reacción se agitó a 20 °C por 24 h. Se combinaron tres reacciones y la mezcla de la reacción se agregó a agua (10 l), se agitó por 10 min y se filtró. El material filtrado se extrajo con EtOAc (2 x 5 l) y la fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo vacío. El producto crudo se diluyó con EtOAc (2 l), se agitó por 30 min y se filtró. La torta de filtrado se lavó con MTBE (3 x 200 ml) para dar el intermediario del título (275 g, 28% de rendimiento) como un sólido amarillo claro. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₅H₃₁F₂N₅O 576,25 encontrado 576,3. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,50-7,52 (m, 2H), 7,35-7,43 (m, 7H), 7,23-7,25 (m, 3H), 7,15 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 6,81 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,25 (s, 2H), 3,72 (s, 2H), 3,43 (br. s, 2H), 2,78 (br. s, 2H), 2,66 (br. s, 2H), 2,55 (q, 2H), 1,04 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).

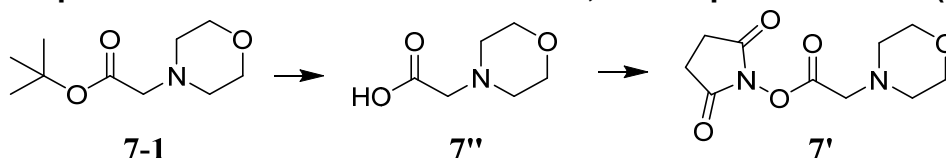
Preparación 6: 5-etil-2-fluoro-4-(4-fluoro-3-(4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-2-il)-1*H*-indazol-6-il)fenol (6**)**



Se llevaron a cabo cinco reacciones en paralelo y se combinaron para el tratamiento. A una mezcla de 5-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridina (**5**), el producto de la Preparación 5 (55 g, 95,5 mmol) en THF (500 ml) y metanol (500 ml) se agregó paladio sobre carbono (15 g, 9,6 mmol) y HCl ac. 12 M (10 ml).

La suspensión se desgasificó bajo vacío, se purgó con hidrógeno varias veces y se agitó bajo hidrógeno (50 psi) a 50 °C por 12 h. Las reacciones se combinaron y la mezcla de la reacción se filtró. El material filtrado se concentró bajo vacío para dar la sal de HCl del intermediario del título (150 g, crudo) como un sólido blanco opaco. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{21}H_{19}F_2N_5O$ 396,16 encontrado 396,2. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,43 (s, 1H), 7,07 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,57 (s, 2H), 3,74 (s, 2H), 3,24 (s, 2H), 2,55 (q, J = 7,6 Hz, 2H), 1,08 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

Preparación 7: 2-morfolinacetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (7')



(a) 2-morfolinacetato de *ter*-butilo (7-1)

A una mezcla de morfolina (160 g, 1,84 mol) y carbonato de potasio (381 g, 2,76 mol) en THF (3 l) se agregó lentamente 2-bromoacetato de *ter*-butilo (341 g, 1,75 mol) a 0 °C. La mezcla de la reacción se agitó por 30 min y luego a 20 °C por 12 h, y se concentró. Se agregó agua (1,5 l) y la mezcla de la reacción se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (500 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para dar el intermediario del título (300 g, 81% de rendimiento) como un aceite amarillo. ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,74 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,10 (s, 2H), 2,57 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 1,46 (s, 9H).

(b) Ácido 2-morfolinacético (7'')

Una mezcla del producto del paso previo (7-1) (300 g, 1,49 mol) en HCl 3 M en dioxano (2,0 l) se agitó a 20 °C por 12 h y se concentró para dar la sal de HCl del compuesto del título (270 g, 99% de rendimiento) como un sólido

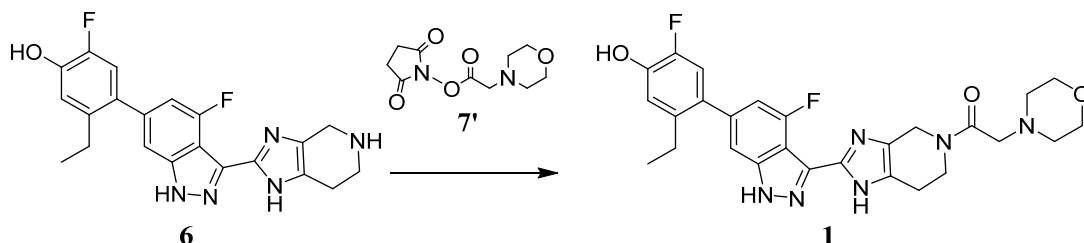
pálido, que se usó directamente en el siguiente paso ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 4,13 (s, 2H), 3,93 (br. s, 4H), 3,64 (br. s, 4H).

(c) 2-morfolinacetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**7'**)

Una mezcla del producto del paso previo (150 g, 826 mmol), 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (95 g, 826 mmol), DCC (256 g, 1,24 mol) y DIPEA (160 g, 1,24 mol) en DCM (2 l) se agitó a 15 °C por 12 h y se filtró. El material filtrado se concentró y se lavó con EtOAc (800 ml). El sólido se recolectó mediante filtración y se concentró para dar el compuesto del título (150 g, 75% de rendimiento) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,68 (s, 2H), 3,58 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 2,82 (s, 4H), 2,57 (t, J = 5,2 Hz, 4H).

Ejemplo 1:1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1H-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona

(1)



Una mezcla de 5-etil-2-fluoro-4-(4-fluoro-3-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-2-il)-1H-indazol-6-il)fenol (**6**), 2 HCl (100 g, 214 mmol), 2-morfolinacetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**7'**) (67,2 g, 278 mmol), y DIPEA (69 g, 534 mmol) en DMF (600 ml) se agitó a 15 °C por 12 h y se filtró. La solución se purificó mediante cromatografía de fase reversa (instrumento Agela FLEXATMFS-1L; 2 kg de columna Agela C18 DAC; 200 g de muestra disuelta en DMF (900 ml); velocidad de flujo 300 ml/min; solvente A agua, solvente B ACN; gradiente (% de B, tiempo (min): 0/15, 0-40/45, 40/50) para dar el

compuesto del título (50,0 g, 44,8% de rendimiento) como un sólido amarillo claro. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{27}H_{28}F_2N_6O_3$ 523,22 encontrado 523,0. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,22 (s, 1H), 6,80-6,96 (m, 3H), 4,68-4,78 (m, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,65-3,95 (m, 4H), 3,35-3,38 (m, 2H), 2,77-2,92 (m, 2H), 2,52-2,56 (m, 6H), 1,06 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

Ejemplo 2: 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1H-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-onacristalina (1), Forma 1

A un recipiente de 250 ml se agregó 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1H-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (**1**), el producto del Ejemplo 1 (5 g) y etanol (50 ml) y la mezcla de la reacción se agitó a 50-80 °C por 10 min y luego se agregó lentamente ACN (75 ml) a 50-80 °C seguido por semillas del Ejemplo 3. La mezcla de la reacción se agitó a 20-25 °C por 18 h. El sólido resultante se recolectó mediante filtración y se secó a 50 °C bajo vacío por 18 h para dar el compuesto del título, Forma 1 (3,6 g, 72 % de rendimiento)

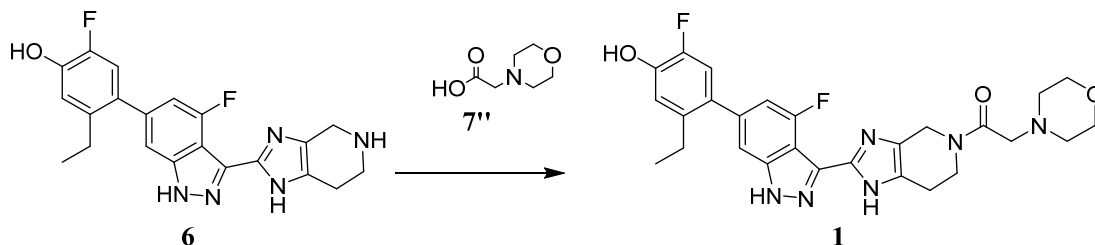
Ejemplo 3: 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1H-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-onacristalina (1), Forma 1

Se agregó el Compuesto **1**, producto del Ejemplo 1, (1 g) a etanol (10 ml) y se calentó hasta su disolución. Se agregó acetonitrilo (10 ml) y la mezcla de la reacción se agitó y se calentó y luego se agitó a temperatura ambiente por 16 h, se filtró y se secó a 50 °C bajo vacío por 18 h para dar el compuesto del título, Forma 1 (0,23 g).

Ejemplo 4: 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1H-indazol-

3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona

(1)



Se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0,298 ml, 1,707 mmol) a una solución de 5-etil-2-fluoro-4-(4-fluoro-3-(4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-imidazo[4,5-c]piridin-2-il)-1*H*-indazol-6-il)fenol (135 mg, 0,341 mmol) (**6**), HATU (156 mg, 0,410 mmol) y ácido 2-morfolinacético (**7''**) (54,5 mg, 0,376 mmol) en DMF (0,5 ml) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Se agregó hidróxido de litio (49,1 mg, 2,049 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a 65 °C por 1 h, y se concentró al vacío para dar un líquido amarillo claro. El líquido crudo se purificó por HPLC preparativa para dar la sal de TFA del compuesto del título (142 mg, 0,223 mmol, 65,3% de rendimiento) como un sólido beige.

Ejemplo 5: 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-c]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-onacristalina (1**), Forma 2**

El compuesto **1** del ejemplo 1 (2,5 g) se disolvió en DMSO (5 ml) a 60 °C. Una vez que se obtuvo una solución homogénea, se agregó MeOH (2,5 ml) a la solución. Se agregó la mezcla homogénea por goteo durante 30 min a una solución premezclada de MeOH (12,75 ml) y H₂O (11,25 ml) a 75 °C. Una vez que la mezcla se había agregado por completo, la mezcla combinada se dejó agitar a 75 °C por 1 h mientras se formaba una suspensión cristalina. Se

agregó por goteo H₂O (36 ml) durante 2 h a 75 °C. Después de que se completó la carga de H₂O, la lechada se agitó a 75 °C por 1 h, luego se enfrió lentamente a 20 °C durante 6 h. La lechada se mantuvo a 20 °C durante 10 h adicionales antes de filtrarse, se lavó con 70% de H₂O/MeOH (10 ml), se secó a 50 °C bajo vacío por 18 h para dar el compuesto del título, Forma 2 (2,13 g).

Propiedades de las formas sólidas de la invención

Se analizaron muestras de las dos formas anhidras, la Forma 1 y la Forma 2, de 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (1) de los Ejemplos 2 y 5, respectivamente, mediante difracción de rayos X de polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), sorción de humedad dinámica (DMS) e imágenes de microscopía de luz polarizada. La Forma 2 también se analizó mediante difracción de rayos X de un solo cristal.

Ejemplo 6: Difracción de rayos X de polvo

El patrón de difracción de rayos X de polvos de las Figuras 1 y 6 se obtuvieron un difractómetro de rayos X Bruker D8-Advance usando radiación de Cu-*K*α ($\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$) con un voltaje de salida de 45 kV y una corriente de 40 mA. El instrumento se operó en la geometría de Bragg-Brentano con los sitios incidentes, de divergencia y de dispersión definidos para maximizar la intensidad en la muestra. Para la medición, se prensó suavemente una pequeña cantidad de polvo (5-25 mg) sobre un soporte de muestras para formar una superficie lisa y se la sometió a exposición de rayos X. Las muestras se analizaron en la modalidad 2θ-2θ entre 2° y 35° en 2θ con un tamaño de paso de 0,02° y una velocidad de barrido de 0,30 segundos por

paso. La adquisición de datos se controló mediante el software de medición Bruker DiffracSuite y se analizó con el software Jade (versión 7.5.1). El instrumento se calibró con un estándar corindón, dentro de un ángulo dos theta $\pm 0,02^\circ$. Las posiciones observadas de los picos dos theta de la PXRD y los espacios d se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente, para la Forma cristalina 1 y la Forma cristalina 2.

Tabla 1: Datos de PXRD para la Forma cristalina 1

2-Theta	d(Å)	Área	% de A
7,69	11,49	5570	7,30
8,16	10,83	36847	48,60
8,97	9,85	75877	100,00
10,66	8,29	7323	9,70
11,46	7,72	5841	7,70
11,91	7,43	1496	2,00
15,29	5,79	7115	9,40
15,80	5,60	7841	10,30
16,70	5,31	14679	19,30
17,02	5,20	8024	10,60
18,00	4,92	17834	23,50
18,83	4,71	2658	3,50
20,18	4,40	18636	24,60
22,39	3,97	7067	9,30
22,98	3,87	9029	11,90
24,89	3,57	8561	11,30
26,54	3,36	7831	10,30

Tabla 2: Datos de PXRD para la Forma cristalina 2

2-Theta	d(Å)	Área	% de A
10,61	8,33	706299	100,00
10,85	8,15	192921	27,30
11,84	7,47	487816	69,10
13,32	6,64	97980	13,90
14,94	5,93	519386	73,50
16,14	5,49	110314	15,60
16,35	5,42	75483	10,70
17,69	5,01	197341	27,90

18,26	4,85	445270	63,00
18,43	4,81	152845	21,60
19,06	4,65	564088	79,90
19,20	4,62	427174	60,50
19,49	4,55	266328	37,70
20,72	4,28	72244	10,20
21,10	4,21	236517	33,50
21,94	4,05	287485	40,70
22,64	3,93	121406	17,20
23,64	3,76	152841	21,60
25,19	3,53	68220	9,70
28,08	3,17	139597	19,80

Ejemplo 7: Análisis térmico

Se condujo una calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un módulo de instrumentación TA modelo Q-100 con un controlador Thermal Analyst. Los datos se recolectaron y analizaron usando el programa informático Thermal Analysis de TA Instruments. Se pesó con precisión una muestra de cada forma cristalina en una bandeja de aluminio cubierta. Después de un período de equilibrio isotérmico de 5 minutos a 5 °C, la muestra se calentó usando una rampa de calentamiento lineal de 10 °C/min de 0 °C a 300 °C.

En la Figura 7 se muestra un termograma de DSC representativo de la forma cristalina libre, Forma 1, de la invención. El trazado de calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto presenta un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, en el rango de entre aproximadamente 210 °C y aproximadamente 234 °C, o en el rango de entre aproximadamente 215 °C y aproximadamente 229 °C, o en el rango de entre aproximadamente 220 °C y aproximadamente 224 °C. La forma cristalina se caracteriza por presentar un

trazado de calorimetría diferencial de barrido registrado a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto que presenta un máximo en el flujo de calor endotérmico con un pico a aproximadamente 221,7 °C o a $221,7 \pm 3$ °C.

En la Figura 2 se muestra un termograma de DSC representativo de la forma cristalina libre, Forma 2, de la invención. El trazado de calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto presenta un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, en el rango de entre aproximadamente 268 °C y aproximadamente 277 °C, o en el rango de entre aproximadamente 270 °C y aproximadamente 275 °C, o en el rango de entre aproximadamente 271 °C y aproximadamente 274 °C. La forma cristalina se caracteriza por presentar un trazado de calorimetría diferencial de barrido registrado a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto que presenta un máximo en el flujo de calor endotérmico con un pico en aproximadamente 272,6 °C o a $272,6 \pm 2$ °C.

Las mediciones del análisis termogravimétrico (TGA) se efectuó usando un módulo de instrumentación TA Modelo Q-50 equipado con capacidad de alta resolución. Los datos se recolectaron usando el controlador Thermal Analyst de TA Instruments y se analizaron usando el software Universal Analysis de TA Instruments. Se colocó una muestra pesada sobre una bandeja de platino y se examinó con una velocidad de calentamiento de 10 °C desde temperatura ambiente hasta 300-350 °C. Las cámaras de la balanza y del horno se purgaron con flujo de nitrógeno durante el uso.

En la Figura 8 se muestra un trazado de TGA representativo de la forma cristalina libre, Forma 1, de la invención. El trazado del análisis termogravimétrico (TGA) de la Figura 8 no muestra una pérdida de peso

significativa a temperaturas por debajo del inicio de la descomposición a aproximadamente 293 °C.

En la Figura 3 se muestra un trazado de TGA representativo de la forma cristalina libre, Forma 2, de la invención. El trazado del análisis termogravimétrico (TGA) de la Figura 3 no muestra una pérdida de peso significativa a temperaturas por debajo del inicio de la descomposición a aproximadamente 269 °C.

Ejemplo 8: Evaluación de la sorción dinámica de humedad

La medición de la sorción de humedad dinámica (DMS) se efectuó usando una microbalanza atmosférica VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se usó una muestra pesada y la humedad tenía el valor más bajo posible (cerca del 0% de RH) al comienzo del análisis. El análisis de DMS consistía en un paso de secado inicial (0% de RH) durante 120 minutos, seguido por dos ciclos de sorción y desorción con un índice de barrido de 5% de RH/paso sobre el rango de humedad de entre 5% de RH y 90% de RH. La corrida de DMS se realizó isotérmicamente a 25 °C.

En la Figura 9 se muestra un trazado de DMS representativo para la forma cristalina libre, Forma 1, de la invención.

La Forma cristalina 1 mostró una pequeña histéresis entre dos ciclos de sorción y desorción. La Forma 1 mostró una ganancia de peso de aproximadamente 0,99% en el rango de humedad de entre 5% y 70% de humedad relativa y aproximadamente 1,32% de ganancia de peso en el rango de humedad de entre 5% y 90% de humedad relativa a temperatura ambiente, como se muestra en la Figura 9. Se considera que la Forma 1 es ligeramente higroscópica.

En la Figura 4 se muestra un trazado de DMS representativo para la forma cristalina libre, Forma 2, de la invención. La Forma cristalina 2 no mostró histéresis entre dos ciclos de sorción y desorción y demostró una tendencia excepcionalmente pequeña de higroscopicidad. La Forma 2 mostró una ganancia de peso de aproximadamente 0,12 % en el rango de humedad de entre 5% y 70% de humedad relativa y aproximadamente 0,18 % de ganancia de peso en el rango de humedad de entre 5% y 90% de humedad relativa a temperatura ambiente, como se muestra en la Figura 4. Se considera que la Forma 2 no es higroscópica.

Ejemplo 9: Difracción de rayos X de un solo cristal de la Forma 2

Los datos se recolectaron con un difractómetro Atlas CCD de fuente dual Rigaku Oxford Diffraction Supernova, Cu en cero, equipado con un dispositivo de enfriamiento Oxford Cryosystems Cobra. Los datos se recolectaron usando radiación de Cu K α . La estructura se resolvió y se refinó usando el software para cristalografía del conjunto Bruker AXS SHELXTL. Los detalles completos se pueden consultar en el CIF. A menos que se defina de otra manera, los átomos de hidrógeno unidos al carbono se ubicaron geométricamente y se dejó que se refinaran con un parámetro de desplazamiento isotrópico montado. Los átomos de hidrógeno unidos a los heteroátomos se localizaron en un mapa de Fourier por diferencia y se dejó que se refinaran libremente con un parámetro de desplazamiento isotrópico.

Tabla 3: Datos del análisis de difracción de rayos X de un solo cristal para Forma 2

Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₈ F ₂ N ₆ O ₃
Peso fórmula	522,55
Tamaño del cristal	0,14 x 0,10 x 0,02 mm ³

Temperatura de la recolección de datos	293(2) K
Longitud de onda usada para la recolección de datos	1,54178 Å
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	<i>Pbca</i>
Dimensiones de celda unitaria	$a = 9,7245(11) \text{ Å}$
	$b = 16,8197(14) \text{ Å}$
	$c = 32,604(4) \text{ Å}$
	$\alpha = 90^\circ$
	$\beta = 90^\circ$
	$\gamma = 90^\circ$
Volumen de la celda unitaria	$5332,8(10) \text{ Å}^3$
Z (N° de moléculas en la celda unitaria)	8
Densidad (calculada)	$1,302 \text{ g/cm}^3$
Rango theta para la recolección de datos	$5,26 - 66,60^\circ$
Rangos de índices	$-11 \leq h \leq 11$ $-12 \leq k \leq 20$ $-38 \leq l \leq 38$
Reflexiones recolectadas	24516
Reflexiones independientes	4708 [$R_{int} = 0,0927$]
Índices R finales [$F2 > 2 \text{ sigma}(F2)$]	$R1 = 0,0808$, $wR2 = 0,2159$
Índices R (todos los datos)	$R1 = 0,1452$, $wR2 = 0,2859$

Ejemplo 10: Evaluación de la estabilidad en estado sólido de la Forma 1

Se guardaron muestras de la forma cristalina libre, Forma 1, de la invención a 25 °C y 60% de humedad relativa (RH) y a 40 °C y 75% de RH según dos configuraciones a) vial de vidrio abierto y b) vial de vidrio cerrado, ubicados en el interior de una botella HDPE que contiene desecante. La botella HDPE se selló por inducción. A intervalos específicos, se retiró el contenido de una muestra representativa y se analizó por HPLC para determinar su pureza

química (indicada a continuación como pureza por HPLC (% de a/a)).

Tabla 4: Studio de estabilidad de la Forma cristalina 1

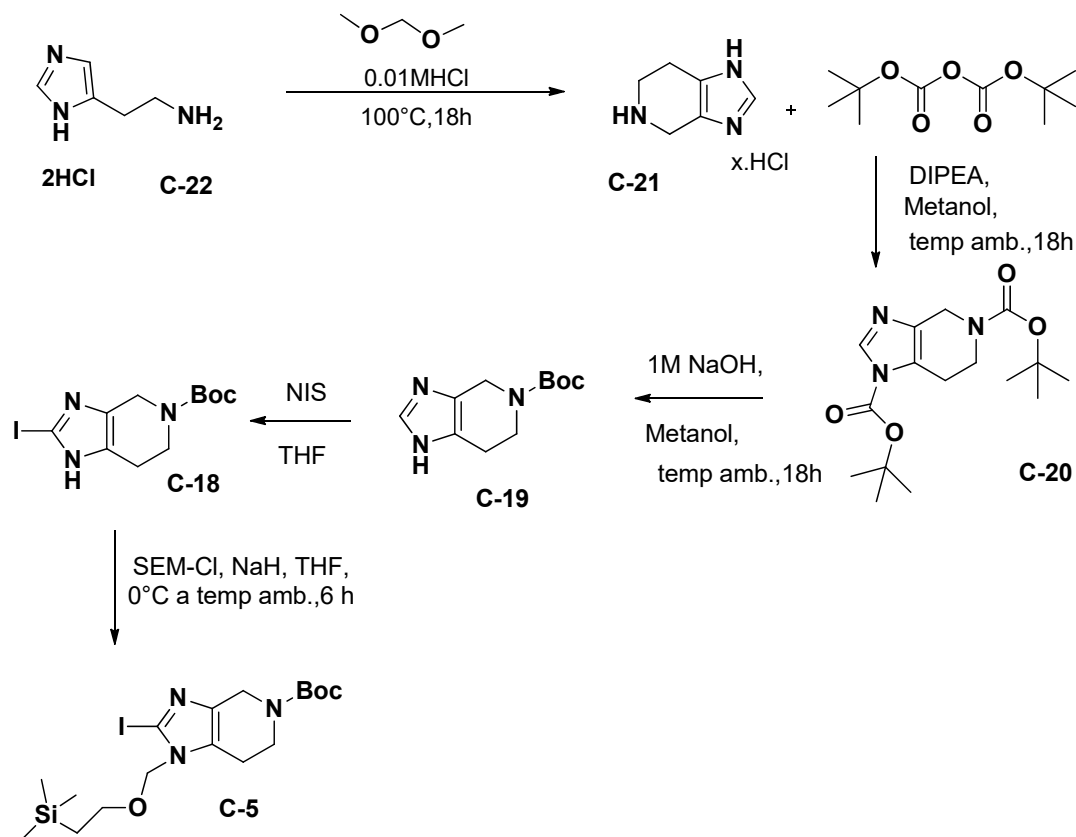
Punto de tiempo (semanas)	Condiciones			
	40 °C/75% de RH Cerrado Con desecante	40 °C/75% de RH Abierto	25 °C/60% de RH Cerrado Con desecante	25 °C/60% de RH Abierto
0	98,73			
2	NE	98,72	NE	NE
4	98,75	98,70	98,75	98,75
8	98,80	98,97	98,87	98,75
24	99,06	98,89	99,02	98,78
36	98,86	98,71	98,80	98,75

NE: No evaluado

Ejemplo 11: Imagen con microscopía de luz polarizada (PLM) de la Forma 1 y la Forma 2

Las muestras de la Forma 1 y la Forma 2 se examinaron con un microscopio óptico (Olympus BX51) con un filtro de luz polarizada cruzada. Las imágenes se recolectaron con una cámara PaxCam controlada con el software PaxIt Imaging (versión 6.4). Las muestras se prepararon sobre portaobjetos de vidrio con un aceite mineral liviano como medio de inmersión. Se usaron lentes objetivo de 4x, 10x o 20x para el aumento, dependiendo del tamaño de las partículas.

Preparación 8: 2-yodo-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato de ter-butilo (C-5)



A una solución del compuesto **C-22** (25 g, 135,86 mmol) en HCl 0,01M (500 ml) se agregó dimetoximetano (21,64 ml, 244,54 mmol). La solución resultante se agitó a 100°C por 18 h. El solvente se eliminó bajo vacío y el residuo se trituró dos veces con éter dietílico y etanol, se filtró y se secó para dar el compuesto **C-21** (25,2g, 94,6% de rendimiento).

A una solución del compuesto **C-21** (25,0 g, 127,55 mmol) en metanol (250 ml) se agregó DIPEA (57,23 ml, 318,87 mmol) seguido por la adición de (Boc)₂O (68,23 ml, 318,87 mol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 h. La reacción resultante se diluyó con agua (150 ml) y se extrajo usando acetato de etilo (3 x 200 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se decantó y se concentró bajo presión reducida para obtener el producto crudo **C-20** que se llevó al siguiente paso sin

purificación adicional.

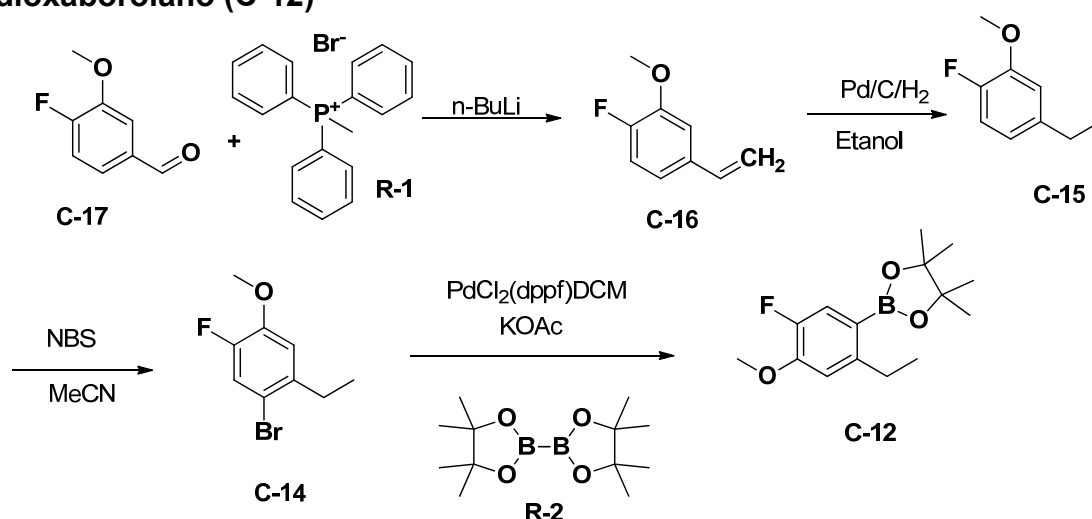
A una solución de este compuesto crudo **C-20** (40,0 g, 123,8 mmol) en metanol (500 ml) se agregó una solución de NaOH 1 M (200 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente por 18h. El solvente se separó por destilación bajo vacío y el crudo resultante se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo usando acetato de etilo (3 x 300 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para obtener el producto crudo el cual se purificó por cromatografía de columna (100-200 gel de sílice), eluído con 5-MeOH al 10%: DCM para dar el producto deseado **C-19** (20 g, 72,4% de rendimiento).

A una solución del compuesto **C-19** (20 g, 89,68 mmol) en THF (400 ml) se agregó NIS (30,26 g, 134,52 mmol) a temperatura ambiente y la solución resultante se agitó por 2 horas a la misma temperatura. La mezcla de la reacción se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo en acetato de etilo (2 X 300 ml), se lavó la capa orgánica con una solución acuosa de tiosulfato de sodio al 10% (3x100 ml) seguido por salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para obtener el producto crudo **C-18** que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

A una solución agitada del compuesto **C-18** (15,0 g, 42,97 mmol) en THF (150 ml) se agregó NaH (1,8 g 45,11 mmol) a 0 °C por porciones y la mezcla de la reacción se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se agregó cloruro de SEM (8,18 ml, 45,11 mmol) por goteo a 0°C. La reacción se agitó por 6 horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC, se detuvo la reacción con agua helada (200 ml) a 0°C y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). La capa orgánica combinada se

lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía de columna (100-200) de sílice (eluído con 10-15% de EtOAc:hexano) para dar el producto deseado **C-5** como un líquido viscoso (11g, 55%).

Preparación 9: 2-(2-etil-5-fluoro-4-metoxifenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (C-12)



A una suspensión agitada del compuesto **C-17** (347,6 g, 973,14 mmol) en THF anhidro (1000 ml) enfriado a -40°C , se agregó n-butilitio (2,5 M en hexano, 362,6 ml, 905,02 mmol) durante 50 min, en cuyo punto persistió el característico color amarillo del iluro de fósforo. La mezcla de la reacción se calentó a -10°C y se agitó por 1 h, luego la mezcla se enfrió a -30°C y una solución del compuesto **R-1** (50 g, 324,38 mmol) en THF anhidro (200 ml) se agregó durante 30 min. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC. Una vez completada, la reacción se detuvo mediante adición gradual de agua (500 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 x 500 ml). La capa

orgánica combinada se lavó con agua (2 x 500 ml), salmuera (250 ml), se secó sobre (Na_2SO_4 anhidro) y se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto crudo. El producto crudo **C-16** obtenido se usó en el siguiente paso sin purificación.

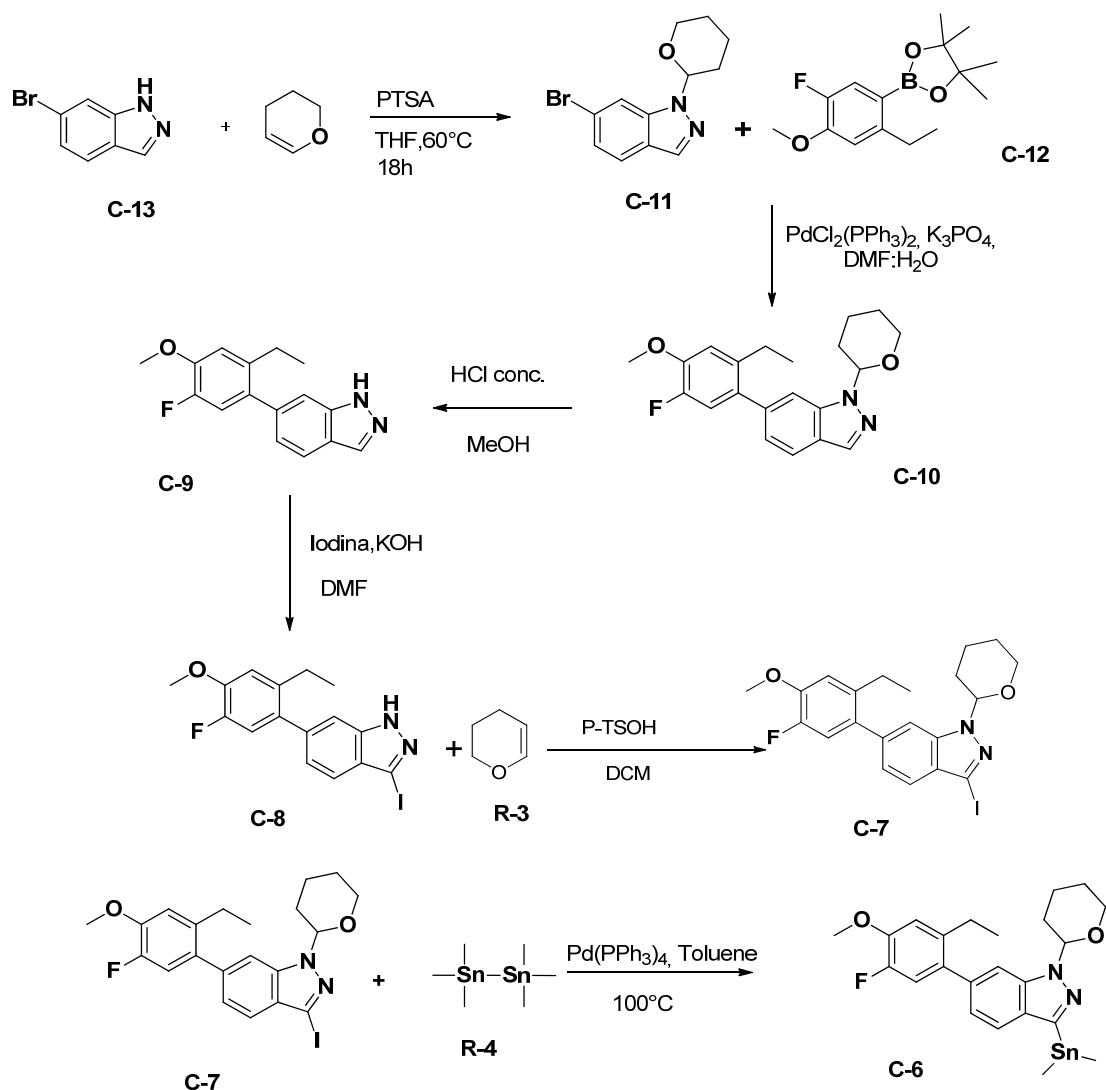
A una solución cruda **C-16** (110 g, 723,39 mmol) en etanol (1000 ml) se agregó Pd/C al 10% (50 g). Se montó un balón de hidrógeno gaseoso y la reacción se evacuó y se llenó de nuevo con hidrógeno tres veces. La reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche a temperatura ambiente. Luego de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la reacción se completó. Se filtró a través de una almohadilla de Celite y se concentró al vacío para dar el compuesto crudo, que se purificó por cromatografía de columna (100-200) de gel de sílice, eluyendo usando 3-5% de acetato de etilo/hexano para obtener el producto deseado **C-15** como un líquido incoloro (24g, 48% en los 2 pasos).

A una solución del compuesto **C-15** (24,0 g, 155,84 mmol) en MeCN (200 ml) se agregó una solución de NBS (28,0 g, 157,40 mmol) en MeCN (100 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente por 18 h. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se diluyó con éter dietílico (100 ml). Se observó precipitación, que se retiró mediante filtración y el material filtrado se lavó con una solución acuosa de sulfito de sodio (200 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío para dar el producto deseado **C-14** como un aceite amarillo (35,0 g, 97% de rendimiento).

A una solución del compuesto **C-14** (20 g, 85,836 mmol) en Dioxano (400 ml) se agregaron el compuesto **R-2** (32,69 g, 128,755 mmol) y KOAc (25,27 g, 257,508 mmol). La mezcla de la reacción se desgasificó con

nitrógeno por 15 minutos, y luego se agregó el catalizador de paladio (3,5 g, 4,29 mmol). La mezcla de la reacción se agitó y se calentó a 110°C por 3 horas. La reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con acetato de etilo. El material filtrado se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua (2 x 200 ml)) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo vacío. El producto crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna (100-200 gel de sílice), eluído con 3-5% de EtOAc:hexano para dar el producto deseado **C-12** (20g, 83% de rendimiento).

Preparación 10: 3-(dimetil-estanil)-6-(2-etil-5-fluoro-4-metoxifenil)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-indazol (C-6)



Una mezcla del compuesto **C-13** (25 g, 126,84 mmol), 3,4-dihidro-2H-piran (134,5ml, 1471,5ml) y p-TSA(5,57 g, 29,18 mmol) se introdujo en THF (700 ml) y se calentó a 60 °C durante la noche. La mezcla de la reacción se vertió en agua helada y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. El material filtrado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó sobre columna de gel de sílice (230-400) (eluyendo con 1-2 % de acetato de etilo en hexano) para dar el compuesto deseado **C-11** (23,5 g, 67% de rendimiento).

Una solución del compuesto **C-11** (13,3 g, 47,5 mmol), el compuesto **C-12** (15,96 g, 57,0 mmol) y K_3PO_4 (30,21 g, 142,5 mmol) en DMF:H₂O (396:99 ml) se desgasificó con nitrógeno por 15 minutos, luego se agregó el catalizador de paladio (1,6 g, 2,37 mmol) y la mezcla de la reacción se purgó con nitrógeno por 5 minutos. La mezcla de reacción resultante se calentó a 100 °C por 12 h bajo agitación continua. La mezcla de la reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con acetato de etilo. El material filtrado se diluyó con acetato de etilo (200 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml) y se lavó con agua fría (100 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo vacío para dar el producto crudo el cual se purificó por cromatografía flash (100-200 gel de sílice), eluído con 10% de EtOAc:Hexano para dar **C-10** (14g, 91,4% de rendimiento)).

A una solución del compuesto **C-10** (52 g, 146,89 mmol) en metanol (600 ml) se agregó HCl concentrado (50 ml) y la solución resultante se calentó a 60°C durante la noche. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró bajo vacío. El residuo se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2X150 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el producto deseado **C-9** (35g, 88,9% de rendimiento).

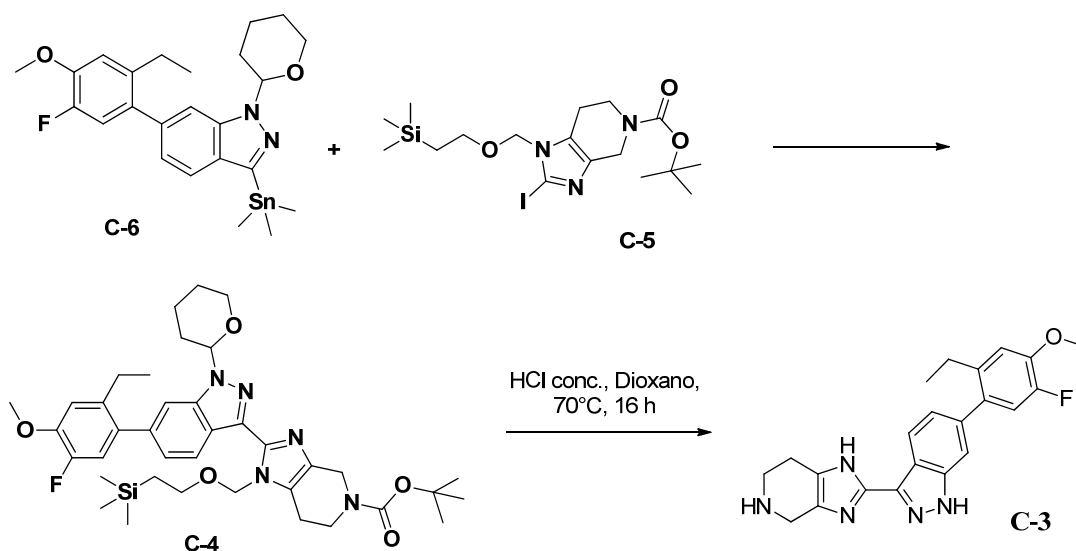
A una solución del compuesto **C-9** (17,5 g, 64,81 mmol) en DMF (100 ml) se agregó KOH (14,5 g, 259,54 mmol) y la mezcla se agitó por 15 minutos. Una solución de yodo (32,7 g, 129,62 mmol) en DMF (50 ml) se agregó lentamente a 0°C y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 min. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC, luego la mezcla de la reacción se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de

etilo (2X200 ml). La capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de metabisulfito de sodio (2X150 ml) y agua (3X100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo vacío para dar el producto crudo **C-8** (21g).

A una solución de **C-8** (21,0 g, 53,02 mmol) en DCM (230 ml) se agregó p-TsOH (1,8 g, 10,60 mmol) y la mezcla se enfrió a 0 °C. Se agregó por goteo el Compuesto **R-3** (7,04 ml, 79,54 mmol) a la solución anterior, y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La monitorización de TLC mostró la finalización de la reacción. La mezcla de la reacción se diluyó con DCM (2 x 150 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (200 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío para dar el producto crudo el cual se purificó mediante cromatografía flash para dar **C-7**.

Una solución de **C-7** (10,0 g, 20,83 mmol) en tolueno (200 ml) se degasificó con nitrógeno por 20 minutos seguido por la adición de **R-4** (4,89 ml, 22,91 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (1,2 g, 1,04 mmol). La mezcla de la reacción se purgó con nitrógeno durante 5 minutos adicionales y luego se agitó a 100 °C. Después de 2h, la TLC muestra la finalización de la reacción. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de una almohadilla de Celite y el residuo se lavó con acetato de etilo. El filtrado concentrado se purificó mediante cromatografía de columna (alúmina neutra), eluido con 2-5% de EtOAc: Hexano para dar el producto **C-6** (6,4g, 57,6% de rendimiento).

Preparación 11: 2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-metoxifenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridina (C-3)

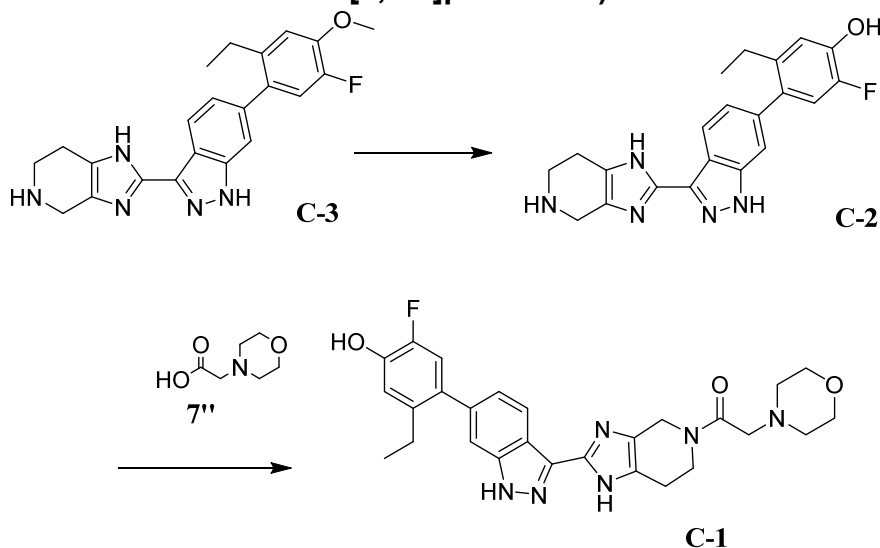


A una solución del compuesto **C-6** (6,4 g, 12,37 mmol) en tolueno (100 ml) se agregó el Compuesto **C-5** (5,9 g, 12,37 mmol). La mezcla de la reacción se desgasificó con nitrógeno por 20 minutos, seguido por la adición de yoduro de cobre (I) (470 mg, 2,47 mmol) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (714 mg, 1,237 mmol), y luego se agitó a 100 °C por 12h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite, y el residuo se lavó con acetato de etilo. La capa orgánica se diluyó con agua, se separó y la parte orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se filtró. El material filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el producto crudo el cual se purificó mediante cromatografía de columna (sílice de malla 100-200), eluido con EtOAc al 20%: Hexano para dar **C-4** (4g, 45,9%).

A una solución del compuesto **C-4** (4,0 g, 5,6 mmol) en Dioxano (30 ml) se agregó HCl concentrado (30 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 70°C por 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante LCMS. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró al vacío, se trituró con éter dietílico y se purificó por HPLC preparativa para dar el compuesto deseado **C-3**.

(0,65g, 29,5%).

Ejemplo 12: 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (C-1)



A la mezcla de **C-3** (180 mg, 0,460 mmol) en DCM (0,5 ml) a temperatura ambiente se agregó tribromuro de boro, 1 m en DCM (100 ml) (2,299 ml, 2,299 mmol). La mezcla resultante se agitó por 30 mins. antes de concentrarla. El residuo resultante se coevaporó con MeOH (3x3,0 ml), se volvió a disolver en una mezcla de AcOH:H₂O 1:1 (3,0 ml), se filtró y se purificó mediante HPLC de fase reversa preparativa. Las fracciones deseadas se combinaron y se secaron por congelación para dar **C-2** ((5-etil-2-fluoro-4-(3-(4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-2-il)-1*H*-indazol-6-il)fenol) como una sal de TFA.

A la mezcla de **C-2**, TFA (15 mg, 0,031 mmol) y **7''** (2 equivalentes, 0,061 mmol) en DMF (0,5 ml) a temperatura ambiente se agregó HATU (25,5 mg, 0,067 mmol) y DIEA (0,043 ml, 0,244 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con MeOH (0,5000 ml) y agua (0,500 ml). Se agregó LiOH (2,193 mg, 0,092 mmol). La

mezcla resultante se calentó a 65 °C por 1 hr. Luego se concentró la reacción, el residuo resultante se trató con una mezcla de DCM (0,500 ml) y TFA (0,500 ml) a temperatura ambiente por 30 mins, se concentró, se volvió a disolver en una mezcla de AcOH:H₂O 1:1 (1,5ml), se filtró y se purificó mediante HPLC de fase reversa preparativa para dar el compuesto **C-1** como una sal de TFA. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₉FN₆O₃ 504,23 encontrado 505,2.

Ensayos biológicos

El compuesto **1** se caracterizó en uno o más de los siguientes ensayos biológicos.

El compuesto **1** mostró la siguiente potencia enzimática.

Tabla 5

JAK 1 pK_i	JAK 2 pK_i	JAK 3 pK_i	Tyk2 pK_i
10	10,6	9,7	8,7

Ensayo 2: Ensayo celular de potencia de JAKI: Inhibición de IL-13

En este ensayo el compuesto **1** mostró un valor de pIC₅₀ de 7,9.

Ensayo 3: Ensayo celular de potencia de JAKI: Inhibición de IFN γ estimulado con IL-2/anti-CD3 en PBMC humanas

Ensayo 4: Ensayo celular de potencia de JAKI:

En este ensayo el compuesto **1** mostró un valor de pIC₅₀ de aproximadamente 7,7.

Ensayo 5: Ensayo celular de potencia de JAKI: Inhibición de CCL2 (MCP-

1) estimulado con IL-6 en PBMC humanas

La potencia del compuesto de prueba para la inhibición la producción de CCL3 (MCP-1) estimulado por interleuquina-6 (IL-6) se midió en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) aisladas de sangre completa humana (Stanford Blood Center). Dado que la IL-6 envía señales a través de JAK, este ensayo provee una medida distal de la potencia celular de JAK.

(1) Se aplicó el protocolo del Ensayo 3 párrafo (1) hasta la incubación con los compuestos de prueba. En este ensayo, después de agregar los compuestos de prueba a los pocillos e incubarlos, se agregó IL-6 (R&D Systems; concentración final 10 ng/ml) en medio de ensayo calentado previamente (50 µl).

(2) Después de la estimulación con citoquinas por 48 h., las células se centrifugaron a 500 g durante 5 min y los sobrenadantes se separaron y se congelaron a -80 °C. Para determinar la potencia de inhibición del compuesto de prueba como respuesta a la IL-6, se midieron las concentraciones de CCL2 (MCP-1) en el sobrenadante mediante un ELISA (R&D Systems). Los valores de IC₅₀ se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de la concentración de CCL2/MCP-1 versus la concentración de compuesto. Los datos se expresan como valores de pIC₅₀ (logaritmo de base 10 negativo IC₅₀). En este ensayo el compuesto **1** mostró un valor de pIC₅₀ de aproximadamente 6,4.

Ensayo 6: Ensayo celular de potencia de JAK1: Inhibición de PSTAT1 inducida por IFN γ

La potencia del compuesto de prueba para inhibir la fosforilación de

STAT1 estimulado con interferón gamma (IFN γ) se midió en monocitos CD14-positivos (CD14+) derivados de sangre completa humana (Stanford Blood Center) usando citometría de flujo. Dado que IFN γ envía señales a través de JAK, este ensayo provee una medida de la potencia celular de JAK.

Los monocitos se identificaron usando un anticuerpo anti-CD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clon RM052, Beckman Coulter), y se usó un anticuerpo anti-pSTAT1 conjugado con Alexa Fluor 647 (pY701, Clone 4a, BD Biosciences) para detectar la fosforilación de STAT1.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre completa humana de donantes sanos usando un gradiente de Ficoll. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C, con 5 % de CO $_2$ en RPMI (Life Technologies) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies), Glutamax 2 mM (Life Technologies), HEPES 25 mM (Life Technologies) y Pen/Estrep 1X (Life Technologies). Las células se sembraron a razón de 250.000 células/pocillo en el medio (200 μ l), se cultivaron durante 2 h y se resuspendieron en medio de ensayo (50 μ l) (RPMI suplementado con 0,1% de albúmina de suero bovino (Sigma), Glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X) que contiene varias concentraciones de los compuestos de prueba. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y luego se diluyeron otras 1000 veces en medio para llevar la concentración final de DMSO a 0,1%.. Las diluciones del compuesto de prueba se incubaron con células a 37 °C, 5% de CO $_2$ durante 1 h, seguido por la adición de IFN γ calentado previamente (R&D Systems) en el medio (50 μ l) a una concentración final de 0,6 ng/ml durante 30 min. Después de la estimulación con las citoquinas, las células se fijaron con solución de fijación

calentada previamente (100 µl) (BD Biosciences) durante 10 min a 37 °C, 5% de CO₂, se lavaron dos veces con solución amortiguadora para FACS (1 ml) (1% de BSA en PBS), se resuspendieron en 1:10 de anti-CD14 FITC:solución amortiguadora para FACS (100 µl) y se incubaron a 4 °C durante 15 min. Las células se lavaron una vez y luego se resuspendieron en solución amortiguadora Perm III helada (BD Biosciences) (100 µl) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora para FACS, y luego se resuspendieron en 1:10 de anti-pSTAT1 Alexa Fluor 647:solución amortiguadora de FACS (100 µl) durante 30 min a RT en oscuridad, se lavaron dos veces en una solución amortiguadora para FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences).

Para determinar la potencia inhibidora del compuesto de prueba, se midió la mediana de la intensidad fluorescente (MFI) de pSTAT1 en monocitos CD14+. Los valores de IC₅₀ se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de MFI versus la concentración de compuesto. Los datos se expresan como valores de pIC₅₀ (logaritmo de base 10 negativo IC₅₀). En este ensayo el compuesto **1** mostró un valor de pIC₅₀ de aproximadamente 7,1.

Ensayo 7: Farmacocinética ocular en ojos de conejo

El objetivo de este ensayo era determinar la farmacocinética de un compuesto de prueba en tejidos oculares de conejo.

Formulación en solución

Se disolvió 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (**1**), preparada en el Ejemplo 2, en 2% de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina para lograr una concentración blanco de 1 mg/ml. Se administró una inyección intravítrea

bilateral (50 µl/ojo) de la solución del compuesto de prueba a conejos blancos New Zealand (50 µg/ojo). La concentración del compuesto de prueba se midió en los tejidos oculares: vítreo, acuoso, retina/coroide y iris-cuerpo ciliar en puntos de tiempo predeterminados después de la inyección (30 min, 4 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d). Se administraron dosis a dos conejos (cuatro ojos) por cada punto de tiempo. En el tejido vítreo, el compuesto **1** mostró una disminución en dos fases en la concentración caracterizada por una disminución inicial en la concentración con una vida media de aproximadamente 9 horas y finalmente una vida media terminal de aproximadamente 2 días. Se encontró que el compuesto se distribuye rápidamente en la región retiniana y también coroidal y muestra un perfil farmacocinético similar al observado en el tejido vítreo.

Formulación para suspensiones

Se preparó una formulación en suspensión mediante combinación del compuesto **1** del Ejemplo 2 (Forma 1), con 0,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E5) + 0,02% de Tween 80 en salina normal para lograr una concentración blanco de 5 mg/ml, 20 mg/ml y 80 mg/ml para las dosis de 0,25 mg/ojo, 1 mg/ojo y 4 mg/ojo, respectivamente. Se administró una inyección intravítrea bilateral (50 µl/ojo) de la suspensión del compuesto de prueba a conejos blancos New Zealand. La concentración del compuesto de prueba se midió en tejidos oculares como en el ensayo de formulación en solución a los 30 min, 4 h, 24 h, 72 h, 7 d, 14 d, 28 d, 56 d y 84 d después de la inyección. En el grupo de dosis de 4 mg/ojo, también se recolectó un punto de tiempo adicional a los 168 d después de la inyección. Todos los grupos de dosis mostraron una concentración mensurable del fármaco en el ojo hasta el último punto de tiempo evaluado en este estudio. Se observó exposición sostenida

robusta para todas las dosis a las 12 semanas (84 d). Se observó una exposición sostenida a las 24 semanas (84 d) en el grupo de dosis de 4 mg/ojo. El compuesto mostró una disminución lineal de la concentración del fármaco en el tejido vítreo entre 30 min y 24 semanas con una velocidad de depuración del fármaco de entre aproximadamente 5 y 10 $\mu\text{g/ml/día}$. La velocidad de depuración es consistente con la solubilidad del compuesto **1** en el vehículo y el comportamiento farmacocinético ocular en la formulación en solución. Todos los grupos de dosis mostraron una concentración mensurable del fármaco en el ojo hasta el último punto de tiempo evaluado en este estudio. Por ello, es factible que la exposición del fármaco es mayor que la observada en este estudio. Se midió la concentración del fármaco en plasma y se encontró que era por lo menos 3 órdenes de magnitud menor que la concentración en el tejido vítreo a las tres concentraciones.

Se preparó una formulación en suspensión mediante combinación del compuesto **1** del Ejemplo 5 (Forma 2), con 0,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E5) + 0,02% de Tween 80 en salina normal para lograr una concentración blanco de 0,4 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml y 20 mg/ml para las dosis de 0,05 mg/ojo, 0,1 mg/ojo y 1 mg/ojo, respectivamente. Se administró una inyección intravítrea bilateral (50 $\mu\text{l/ojo}$) de la suspensión del compuesto de prueba a conejos Dutch Belted. La concentración del compuesto de prueba se midió en el humor vítreo, el humor acuoso, iris-cuerpo ciliar, retina, epitelio del pigmento retiniano/células coroidales y plasma a los 30 min, 7d, 14d, 28d, 42d y 56d después de la inyección. El compuesto mostró una disminución muy gradual de la concentración del fármaco en el tejido vítreo desde los 30 min hasta el último punto de tiempo evaluado (28d para la dosis de 0,02 mg/ojo,

42d para las dosis de 0,05 mg/ojo y 1 mg/ojo y 56d para la dosis de 0,1mg/ojo). Todos los grupos de dosis mostraron una concentración mensurable del fármaco en el ojo hasta el último punto de tiempo evaluado en este estudio. Por ello, es factible que la exposición del fármaco es mayor que la observada en este estudio. Se midió la concentración del fármaco en plasma y se encontró que era por lo menos 3 órdenes de magnitud menor que la concentración en el tejido vítreo a las tres concentraciones. Las 3 órdenes de magnitud corresponden a una escala logarítmica (es decir, 1000 en una escala no logarítmica).

Ensayo 8: Ensayo farmacodinámico: Inhibición de pSTAT3 inducida por IL6 en ratas

Se midió la capacidad de una sola administración intravítrea del compuesto de prueba para inhibir pSTAT3 inducida por IL-6 en homogenatos de retina/coroide de rata.

Se preparó una formulación en suspensión mediante combinación del compuesto **1** del Ejemplo 2, con 0,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E5 LV), 0,02% de Tween 80 y cloruro de sodio 9 mg/ml en agua purificada para lograr una concentración blanco de 10 mg/ml.

Ratas hembra Lewis recibieron por vía intravítrea (IVT) dosis (5 µl por ojo) de la formulación en suspensión. Tres días después, se administró IL-6 (Peprotech; 0,1 mg/ml; 5 µl por ojo) o vehículo por vía intravítrea para inducir pSTAT3. Los tejidos oculares se disecaron una hora después de la segunda inyección IVT con IL-6. Los tejidos retinianos/de corioide se homogeneizaron y se midieron los niveles de pSTAT3 usando un ELISA (Cell Signaling Technology). El porcentaje de inhibición de pSTAT3 inducida por IL-6 se

calculó en comparación con los grupos de vehículo/vehículo y vehículo/IL-6. Una inhibición mayor que un 100% refleja una reducción de los niveles de pSTAT3 hasta por debajo de los observado en el grupo vehículo/vehículo.

Con un pretratamiento de 3 días antes del desafío con IL-6, una dosis de 50 µg del compuesto **1** administrado mediante la formulación en suspensión inhibió el PSTAT3 inducida por IL-6 en un 116% en los tejidos retiniano/coroide.

Ensayo 9: Ensayo farmacodinámico: Inhibición de IP-10 inducida por IFN γ en ojos de conejo

Se midió la capacidad de una sola administración intravítrea del compuesto de prueba para inhibir los niveles de la proteína IP-10 inducida por interferón-gamma (IFN γ) en los tejidos vítreo y retiniano/coroide de conejo.

Se preparó una formulación en suspensión mediante combinación del compuesto **1** del Ejemplo 2 (Forma 1), con 0,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E5), 0,02% de Tween 80 y cloruro de sodio 9 mg/ml en agua purificada para lograr una concentración blanco de 20 mg/ml.

Se usaron conejos blancos macho New Zealand (Liveon Biolabs, India) en los estudios. Se dejó que los animales se adaptaran después de su llegada a las instalaciones de investigación (Jubilant Biosys Ltd., India). Cada conejo recibió un total de dos inyecciones intravítreas (IVT) con un volumen de dosis total de 50 µl por ojo. La primera inyección IVT (45 µl por ojo) suministró 0,9 mg del compuesto de prueba o vehículo. Una semana después, una segunda inyección IVT (5 µl por ojo) suministró IFN γ (1 µg/ojo; solución madre 1 mg/ml; Kingfisher Biotech) o vehículo para la inducción de IP-10. El día de las inyecciones, los conejos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Una vez que estuvieron

profundamente anestesiados, cada ojo se lavó con salina estéril y se aplicaron las inyecciones IVT usando una jeringa para insulina de 0,5 ml (50 unidades = 0,5 ml) con una aguja calibre 31 en el lado supranasal de ambos ojos marcando la posición con un calibre fijo Braunstein (2 3/4") a 3,5 mm del músculo recto y 4 mm del limbo.

Los tejidos se recolectaron 24 horas después de la segunda inyección IVT con IFN γ . Se recolectaron tejidos vítreo humoral (VH) y retiniano/coroide (R/C) y se homogeneizaron, y se midieron los niveles de la proteína IP-10 usando un kit para ELISA para CXCL10 (IP-10) de conejo (Kingfisher Biotech). El porcentaje de inhibición de IP-10 inducida por IFN γ se calculó en comparación con los grupos de vehículo/vehículo y vehículo/IFN γ .

Con una 1 semana de pretratamiento antes del desafío con IFN γ , la formulación en suspensión del compuesto **1** inhibió la IP-10 inducida por IFN γ en un 81% y 80% en los tejidos vítreo humoral y retiniano/coroide, respectivamente. También se observó una eficacia similar con un 1 mes de pretratamiento antes del desafío con IFN γ .

Ensayo 10: Farmacocinética dérmica en piel de ratón y minicerdo

El objetivo de este ensayo era determinar la farmacocinética epidérmica, dérmica y de plasma de un compuesto de prueba después de 24 h de exposición a la piel intacta de ratón o minicerdo.

Se formuló 1-(2-(6-(2-etil-5-fluoro-4-hidroxifenil)-4-fluoro-1*H*-indazol-3-il)-1,4,6,7-tetrahidro-5*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-5-il)-2-morfolinetan-1-ona (**1**), al 0,5% (p/p) en crema o ungüento como se describió, como la Formulación A o la Formulación B, respectivamente, en la Tabla 6.

A las veinticuatro horas antes de la dosificación se afeitó el pelo del

dorso de ratones macho Balb/c de 25 g exponiendo un área de por lo menos 6 cm² (aproximadamente un 10% de la superficie corporal) y, en un experimento separado, de minicerdos Gottingen de 10 kg exponiendo un área de por lo menos 450 cm² (aproximadamente un 10% de la superficie corporal). En el tiempo cero, después de la anestesia con isoflurano, se aplicó el compuesto de prueba al dorso de los ratones o minicerdos a una dosis de 25 µl/cm². La piel se cubrió con un recubrimiento adhesivo para impedir la pérdida del compuesto en la jaula o el lecho.

Después de 24 h de exposición, los dorsos se lavaron cuidadosamente con jabón y agua para eliminar el fármaco no absorbido y se secaron con palmaditas suaves. Inmediatamente después de este lavado, se extrajo sangre mediante punción cardíaca de los ratones y por medio de venipuntura de los minicerdos. Luego se retiró la piel externa (estrato córneo) mediante decapado con cinta adhesiva. Tras exponer la epidermis, se tomó una biopsia con sacabocados de 0,5 cm. La epidermis y la dermis se separaron rápidamente, se pesaron y se congelaron inmediatamente. Se obtuvieron muestras similares a las 48 h después de la dosificación en ratones y a las 48 h, 94 h y 168 h (7 días) después de la dosificación en minicerdos.

Las muestras de epidermis y dermis se homogeneizaron en 1:10 (p/v) de agua usando un homogeneizador ultrasónico Covaris. Las muestras se extrajeron en 3 volúmenes de acetonitrilo y se cuantificaron contra una curva estándar mediante un análisis de LC-MS. Según lo evidencian los parámetros farmacocinético de AUC_{0-t} para plasma, epidermis y dermis que se muestran en la siguiente Tabla 7, se observó una exposición significativa del compuesto en las capas de epidermis y dermis en tanto la exposición en plasma era

despreciable en ratones con la Formulación A y por debajo del límite de cuantificación con la Formulación B en ratones y con ambas formulaciones en minicerdo.

Tabla 6

Formulación A		Formulación B	
Compuesto 1	0,5%	Compuesto 1	0,5%
Ácido esteárico	5%	Octilhidroxiestearato	5%
Alcohol cetosteárico	5%	C8-C10 triglicérido	5%
Palmitato de isopropilo	4%	Vaselina (petrolato)	79,5 %
Octilhidroxiestearato	2%	N-metilpirrolidona	10%
BRIJ S2 (éter estearílico PEG 2)	1,08 %		
BRIJ S20 (éter estearílico PEG 20)	6,92 %		
N-metilpirrolidina	10%		
PEG400	10%		
Agua RO	55,5 %		

Tabla 7

	Plasma AUC_{0-t} (µg*h/ml)	Epidermis AUC_{0-t} (µg*h/g)	Dermis AUC_{0-t} (µg*h/g)
Formulación A de ratón	0,022	1370	99
Formulación B de ratón	<0,001	10700	1110
Formulación A de minicerdo	<0,001	1220	44
Formulación B de minicerdo	<0,001	2460	88

Ensayo 11: Farmacocinética en pulmón y plasma en ratones

Las concentraciones en plasma y pulmón del compuesto 1 y las relaciones de las mismas se determinaron de la siguiente manera. Se usaron ratones BALB/c de Charles River Laboratories en el ensayo. La Forma 1 del compuesto 1 del ejemplo 2 se formuló en 0,01% de Tween 80 en salina normal (0,9% de cloruro de sodio en agua) a una concentración de 0,1 mg/mL como

una suspensión. Se introdujeron 50 µl de la formulación en suspensión en la tráquea de un ratón mediante aspiración oral. Se tomaron muestras de sangre en varios puntos de tiempo (0,083, 1, 4, 24, 48, 72 y 96 h) después de la dosificación, mediante punción cardíaca y se recortaron los pulmones intactos de los ratones. Las muestras de sangre se centrifugaron (centrífuga Eppendorf, 5804R) durante 4 minutos aproximadamente a 12.000 rpm a 4 °C para recolectar el plasma. Los pulmones se secaron con golpecitos suaves, se pesaron y se homogeneizaron a una dilución de 1:3 en agua estéril. Las concentraciones en plasma y pulmón del compuesto **1** se determinaron mediante análisis por LC-MS contra estándares analíticos contruidos en una curva estándar en la matriz de prueba. Se encontró una buena exposición en los pulmones con un AUC(0-96 h) de 360 µg h/g de pulmón. La vida media en pulmón se calculó aproximadamente a las 40 horas. La relación de pulmón a plasma se determinó como la relación del AUC de pulmón en µg h/g al AUC del plasma en µg h/ml (donde la AUC se define convencionalmente como el área bajo la curva de concentración del compuesto de prueba versus el tiempo). La relación del AUC de pulmón a plasma era de 1780, mostrando una exposición muy baja en el plasma.

Ensayo 12: Ensayo farmacodinámico: Inhibición de PSTAT1 inducida por IFNγ en ojos de conejo

Se midió la capacidad de una sola administración intravítrea del compuesto de prueba para inhibir la fosforilación de la proteína STAT1 (pSTAT1) inducida por interferón-gamma (IFNγ) en tejido retiniano/coroide de conejo.

Se preparó una formulación en suspensión mediante combinación del

compuesto **1** del Ejemplo 2 (Forma 1), con 0,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E5), 0,02% de Tween 80 y cloruro de sodio 9 mg/ml en agua purificada para lograr una concentración blanco de 20 mg/ml.

Se usaron conejos blancos macho New Zealand (Liveon Biolabs, India) en los estudios. Se dejó que los animales se adaptaran después de su llegada a las instalaciones de investigación (Jubilant Biosys Ltd., India). Cada conejo recibió un total de dos inyecciones intravítreas (IVT) con un volumen de dosis total de 50 µl por ojo. La primera inyección IVT (45 µl por ojo) suministró 0,9 mg del compuesto de prueba o vehículo. Una semana después, una segunda inyección IVT (5 µl por ojo) suministró IFN γ (1 µg/ojo; solución madre 1 mg/ml; Kingfisher Biotech) o vehículo para la inducción de IP-10. El día de las inyecciones, los conejos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Una vez que estuvieron profundamente anestesiados, cada ojo se lavó con salina estéril y se aplicaron las inyecciones IVT usando una jeringa para insulina de 0,5 ml (50 unidades = 0,5 ml) con una aguja calibre 31 en el lado supranasal de ambos ojos marcando la posición con un calibre fijo Braunstein (2 3/4") a 3,5 mm del músculo recto y 4 mm del limbo.

Los tejidos se recolectaron 2 horas después de la segunda inyección IVT con IFN γ . Se recolectaron tejidos retiniano/coroide (R/C) y se homogeneizaron y se midieron los niveles de pSTAT1 mediante transferencia Western cuantitativa con el instrumento ProteinSimple WES. El porcentaje de inhibición de pSTAT1 inducida por IFN γ se calculó en comparación con los grupos de vehículo/vehículo y vehículo/IFN γ .

Con un pretratamiento de 1 semana antes del desafío con IFN γ , la

formulación en suspensión del compuesto **1** inhibió la PSTAT1 inducida por IFN γ en un 85%. Después de un pretratamiento de 3 meses con una sola dosis de la formulación en suspensión antes del desafío con IFN γ , la formulación en suspensión del compuesto **1** inhibió la PSTAT1 inducida por IFN γ en un 76%.

Se preparó una formulación en suspensión mediante combinación del compuesto **1** del Ejemplo 5 (Forma 2), con 0,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC E5) + 0,02% de Tween 80 en salina normal para lograr una concentración blanco de 1,1, 3,3 y 1,1 mg/ml.

Se usaron conejos blancos macho New Zealand (Liveon Biolabs, India) en los estudios. Se dejó que los animales se adaptaran después de su llegada a las instalaciones de investigación (Jubilant Biosys Ltd., India). Cada conejo recibió un total de dos inyecciones intravítreas (IVT) con un volumen de dosis total de 50 μ l por ojo. La primera inyección IVT (45 μ l por ojo) suministró 500 μ g, 150 μ g o 50 μ g del compuesto de prueba o vehículo. Dos semanas después, una segunda inyección IVT (5 μ l por ojo) suministró IFN γ (1 μ g/ojo; solución madre 1 mg/ml; Kingfisher Biotech) o vehículo para la inducción de IP-10. El día de las inyecciones, los conejos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Una vez que estuvieron profundamente anestesiados, cada ojo se lavó con salina estéril y se aplicaron las inyecciones IVT usando una jeringa para insulina de 0,5 ml (50 unidades = 0,5 ml) con una aguja calibre 31 en el lado supranasal de ambos ojos marcando la posición con un calibre fijo Braunstein (2 3/4") a 3,5 mm del músculo recto y 4 mm del limbo.

Los tejidos se recolectaron 2 horas después de la segunda inyección IVT con IFN γ . Se recolectaron tejidos retiniano/coroide (R/C) y se homogeneizaron

y se midieron los niveles de pSTAT1 mediante transferencia Western cuantitativa con el instrumento ProteinSimple WES. El porcentaje de inhibición de pSTAT1 inducida por IFN γ se calculó en comparación con los grupos de vehículo/vehículo y vehículo/IFN γ .

Con un pretratamiento de 2 semanas antes del desafío con IFN γ , la formulación en suspensión del compuesto **1** inhibió la pSTAT1 inducida por IFN γ en un 79% para la dosis de 500 μ g, en un 58% para la dosis de 150 μ g y en un 61% para la dosis de 50 μ g.

Ensayo 13: Examen del quinoma y coeficiente de GINI

los compuestos **1** y **C-1** se examinaron contra otras quinasas para evaluar su perfil de selectividad.

Se cultivaron cepas del fago T7 marcadas con quinasas en paralelo en bloques de 24 pocillos en un huésped de *E. coli* derivado de la cepa BL21. Se cultivaron *E. coli* hasta la fase log y se infectaron con el fago T7 a partir de un stock congelado (multiplicidad de infección = 0,4) y se incubaron con agitación a 32 °C hasta la lisis (90-150 minutos). Los lisados se centrifugaron (6.000 x g) y se filtraron (0,2 μ m) para eliminar los desechos celulares. Las quinasas remanentes se produjeron en células HEK-293 y a continuación se marcaron con ADN para la detección por qPCR.

Se trataron esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina con ligandos de moléculas pequeñas biotiniladas durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para los ensayos con quinasas. Las esferas con los ligandos se bloquearon con un exceso de biotina y se lavaron con solución amortiguadora de bloqueo (SeaBlock (Pierce), 1% de BSA, 0,05% de Tween 20, DTT 1 mM) a fin de eliminar el ligando no unido y para reducir la

unión no específica al fago. Las reacciones de unión se ensamblaron por combinación de las quinasas, las esferas de afinidad con ligados y los compuestos de prueba en solución amortiguadora de unión 1x (20% de SeaBlock, 0,17x de PBS, 0,05% de Tween 20, DTT 6 mM). Los compuestos de prueba se prepararon como soluciones madre 40x en 100% de DMSO y se diluyeron directamente en el ensayo. Todas las reacciones se condujeron en placas de polipropileno de 384 pocillos en un volumen final de 0,04 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y las esferas de afinidad se lavaron con solución amortiguadora de lavado (1x de PBS, 0,05% de Tween 20). Después las esferas se volvieron a suspender en solución amortiguadora de elución (1x de PBS, 0,05% de Tween 20, ligando de afinidad no biotinilado 0,5 μ M) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de quinasas en los eluatos se midió mediante qPCR.

Los compuestos se examinaron a 1 μ M, y los resultados de las interacciones de unión de la prueba primaria de las Tablas 8 y 9 se informan como el “% de inhibición” ($= 100 - ((\text{señal del compuesto de prueba} - \text{señal del control positivo}) / ((\text{señal del control negativo}) - (\text{señal del control positivo})) \times 100$), donde el control negativo es DMSO y el control positivo es un compuesto control.

Tabla 8

Compuesto/Quinasas	ALK	AURKA	CDK2	CDK7	CDK9	CSF1R	EPHB6	GSK3B
1	75	11	6	74	9	98	88	31
C-1	81	57	53	99	95	100	98	68

Tabla 9

Compuesto/Quinasa	KIT	PAK4	PKAC-ALPHA	PLK4	SLK	SRC	SYK	VEGFR2
1	87	93	20	58	100	93	46	42
C-1	99	99	70	68	100	100	78	63

Se encontró que el compuesto **1** presentaba una inhibición de la unión significativamente menor para CDK7 y CDK9 que el compuesto **C-1**. El compuesto **1** también presentaba una inhibición de unión menor para varias otras quinasas.

Ambos compuestos **1** y **C-1** se examinaron contra 35 quinasas diferentes. Se determinó el coeficiente de Gini para ambos compuestos. El compuesto **1** tenía un coeficiente de Gini de 0,62 y el compuesto **C-1** tenía un coeficiente de Gini de 0,46. El coeficiente de Gini se usa para expresar la selectividad de un compuesto contra un panel de quinasas (Graczyk, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 5773-5779). Un número más elevado corresponde a un compuesto más selectivo.

La única diferencia estructural entre el compuesto **1** y el compuesto **C-1** es la presencia de un grupo flúor en el núcleo. Se ha demostrado que esta diferencia estructural tiene un efecto importante sobre la selectividad de quinoma del compuesto.

Ensayo 14: Ensayo de citotoxicidad

Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad luminiscente CellTiter-Glo en células epiteliales de pulmón humanas BEAS-2B (ATCC) bajo las condiciones de crecimiento normales.

Se cultivaron células a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ en medio DMEM al 50%/F-12 al 50% (Life Technologies) suplementado con 10% de FBS (Hyclone), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de

estreptomycin (Life Technologies) y GlutaMAX 2 mM (Life Technologies). El día 1 del ensayo, las células se sembraron a una densidad de 500 células/pocillo en placas para cultivo tisular de 384 pocillos (Corning) con 25 μ l de medio, y se dejó que se adhirieran durante una noche en la incubadora. El día 2 del ensayo, se agregaron 5 μ l de medio que contiene los compuestos de prueba de dosis-respuesta y se incubaron a 37 °C durante 48 h. A continuación, se agregaron 30 μ l de la solución de detección CellTiter-Glo (Promega), se mezclaron con un agitador orbital durante 5 min y se incubaron durante 10 min adicionales antes de su lectura con el lector EnVision. Se registraron las señales de luminiscencia y se calcularon los valores porcentuales del control de DMSO.

Para el análisis de la dosis-respuesta, se graficaron los datos de control de DMSO porcentuales versus las concentraciones del compuesto a fin de derivar las curvas de dosis-respuesta mediante conexión con una línea de cada punto de dato. La concentración a la cual cada curva interfecta el umbral del 15% de inhibición se define como CC₁₅.

Se espera que sea menos probable que los compuestos de prueba que presentan un valor CC₁₅ más alto en este ensayo causen citotoxicidad.

El compuesto **1** presentó un valor de CC₁₅ de 3,16 μ M, en tanto el compuesto **C-1** mostró un valor CC₁₅ de 630 nM. Por ello, es significativamente menos probable que el compuesto **1** cause citotoxicidad que el compuesto **C-1** basado en este ensayo.

La única diferencia estructural entre el compuesto **1** y el compuesto **C-1** es la presencia de un grupo flúor en el núcleo. Se ha demostrado que esta diferencia estructural tiene un efecto importante sobre la citotoxicidad del

compuesto.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a aspectos específicos o formas de realización de los mismos, los especialistas en el arte comprenderán que es posible efectuar diversos cambios o sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, hasta el grado permitido por las leyes y las normas aplicables a patentes, todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente que se citan en la presente documentación se incorporan por completo a modo de referencia en la misma extensión que si cada documento se hubiera incorporado individualmente a modo de referencia en la presente documentación.