

PIRROLOPIRIMIDINA Y DERIVADOS DE PIRROLOPIRIMIDINA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con compuestos de pirrolopirimidina y su uso en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o las enfermedades fibróticas. En un aspecto particular, los compuestos de la presente son inhibidores de ASK (quinasa reguladora de la señal de apoptosis, por sus siglas en inglés). La presente invención también proporciona métodos para la producción de un compuesto de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, el uso de los compuestos en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, de afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o las enfermedades fibróticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) es una quinasa Ser/Thr ubicuamente expresada en la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) que induce una respuesta a los estímulos del estrés que incluye moléculas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y lipopolisacáridos (LPS), estrés endoplasmático, estrés oxidativo, estrés genotóxico, radicales libres, ligando Fas y sobrecarga de calcio (Takeda K y colaboradores (2008) Annu Rev Pharmacol Toxicol 248 pp199-225; Nagai H y colaboradores (2007) J Biochem Mol Biol 40 pp1-6).

ASK1 es una entre un número de MAP quinasa quinasa quinasa (MAP3K) que transmiten una señal a través de MAP quinasa quinasa (MKK). En el caso de la señalización de ASK1, MKK3 y MKK6 activan la vía p38 y MKK4 y MKK7 activan

la vía JNK (Davis RJ (2000) Cell 103 pp239-252; Ichijo H y colaboradores (1997) Science 275 pp90-94). Por lo tanto, los inhibidores de ASK1 tienen el potencial para suprimir las vías de señalización a través de p38 y JNK.

Uso del receptor TNF soluble: Se ha demostrado que la proteína de fusión Fc
 5 Enbrel (etanercept) resulta eficaz en el tratamiento clínico del dolor inflamatorio y también en modelos pre-clínicos de dolor neuropático (Hao S et al (2007) Gene Therapy 14 pp1010-1016) lo que implica que el TNF- α es un mediador clave en la respuesta ante el dolor. La IL-6 es un mediador clave corriente abajo de la señalización del TNF- α y existe evidencia clínica que respalda la terapia anti IL-6
 10 como un enfoque terapéutico válido para la artritis reumatoidea (Roche ha publicado resultados positivos de Fase III para Actemra/Tocilizumab en mayo de 2008).

Un número de células que no tienen ASK1 funcional (aisladas de ratones KO ASK1, o luego de silenciamiento génico) son resistentes a la apoptosis inducida
 15 por el TNF- α (Tobiume K, y colaboradores (2001) EMBO Rep 2 pp222-228). Por lo tanto, ASK1 es pivotal en la vía TNF- α y respalda la hipótesis de que interrumpir la vía de señalización del TNF- α mediante la inhibición de ASK1 tendría efectos beneficiosos corriente abajo tales como el alivio del dolor. Existe evidencia contundente para relacionar la activación de p38 y/o JNK con la
 20 producción de mediadores pro-inflamatorios y la subsiguiente respuesta al dolor (Ji R-R y Suter MR (2007) Molecular Pain 3 pp33-41; Cheng HT y colaboradores (2008) Neuroscience 155 pp948-958; Ji R-R y Gao Y-J (2008) Neurosci Lett 437 pp180-183). Dado que la activación de ASK1 puede llevar a la activación de p38 y JNK, la inhibición de ASK1 tiene el potencial de ser más potente que los
 25 inhibidores de p38 solos y, como está más arriba en la cascada de señalización, puede limitar la probabilidad de vulnerabilidades no deseadas.

La fibrosis es un proceso de curación de heridas en el cual existe una deposición excesiva de la matriz extracelular (MEC). La MEC está compuesta por colágenos, glicoproteínas no colágenas, factores de crecimiento unidos a la matriz, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas matricelulares, que proporcionan el andamiaje del tejido normal y fibrótico.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA) es la causa más común de enfermedad hepática crónica en los países desarrollados (Younossi ZM, y colaboradores, Clin Gastroenterol Hepatol 2011; 9: 524–30 y Cohen JC, y colaboradores, Science, 2011; 332: 1519–23). Esta se puede clasificar de modo amplio en dos categorías: hígado graso no alcohólico (o esteatosis simple) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Aunque anteriormente se creía que la esteatosis era mayormente no progresiva mientras que la EHNA era la forma progresiva de la HGNA, evidencia reciente de estudios seriados de biopsias demuestran que los pacientes con esteatosis o EHNA tienen un riesgo aumentado de que la enfermedad posteriormente progrese a fibrosis y cirrosis avanzada (Singh S, y colaboradores, Clin Gastroenterol Hepatol 2015; 13: 643–54 y McPherson S, y colaboradores, J Hepatol 2015; 62: 1148–55).

Se sabe que el estrés oxidativo desempeña un rol principal en la activación de las células estrelladas hepáticas (CEH) en EHNA (Bian Z, & Ma X. Front Physiol 2012; 3: 248 y Koek GH, y colaboradores, Clin Chim Acta 2011; 412: 1297–305), y que los antioxidantes no solo ejercen un efecto preventivo sobre el daño a los hepatocitos sino que pueden contribuir directamente con el aumento de la fibrogénesis, (Serviddio G y colaboradores, Free Radic Biol Med 2013; 65: 952–68) un efecto respaldado por estudios de asociación génica donde variantes que afectan la eficacia de las defensas antioxidantes celulares influyen en el riesgo de fibrosis HGNA (Al-Serri A, y colaboradores, J Hepatol 2012; 56: 448–54).

La quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) es una quinasa que es activada por varios estímulos que incluyen hiperglicemia, TGF- β y ROS (Karnik S, Charlton MR, Li L, y colaboradores, The Liver Meeting 2015, San Francisco, CA, 13–17 de noviembre, American Association for the Study of Liver Diseases, 2015).

- 5 ASK1 induce apoptosis, fibrosis y disfunción metabólica mediante la activación de las vías p38 y JNK1. Se ha mostrado que la vía ASK1 está activada en biopsias de hígado EHNA humano (Karnik S, The Liver Meeting 2014, Boston, Massachusetts, 7–11 de noviembre, American Association for the Study of Liver Diseases, 2014). Asimismo, en un estudio clínico de seis meses de EHNA
- 10 humano se ha mostrado que el inhibidor de ASK1 selonsertib lleva a una reducción en la etapa de la fibrosis hepática, en la progresión de la cirrosis, en la rigidez hepática y en el contenido de grasa hepática (Loomba et al. The liver meeting 2016, Boston, Massachusetts, 11-15 de noviembre, American Association for the Study of Liver Diseases, 2016).
- 15 El documento WO 2008/016131 divulga inhibidores heterocíclicos de ASK1 condensados para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades inflamatorias. El documento WO 2004/048565 describe un péptido novedoso que exhibe actividad ASK1 que puede ser útil para el tratamiento del cáncer y enfermedades degenerativas. Los documentos WO 2009/123986 y WO
- 20 2009/027283 describen inhibidores de ASK1. El documento WO 2008/075172 divulga derivados de nicotinamida como inhibidores de h-PGDS y su uso para tratar enfermedades mediadas por la prostaglandina D2. El documento WO 2001/39777 divulga compuestos específicos de los receptores de adenosina A₁ A_{2a} y A₃. El documento EP 2058309 divulga compuestos heterocíclicos
- 25 condensados.

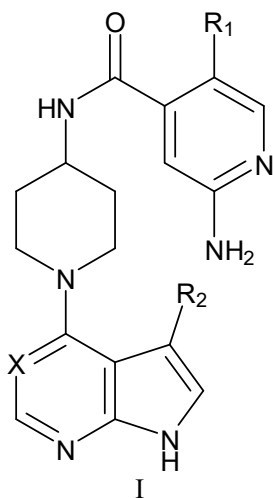
La presente invención describe una serie de derivados de de pirrolopirimidina que son inhibidores de la ASK1 quinasa y que pueden ser útiles en la profilaxis y/o el

tratamiento del dolor, afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o enfermedades fibróticas.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención se basa en la identificación de compuestos novedosos de pirrolopirimidina y pirrolopiridna que pueden ser útiles para la profilaxis y/o el tratamiento del dolor y/o enfermedades fibróticas. En un aspecto particular, los compuestos de la presente son inhibidores de ASK (quinasa reguladora de la señal de apoptosis, por sus siglas en inglés). La presente invención también
- 10 proporciona métodos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y el uso de los compuestos en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, de afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o
- 15 enfermedades fibróticas.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporcionan los compuestos de la invención que tienen la Fórmula I:



20 donde

R^1 es H, CH_3 , F o Cl;

X es N, CH o C-CN; y

R² es CH₃ o halógeno.

En un aspecto particular, los compuestos de la invención pueden exhibir selectividad hacia la familia ASK quinasa, en particular hacia ASK1. En un
5 aspecto particular adicional, los compuestos de la invención pueden mostrar baja actividad sobre otras enzimas quinasa, en particular JAK2. Dicha selectividad puede resultar en la seguridad mejorada del fármaco y/o en la reducción de los riesgos no específicos asociados.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones
10 farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, y un portador, excipiente o diluyente farmacéutico. En un aspecto particular, la composición farmacéutica puede adicionalmente comprender ingredientes activos farmacéuticos adicionales adecuados para usar en combinación con los compuestos de la invención. En un aspecto más particular, el ingrediente
15 terapéuticamente activo adicional es un agente para la profilaxis y/o el tratamiento del dolor y/o enfermedades fibróticas.

Asimismo, los compuestos de la invención, útiles en las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento divulgados en la presente, son farmacéuticamente aceptables en cuanto a la preparación y el uso.

20 En un aspecto adicional de la invención, esta invención proporciona un método para tratar a un mamífero, en particular seres humanos, afectados por una afección seleccionada entre las que se enumeran en la presente, y particularmente el dolor y/o enfermedades fibróticas, método que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o los compuestos
25 de la invención como se describen en la presente.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, y un portador, excipiente o diluyente

farmacéuticamente adecuado para su uso en medicina. En un aspecto particular, la composición farmacéutica es para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor y/o enfermedades fibróticas.

En un aspecto particular, los compuestos de la invención se proporcionan para
5 usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor.

En aspectos adicionales, esta invención proporciona métodos para sintetizar los compuestos de la invención, con protocolos sintéticos representativos y vías que se divulgan a continuación en la presente.

Otros objetos y ventajas se tornarán evidentes a los expertos en la técnica a partir
10 de la consideración de la descripción detallada a continuación.

Se apreciará que los compuestos de la invención pueden ser metabolizados para producir metabolitos biológicamente activos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

15 Se considera que los términos a continuación tienen los significados que se presentan a continuación y son útiles para la comprensión de la descripción y del alcance pretendido por la presente invención.

Quando se describe la invención, que puede incluir compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos y métodos para usar tales
20 compuestos y composiciones, los siguientes términos, si se encuentran presentes, tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. También se deberá comprender que cuando se describe en la presente cualquiera de los restos definidos a continuación se pueden sustituir por una variedad de sustituyentes, y se considera que las respectivas definiciones
25 incluyen tales restos sustituidos dentro de su alcance tal como se establece a continuación. A menos que se indique lo contrario, el término "sustituido" se define como se establece a continuación. Además se deberá entender que,

cuando se usan en la presente, los términos "grupos" y "radicales" se pueden considerar de forma intercambiable.

Los artículos "un", "uno" y "una" se pueden usar en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

"Amino" se refiere al radical -NH_2 .

"Halo" o "halógeno" se refiere a flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) y yodo (I). Los grupos halo particulares son tanto flúor como cloro.

- 10 "Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aprobable por una agencia regulatoria del gobierno Federal de los EE.UU. o un gobierno estatal o la agencia correspondiente en países fuera de los Estados Unidos de América, o que está mencionado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos.
- 15 "Sal farmacéuticamente aceptable " se refiere a una sal o un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. En particular, dichas sales no son tóxicas y pueden ser sales por adición de bases y sales por adición de ácidos inorgánicas y orgánicas. Específicamente, tales sales incluyen: (1) sales por
- 20 adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido
- 25 fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoíl) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 1,2-etan-disulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, ácido

- bencensulfónico, ácido 4-clorobencensulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-ene-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico,
- 5 ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original está reemplazado por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión de alcalinotérreo, o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y
- 10 similares. Las sales además incluyen, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos no-tóxicos orgánicos o inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. La expresión "catión farmacéuticamente
- 15 aceptable" se refiere a un contraión catiónico aceptable de un grupo funcional ácido. Los ejemplos de tales cationes son cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares.
- "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra un compuesto de la invención.
- 20 "Profármaco" se refiere a compuestos, inclusive derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos escindibles y se convierten mediante solvolisis o en condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*. Tales ejemplos incluyen, entre otros, derivados de ésteres de colina y similares, ésteres N-alquilmorfolina y similares.
- 25 "Solvato" se refiere a formas del compuesto que están asociadas con un disolvente, usualmente mediante una reacción de solvolisis. Esta asociación física incluye la unión a hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua,

EtOH, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, en forma cristalina y pueden estar solvatados o hidratados. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, y además incluyen solvatos estequiométricos y solvatos no estequiométricos. En ciertos casos el solvato será capaz de aislación, por ejemplo, cuando una o varias moléculas de disolvente se incorporan en la estructura cristalina del sólido cristalino. "Solvato" abarca solvatos aislables y en fase de solución. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

10 "Sujeto" incluye seres humanos. Los términos "ser humano", "paciente" y "sujeto" se usan de modo intercambiable en la presente.

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

"Prevenir" o "prevención" se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o un trastorno (es decir, hacer que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto a un agente que causa la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes de la aparición de la enfermedad).

El término "profilaxis" está relacionado con "prevención", y se refiere a una medida o procedimiento cuyo propósito es prevenir, en vez de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitativos de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalizados con riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a la inmovilización; y la administración de un agente contra la malaria, tal como

cloroquina, antes de visitar una región geográfica donde la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

"Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a aliviar la enfermedad o el trastorno (es decir, detener la enfermedad o reducir la manifestación, el alcance de la gravedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En otra realización "tratar" o "tratamiento" se refieren a aliviar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por parte del sujeto. En inclusive otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una realización adicional, "tratar" o "tratamiento" se relaciona con ralentizar el progreso de la enfermedad.

Como se usa en la presente, el término "dolor" se refiere a un dolor inflamatorio, un dolor articular crónico particular (por ejemplo, artritis reumatoidea, osteoartritis, espondilitis rematoidea, artritis gotosa (gota) y artritis juvenil) inclusive la propiedad de modificación de la enfermedad y la preservación de la estructura articular; un dolor músculo esquelético; dolor lumbar y de cuello; esguinces y torceduras; dolor neuropático; dolor mantenido por el simpático; miositis; dolor asociado con cáncer y fibromialgia; dolor asociado con migraña; dolor asociado con influenza u otra infección viral, tal como el resfrío común; fiebre reumática; dolor asociado con trastornos intestinales funcionales tales como dispepsia no ulcerosa, dolor de tórax no cardíaco y síndrome de colon irritable; dolor asociado con isquemia de miocardio; dolor postoperatorio; dolor de cabeza; dolor de dientes y dismenorrea. Más particularmente, el término se refiere a dolor articular crónico. Más particularmente, el término se refiere a artritis reumatoidea, osteoartritis y artritis gotosa (gota).

Como se usa en la presente, la expresión "enfermedad(es) cardiovascular(es)" se refiere a enfermedades que afectan el corazón o los vasos sanguíneos o ambos. En particular, la enfermedad cardiovascular incluye arritmia (atrial o ventricular, o ambas); arterosclerosis y sus secuelas; angina; disturbios del ritmo cardíaco; 5 isquemia de miocardio; infarto de miocardio; aneurisma cardíaco o vascular; vasculitis, accidente cerebro vascular; arteriopatía periférica obstructiva de un miembro, un órgano, o un tejido; daño por reperfusión luego de isquemia cerebral, cardíaca, renal o de otro órgano o tejido; estados de shock asociados con un marcado descenso de la presión arterial (por ejemplo, cirugía endotóxica, shock 10 traumático o shock séptico); hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertensión, enfermedad cardíaca valvular, insuficiencia cardíaca, presión sanguínea anormal; shock; vasoconstricción (inclusive la asociada con migrañas); anormalidad vascular, terapia varicosa, insuficiencia limitada a un solo órgano o tejido, insuficiencia venosa orgánica o funcional; hipertrofia cardíaca, fibrosis ventricular 15 y remodelación de miocardio. Más particularmente, el término se refiere a arterosclerosis, hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, hipertrofia cardíaca, fibrosis ventricular y remodelación de miocardio.

Como se usan en la presente, las expresiones "dolor neuropático" o "síndromes 20 que conllevan dolor neuropático" incluyen tanto dolor neuropático central como dolor neuropático periférico a menos que el contexto indique lo contrario, las expresiones incluyen: neuropatía diabética; sciática; dolor lumbar no específico; dolor por esclerosis múltiple; fibromialgia; neuropatía relacionada con VIH; neuralgia post-herpética; neuralgia trigeminal; y dolor resultante de trauma físico, 25 amputación, cáncer, toxinas, neuropatía inducida por quimioterapia o afecciones inflamatorias crónicas. Los síntomas del dolor neuropático incluyen dolor que se dispara espontáneamente o lacerante, o dolor continuado o urente. Además, se

incluye el dolor asociado con sensaciones normalmente no dolorosas tales como "pinchazos" (parestias y disestesias), sensibilidad al tacto aumentada (hiperestesia), sensación de dolor luego de estimulación inocua (alodinia dinámica, estática o térmica), sensibilidad aumentada a estímulos nocivos
 5 (hiperalgesia al calor, al frío o mecánica), sensación continua de dolor después de la eliminación del estímulo (hiperpatía) o ausencia o déficit en las vías sensoriales selectivas (hipoalgesia).

Como se usa en la presente, la expresión "afección(es) inflamatoria(s)" se refiere al grupo de afecciones que incluyen, artritis reumatoidea, osteoartritis, artritis
 10 idiopática juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, afecciones de la piel (por ejemplo, quemaduras de sol, quemaduras, eczema, dermatitis, psoriasis), enfermedades oftálmicas (por ejemplo, glaucoma, retinitis, retinopatías, uveítis y daño agudo del tejido ocular (por ejemplo, conjuntivitis)), trastornos pulmonares (por ejemplo, enfermedad alérgica de las vías aéreas (por ejemplo, asma, rinitis),
 15 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis, enfisema, síndrome de dificultad respiratoria, enfermedad de los criadores de palomas y pulmón de granjero), trastornos del tracto gastrointestinal (por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, úlcera aftosa, gastritis atópica, gastritis varioliforme, enfermedad celíaca, ileítis
 20 regional, síndrome de intestino irritable, enfermedad por reflujo gastrointestinal, diarrea y/o constipación), estados de enfermedad causados por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados endotóxicos crónicos que contribuyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca crónica), trasplante de órganos y otras afecciones con un componente inflamatorio tal como una
 25 enfermedad vascular, esteatohepatitis, migraña, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, esclerodoma, miastenia gravis, esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Bechet,

polimiositis, gingivitis, isquemia de miocardio, pirexia, lupus sistémico eritematoso, polimiositis, tendinitis, bursitis y síndrome de Sjogren. Particularmente, el término se refiere a artritis reumatoidea, osteoartritis, enfermedad alérgica de las vías aéreas (por ejemplo, asma) enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y

5 enfermedades inflamatorias del intestino. Más particularmente, el término se refiere a artritis reumatoidea, osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y enfermedades inflamatorias del intestino.

Como se usa en la presente, el término "asma" se refiere a cualquier trastorno pulmonar caracterizado por variaciones en el flujo de gas pulmonar asociado con

10 la constricción de las vías aéreas de cualquier origen (intrínseco, extrínseco, o ambos; alérgico o no alérgico). El término asma se puede usar con uno o varios adjetivos para indicar la causa.

Como se usa en la presente, la expresión "enfermedades neurodegenerativas" se refiere a las afecciones que resultan de la neurodegeneración o la incluyen,

15 inclusive demencia, demencia particularmente degenerativa (inclusive demencia senil, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ELA y enfermedad neuromotora); demencia vascular (inclusive demencia multiinfarto); como así también demencia asociada con lesiones que ocupan el espacio intracraneal;

20 trauma; infecciones y afecciones relacionadas (inclusive infección por VIH), neuropatías periféricas, esclerosis múltiple, retinopatías, glaucoma, degeneración macular, isquemia cerebral y daño cerebral traumático y deterioro cognoscitivo incipiente asociado con la edad, particularmente el deterioro de la memoria asociado con la edad.

25 Como se usa en la presente, la expresión "complicaciones de la diabetes" se refiere a afecciones asociadas con diabetes Tipo I o Tipo II, estas afecciones incluyen las relacionadas con cambios vasculares o microvasculares, por ejemplo,

retinopatía diabética, microangiopatía diabética, nefropatía diabética (también denominada enfermedad renal diabética (ERD)), degeneración macular, glaucoma, síndrome nefrótico, cardiomiopatía diabética, anemia aplásica, uveítis, enfermedad de Kawasaki y sarcoidosis; como así también trastornos del

5 metabolismo graso que pueden estar asociados con diabetes u obesidad, por ejemplo, esteatosis hepática. Más particularmente, el término se refiere a retinopatía diabética, microangiopatía diabética, nefropatía diabética y esteatosis hepática.

Como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a un crecimiento

10 maligno o benigno de células en la piel o en los órganos del cuerpo, por ejemplo, entre otros, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Un cáncer tiende a infiltrarse en los tejidos adyacentes y diseminarse (metástasis) hacia órganos distantes, por ejemplo, huesos, hígado, pulmón o el cerebro. Como se usa en la presente, el término cáncer incluye tanto los tipos de células

15 tumorales metastásicas (tales como, entre otros, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y mastocitoma) y tipos de carcinoma tisular (tales como, entre otros, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma,

20 cáncer primario de hígado, cáncer de ovario, cáncer de próstata y leiomiomasarcoma uterino). En particular, el término "cáncer" se refiere a leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos

25 (osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno), glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales, tumores de cerebro y médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, cáncer cervical, leucemia linfocítica

crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo de células T, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, cáncer de ojos, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), tumor de células de estroma gastrointestinal, tumor de células germinales, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumores de células insulares (páncreas endócrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma, macroglobulinemia de Waldenstrom, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, mesotelioma, cáncer de boca, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide, mieloma múltiple, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, histiocitoma fibroso óseo maligno, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, papilomatosis, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumores parenquimales de la glándula pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de pituitaria, mieloma múltiple de neoplasia de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de

células renales (riñón), retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salivar, sarcoma, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células

5 escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de testículos, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumor de Wilms. En otra realización particular, el término cáncer se refiere a cáncer de

10 páncreas, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de mama o cáncer de colon. En particular, este se refiere al carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer gástrico, liposarcoma y cánceres provocados por estrés oxidativo, por ejemplo, mielopatía cervical espondilótica.

Como se usa en la presente, la expresión "enfermedades fibróticas" se refiere a

15 enfermedades caracterizadas por excesivas cicatrizaciones debidas a la producción, deposición y contracción de la matriz extracelular en exceso, y aquellas asociadas con la acumulación anormal de células y/o fibronectina y/o colágeno y/o reclutamiento aumentado de fibroblastos e incluyen, entre otras, la fibrosis de órganos o tejidos individuales tales como corazón, riñón, hígado,

20 articulaciones, pulmones, tejido pleural, tejido peritoneal, piel, córnea, retina, tracto músculo-esquelético y digestivo. En particular, el término enfermedades fibróticas se refiere a fibrosis pulmonar idiopática (FPI); fibrosis quística, otras enfermedades pulmonares parenquimales difusas de diferentes etiologías que incluyen fibrosis inducida por fármacos iatrogénicos, fibrosis ocupacional o

25 ambiental inducida, enfermedades granulomatosas (sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad), enfermedad vascular del colágeno, proteinosis alveolar, granulomatosis de células de Langerhans, linfangioleiomiomatosis, enfermedades

- hereditarias (síndrome de Hermansky Pudlak, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis, trastornos de almacenamiento metabólico, enfermedad pulmonar intersticial familiar); fibrosis inducida por radiación; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); escleroderma; fibrosis pulmonar inducida por bleomicina; asma crónico; silicosis; fibrosis pulmonar inducida por asbestos; síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); fibrosis renal; fibrosis túbulointersticial; nefritis glomerular; esclerosis glomerular segmental focal; nefropatía por IgA; hipertensión; síndrome de Alport; fibrosis intestinal; fibrosis hepática; cirrosis; fibrosis hepática inducida por el alcohol; fibrosis hepática inducida por tóxicos/fármacos; hemocromatosis; esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); daño del conducto biliar; cirrosis biliar primaria; fibrosis hepática inducida por infección; fibrosis hepática inducida por virus; y hepatitis autoinmune; cicatrización de la córnea; cicatrización hipertrófica; enfermedad de Dupuytren, queloides, fibrosis cutánea; escleroderma cutáneo; granulomatosis sistémica; enfermedad de Peyronie o enfermedad linfocítica crónica. En una realización particular la enfermedad fibrótica es de un órgano o tejido individual tal como fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o fibrosis renal. En una realización particular, la enfermedad fibrótica se selecciona entre fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad renal diabética (ERD) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).
- "Compuesto(s) de la invención" y expresiones equivalentes, significan que abarcan los compuestos de la(s) Fórmula(s) descripta(s) en la presente, cuya expresión incluye las sales farmacéuticamente aceptables, y los solvatos, por ejemplo, hidratos, y los solvatos de las sales farmacéuticamente aceptables cuando el contexto así lo permite. Igualmente, la referencia a intermediarios, ya sea que se los reivindique o no, significa que abarca sus sales y solvatos, cuando el contexto así lo permite.

Cuando en la presente se hace referencia a rangos, por ejemplo, entre otros, alquilo C₁₋₈, la mención de un rango se deberá considerar una representación de cada elemento de dicho rango.

Otros derivados de los compuestos de esta invención tienen actividad en forma de
5 ácido y de derivados de ácidos, pero en forma sensible al ácido a menudo ofrecen las ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular, o liberación retardada en el organismo de un mamífero.

Como se usa en la presente, la expresión "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o varios
10 de los átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una "variante isotópica" de un compuesto puede contener uno o varios isótopos no radiactivos, tales como por ejemplo, deuterio (²H o D), carbono 13 (¹³C), nitrógeno (¹⁵N), o similares. Se entenderá que, en un compuesto en el que se realiza dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando están presentes, pueden
15 variar, de modo que por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser ²H/D, cualquier carbono puede ser ¹³C, o cualquier nitrógeno puede ser ¹⁵N, y que la presencia o la colocación de tales átomos se puede determinar dentro de la capacitación en la técnica. Igualmente, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radiosótopos, en el caso, por ejemplo, en que los compuestos
20 obtenidos se pueden usar para estudios de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Los isótopos radiactivos del tritio, es decir, ³H, y carbono 14, es decir ¹⁴C, son particularmente útiles para este fin en vista de su fácil incorporación y los fáciles medios de detección. Además, se pueden preparar compuestos que están sustituidos con isótopos emisores de positrones, tales como ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O y ¹³N, y
25 resultarían útiles en los estudios de Topografía por Emisión de Positrones (PET, por sus siglas en inglés) para examinar la ocupación del sustrato del receptor.

A menos que se indique lo contrario, se considera que la descripción o la denominación de un compuesto particular en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluye los enantiómeros individuales y sus mezclas, racémicas o de otra naturaleza. Los métodos para determinar la estereoquímica y la separación de estereoisómeros son ampliamente conocidos en la técnica.

Se apreciará que los compuestos de la invención pueden ser metabolizados para producir metabolitos biológicamente activos.

FIGURAS

La Figura 1 muestra el efecto del Compuesto 1 en dos dosis diferentes administradas por vía oral en hiperalgesia inducida por CFA (adyuvante completo de Freund) en el modelo de rata del Ejemplo 3.1.

La Figura 2 muestra el efecto del Compuesto 1 con una dosis de 10 mg/kg administrada por vía oral en hiperalgesia inducida por AIM (actividad inhibidora del melanoma) en el modelo de rata del Ejemplo 3.2.

La Figura 3 muestra el efecto del Compuesto 1 con una dosis de 5 mg/kg/QD, 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID en los niveles de expresión de un panel de genes relacionados con fibrosis en muestras de hígado de ratón del modelo CFAHFD de fibrosis (Ejemplo 3.10). Figura 3A: PAI1, Figura 3B: TIMP1, Figura 3C: COL1A1, Figura 3D: CTGF, Figura 3E: ACTA2 y Figura 3F: Los datos de TGF β son del día 73 y están presentados como la media $\pm$ ESM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$ vs CDAHFD dieta + vehículo, prueba de Mann-Whitney.

La Figura 4 muestra el efecto del Compuesto 1 con una dosis de 5 mg/kg/QD, 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID en los niveles de expresión de un panel de genes relacionados con inflamación en muestras de hígado de ratón del modelo CFAHFD de fibrosis (Ejemplo 3.10). Figura 4A: TNF α , Figura 4B: IL10, y Figura 4C: CCL2. Los datos son del día 73 y están presentados como la media $\pm$ ESM, *

p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, ****P<0,0001 vs CDAHFD dieta + vehículo, prueba de Mann-Whitney.

La Figura 5 muestra el efecto del Compuesto 1 con una dosis de 5 mg/kg/QD, 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID sobre los niveles de hidroxiprolina del tejido de hígado de ratón del modelo CFAHFD de fibrosis (Ejemplo 3.10). Los datos son del día 73 y están presentados como la media $\pm$ ESM, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, ****P<0,0001 vs CDAHFD dieta + vehículo, prueba de Mann-Whitney.

La Figura 6 muestra el efecto del Compuesto 1 con una dosis de 5 mg/kg/QD, 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID usando la cuantificación de fibrosis con rojo Sirio del modelo CFAHFD de fibrosis (Ejemplo 3.10). Los datos son del día 73 y están presentados como la media $\pm$ ESM, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, ****P<0,0001 vs CDAHFD dieta + vehículo, prueba de Mann-Whitney.

La Figura 7 muestra el efecto del Compuesto 1 con una dosis de 5 mg/kg/QD, 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID sobre la cuantificación F4/80 del modelo CFAHFD de fibrosis (Ejemplo 3.10). Los datos son del día 73 y están presentados como la media $\pm$ ESM, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, ****P<0,0001 vs CDAHFD dieta + vehículo, prueba de Mann-Whitney.

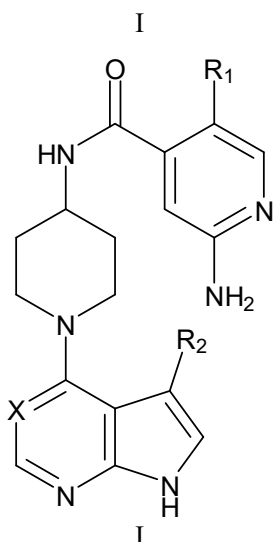
LA INVENCION

La presente invención se basa en la identificación de novedosos compuestos de pirrolopirimidina y pirrolopiridina que pueden ser útiles para la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o las enfermedades fibróticas. En un aspecto particular, los compuestos de la presente son inhibidores de ASK (quinasa reguladora de la señal de apoptosis, por sus siglas en inglés).

La presente invención también proporciona métodos para la producción de estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y

métodos para tratar el dolor, afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, cáncer y/o enfermedades fibróticas mediante la administración de los compuestos de la invención.

- 5 Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporcionan los compuestos de la invención que tienen la Fórmula I:



10

donde

R^1 es H, CH_3 , F o Cl;

X es N, CH o C-CN; y

R^2 es CH_3 o halógeno.

- 15 En una realización R^1 es F.

En una realización R^1 es F y R^2 es CH_3 .

En una realización, X es CH. En una realización alternativa X es C-CN. En una realización alternativa X es N.

En una realización, X es N y R^1 es F. En una realización particular, X es N, R^1 es

- 20 F y R^2 es CH_3 . En una realización adicional, R^2 es CH_3 o Cl. En incluso otra realización adicional, R^2 es CH_3 .

En una realización, un compuesto de la invención se selecciona entre:

- 2-amino-5-fluoro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (Compuesto 1),
- 2-amino-5-metil-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (Compuesto 2),
- 2-amino-5-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (Compuesto 3),
- 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (Compuesto 4),
- 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoropiridin-4-carboxamida (Compuesto 5),
- 2-amino-N-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoropiridin-4-carboxamida (Compuesto 6), y
- 2-amino-N-[1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoropiridin-4-carboxamida (Compuesto 7).

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

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descriptas en esta solicitud está presente como la base libre.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descriptas en esta solicitud es una sal farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descriptas en esta solicitud es un solvato del compuesto.

En un aspecto, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descriptas en esta solicitud es un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto.

En una realización específica, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente exhibe una actividad mejorada en un ensayo celular *in vitro* para determinar la actividad ASK1 en comparación con compuestos de estructura similar. En una realización particular, un compuesto de la invención exhibe una actividad mejorada en el ensayo celular para determinar la actividad ASK1 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) como se describe en la presente en el Ejemplo 2.3.

En una realización alternativa, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente puede mostrar una inducción reducida de la actividad Cyp. En particular, un compuesto de la invención puede mostrar una inducción disminuida de la actividad Cyp3A4 en comparación con compuestos de estructura similar.

En una realización alternativa, un compuesto de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente puede mostrar una inhibición disminuida de la actividad Cyp. En particular, un compuesto de la invención puede mostrar una inhibición disminuida de la actividad Cyp3A4 en comparación con compuestos de estructura similar. Más particularmente, un compuesto de la invención puede mostrar una CI_{50} para la inhibición Cyp de $> 10\mu M$.

Si bien anteriormente se han enumerado grupos específicos para cada realización en forma separada, un compuesto de la invención incluye uno en el que varias o cada una de las realizaciones en la Fórmula precedente, como así también otras fórmulas presentadas en esta solicitud, se seleccionan de uno o varios de los elementos particulares o los grupos respectivamente designados, para cada variable. Por lo tanto, se considera que esta invención incluye dentro de su alcance todas las combinaciones de tales realizaciones.

Si bien anteriormente se han enumerado en forma general grupos específicos para cada realización en forma separada, un compuesto de la invención puede

ser uno en el que una o más variables (por ejemplo, grupos R) se seleccionan entre una o más realizaciones de acuerdo con cualquiera de la(s) Fórmula(s) mencionadas anteriormente. Por lo tanto, se considera que la presente invención incluye dentro de su alcance todas las combinaciones de variables de cualquiera de las realizaciones divulgadas.

Alternativamente, también está contemplada en la presente invención la exclusión de una o varias de las variables especificadas de un grupo o una realización, o sus combinaciones.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona profármacos y derivados de los compuestos de acuerdo con las fórmulas descritas. Profármacos son derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos metabólicamente escindibles y se convierten mediante solvolisis o en condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos, *in vivo*. Tales ejemplos incluyen, entre otros, derivados de ésteres de colina y similares, ésteres N-alquilmorfolina y similares.

Otros derivados de los compuestos de esta invención tienen actividad en forma de ácido y de derivados de ácidos, pero en forma sensible al ácido a menudo ofrecen las ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular, o liberación retardada en el organismo de un mamífero (Bundgaard, 1985). Los profármacos incluyen los derivados de ácidos que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, ésteres preparados mediante la reacción del ácido original con un alcohol adecuado, o amidas preparadas mediante la reacción de compuesto del ácido original con una amina sustituida o sin sustituir, o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Los ésteres, las amidas y los anhídridos simples alifáticos o aromáticos derivados de grupos ácidos pendientes de los compuestos de esta invención son profármacos preferidos. En algunos casos es deseable preparar profármacos del tipo ésteres dobles tales como

ésteres (aciloxi) alquilo o ésteres ((alcoxycarbonil)oxi)alquilo. Resultan particularmente útiles los alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, arilo, arilo C₇-C₁₂ sustituido, y arilalquil ésteres C₇-C₁₂ de los compuestos de la invención.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 5 Cuando se emplea como un compuesto farmacéutico, un compuesto de la invención generalmente se administra en la forma de una composición farmacéutica. Tales composiciones se pueden preparar en una forma ampliamente conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I. Generalmente, un
- 10 compuesto de la invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Generalmente, la cantidad del compuesto de la invención realmente administrada será determinada por un médico, según las circunstancias pertinentes, que incluyen la afección a ser tratada, la ruta de administración elegida, el compuesto de la invención administrado, la edad, el peso y la
- 15 respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, etc. Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por una variedad de vías que incluyen las vías oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intra-articular, intravenosa, intramuscular e intranasal. Según la vía de administración elegida, un compuesto de la invención se formula preferentemente
- 20 como composiciones inyectables u orales o como pomadas, lociones o parches, todos ellos para administración transdérmica.

- Las composiciones para administración oral pueden tener la forma de soluciones o suspensiones líquidas a granel o polvos a granel. Sin embargo, más comúnmente, las composiciones se presentan como formas de dosificación
- 25 unitaria para facilitar la dosificación precisa. La expresión "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una

cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, asociada con un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringas previamente medidas y llenadas de las composiciones
5 líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas u otras similares en el caso de las composiciones sólidas. En tales composiciones, el compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I es usualmente un componente menor (entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50% en peso o preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 40% en peso) estando el resto
10 constituido por diversos vehículos o portadores y auxiliares de procesamiento para crear la forma de dosificación deseada.

Las formas líquidas adecuadas para administración oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispensantes, colorantes, saborizantes y otros similares. Las formas sólidas
15 pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes o compuesto de las invenciones de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente de
20 deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como saborizante de menta o naranja.

Las composiciones inyectables se basan generalmente en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros portadores inyectables
25 conocidos en la técnica. Como se mencionó anteriormente, el compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I en tales composiciones es generalmente un componente menor, a menudo entre aproximadamente 0,05 y

10% en peso, estando el resto constituido por el portador inyectable y otros similares.

Las composiciones transdérmicas generalmente están formuladas como ungüentos tópicos o cremas que contienen el o los ingredientes activos, generalmente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 20% en peso, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20% en peso, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10% en peso, y más preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 15% en peso. Cuando se formulan como un ungüento, los ingredientes activos generalmente estarán combinados con una base de ungüento parafínica o miscible con agua. Alternativamente, los ingredientes activos se pueden formular como una crema, por ejemplo, con una base de crema de aceite en agua. Tales formulaciones transdérmicas son muy conocidas en la técnica y generalmente incluyen ingredientes adicionales para aumentar la penetración dérmica o la estabilidad de los ingredientes activos de la formulación. Dentro del alcance de esta invención se incluye la totalidad de tales formulaciones e ingredientes transdérmicos conocidos.

Un compuesto de la invención también se puede administrar mediante un dispositivo transdérmico. Por consiguiente, la administración transdérmica se puede realizar usando un parche tanto del tipo reservorio o membrana porosa, o de una variedad de matriz sólida.

Los componentes descritos anteriormente para composiciones de administración oral, inyectable o tópica son meramente representativos. Otros materiales como así también otras técnicas de procesamiento y similares se establecen en la Parte 8 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ma. edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, que se incorpora a la presente a modo de referencia.

Un compuesto de la invención también se puede administrar en formas de liberación sostenida o mediante sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. En Remington's Pharmaceutical Sciences se puede hallar una descripción de materiales de liberación sostenida representativos.

- 5 Los siguientes ejemplos de formulación ilustran las composiciones farmacéuticas representativas que se pueden preparar de acuerdo con esta invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada por las composiciones farmacéuticas que siguen a continuación.

Formulación 1 - Comprimidos

- 10 Un comprimido de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una proporción en peso de aproximadamente 1:2. Se puede agregar como lubricante una cantidad menor de estearato de magnesio. La mezcla se puede formar en comprimidos de 240-270 mg (80-90 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la
- 15 Fórmula I por comprimido) en una prensa para comprimidos.

Formulación 2 - Cápsulas

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

Formulación 3 - Líquido

- Un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I (125 mg), se puede mezclar con sacarosa (1,75 g) y goma xantana (4 mg) y la mezcla obtenida se
- 25 puede combinar, pasarla por una malla Nro. 10 (serie de tamices normalizados de los EE.UU.), y luego mezclarla con una solución previamente preparada de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa sódica (11:89, 50 mg) en agua. Se

pueden diluir con agua benzoato de sodio (10 mg), saborizante y colorante y agregarlos con agitación. Luego se puede agregar suficiente agua con agitación. Luego se puede agregar suficiente agua adicional para producir un volumen total de 5 mL.

5

Formulación 4 - Comprimidos

Un comprimido de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede mezclar como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una proporción en peso de aproximadamente 1:2. Se puede agregar como lubricante una cantidad menor de estearato de magnesio. La mezcla se puede formar en comprimidos de 10 450-900 mg (150-300 mg de compuesto activo de la invención de acuerdo con la Fórmula I) en una prensa para comprimidos.

Formulación 5 - Inyección

Un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I se puede disolver o suspender en un medio acuoso inyectable de solución salina estéril tamponada 15 hasta una concentración de aproximadamente 5 mg/mL.

Formulación 6 - Tópica

Se pueden fundir alcohol estearilo (250 g) y un petrolato blanco (250 g) a aproximadamente 75°C y luego se puede agregar una mezcla de un compuesto de la invención de acuerdo con la Fórmula I (50 g) metilparabeno (0,25 g), 20 propilparabeno (0,15 g), lauril sulfato de sodio (10 g), y propilenglicol (120 g) disueltos en agua (aproximadamente 370 g) y la mezcla obtenida se puede agitar hasta congelamiento.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la 25 invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en medicina. En una realización particular, la presente invención proporciona compuestos de la invención o composiciones

farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, de afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o enfermedades
5 fibróticas.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, de afecciones inflamatorias, enfermedades
10 cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o enfermedades fibróticas.

En una realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, y otro agente
15 terapéutico. En una realización particular, el otro agente terapéutico es un agente para la profilaxis y/o el tratamiento del dolor, de afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o enfermedades fibróticas.

20 En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento del dolor, de afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, el cáncer y/o enfermedades fibróticas, donde dichos métodos comprenden la administración de
25 una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descriptas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por dolor, afecciones inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, complicaciones de la diabetes, 5 cáncer y/o enfermedades fibróticas, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la 10 invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor. En una realización particular, el dolor se selecciona entre el dolor articular crónico. En una realización específica el dolor articular crónico es el dolor de osteoartritis, artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa (gota) y/o artritis juvenil.

15 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor. En una realización particular, el dolor se selecciona entre el dolor articular crónico. En una realización específica el dolor 20 articular crónico es el dolor de osteoartritis, artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa (gota) y/o artritis juvenil.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por dolor, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un 25 compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una realización particular, el dolor se selecciona entre el dolor articular crónico.

En una realización específica el dolor articular crónico es el dolor de osteoartritis, artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa (gota) y/o artritis juvenil.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la

5 invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias. En una realización particular, la afección inflamatoria se selecciona entre artritis reumatoidea, osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades inflamatorias intestinales. Más particularmente, la afección

10 inflamatoria es osteoartritis.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor de afecciones inflamatorias. En una

15 realización particular, la afección inflamatoria se selecciona entre artritis reumatoidea, osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades inflamatorias intestinales. Más particularmente, la afección inflamatoria es osteoartritis.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona

20 métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por afecciones inflamatorias, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descriptas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha afección. En una realización particular, la afección inflamatoria

25 se selecciona entre artritis reumatoidea, osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades inflamatorias intestinales. Más particularmente, la afección inflamatoria es osteoartritis.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En una realización particular, la enfermedad cardiovascular se selecciona entre arterosclerosis, hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, hipertrofia cardíaca, fibrosis ventricular y remodelación de miocardio.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En una realización particular, la enfermedad cardiovascular se selecciona entre arterosclerosis, hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, hipertrofia cardíaca, fibrosis ventricular y remodelación de miocardio.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por una enfermedad cardiovascular, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descriptas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha enfermedad. En una realización particular, la enfermedad cardiovascular se selecciona entre arterosclerosis, hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, hipertrofia cardíaca, fibrosis ventricular y remodelación de miocardio.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En una realización particular, la enfermedad

neurodegenerativa se selecciona entre demencia degenerativa, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y retinopatías.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En una realización particular, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre demencia degenerativa, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y retinopatías.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por una enfermedad neurodegenerativa, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha enfermedad. En una realización particular, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre demencia degenerativa, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y retinopatías.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades neurológicas. En una realización particular, la enfermedad neurológica se selecciona entre dolor neuropático, demencia, esclerosis múltiple y retinopatías.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades neurológicas. En una realización

particular, la enfermedad neurológica se selecciona entre dolor neuropático, demencia, esclerosis múltiple y retinopatías.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por una enfermedad neurológica, donde dichos métodos comprenden la administración de una
5 cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha enfermedad. En una realización particular, la enfermedad neurológica se selecciona entre dolor neuropático, demencia, esclerosis múltiple y
10 retinopatías.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de complicaciones de la diabetes. En una realización particular, la complicación se selecciona entre
15 retinopatía diabética, microangiopatía diabética, nefropatía diabética y esteatosis hepática.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la
20 profilaxis y/o el tratamiento de las complicaciones de la diabetes. En una realización particular, la complicación se selecciona entre retinopatía diabética, microangiopatía diabética, nefropatía diabética y esteatosis hepática.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por complicaciones de la diabetes, donde dichos métodos comprenden la administración de una
25 cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente para el tratamiento o la

profilaxis de dicha complicación. En una realización particular, la complicación se selecciona entre retinopatía diabética, microangiopatía diabética, nefropatía diabética y esteatosis hepática.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la
5 invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la
10 profilaxis y/o el tratamiento del cáncer.

En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por cáncer, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas
15 descritas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicho cáncer.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades fibróticas.

En una realización particular la enfermedad fibrótica es de un órgano o tejido
20 individual tal como fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o fibrosis renal. En una realización particular, la enfermedad fibrótica se selecciona entre fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad renal diabética (ERD) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos de la invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la
25 invención, para usar en la elaboración de un medicamento para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades fibróticas. En una realización

particular la enfermedad fibrótica es de un órgano o tejido individual tal como fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o fibrosis renal. En una realización particular, la enfermedad fibrótica se selecciona entre fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad renal diabética (ERD) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

- 5 En aspectos adicionales de métodos de tratamiento, esta invención proporciona métodos de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero afligido por una enfermedad fibrótica, donde dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una o varias de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente para el tratamiento o la profilaxis de dicha
- 10 enfermedad. En una realización particular la enfermedad fibrótica es de un órgano o tejido individual tal como fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o fibrosis renal. En una realización particular, la enfermedad fibrótica se selecciona entre fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad renal diabética (ERD) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).
- 15 Los niveles de las dosis de inyección están comprendidos entre aproximadamente 0,1 mg/kg/h y al menos 10 mg/kg/h, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 120 h y especialmente 24 a 96 h. También se puede administrar un bolo de carga previa de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o más para lograr niveles adecuados de estado
- 20 estable. Es de esperar que la dosis máxima total no exceda aproximadamente 1 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

Para la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones de largo plazo, tales como afecciones degenerativas, el régimen de tratamiento generalmente se extiende a lo largo de varios meses o años, por lo tanto, es preferible la dosificación oral para

- 25 la comodidad y tolerancia del paciente. Regímenes representativos de dosificación oral son una a cuatro (1-4) dosis regulares diarias, especialmente una a tres (1-3) dosis regulares diarias, y más generalmente una (1) dosis regular

diaria. Alternativamente, los regímenes representativos para fármacos con efectos de larga duración, con dosificaciones orales, son semana de por medio, una vez por semana y una vez al día. En particular, el régimen de dosificación puede ser cada 1-14 días, más particularmente 1-10 días, incluso más particularmente 1-7 días, y con la mayor particularidad 1-3 días.

Utilizando estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1.000 mg de un compuesto de la invención, con dosis particulares que proporcionan cada una entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500 mg y especialmente aproximadamente 30 y aproximadamente 250 mg.

Las dosis transdérmicas generalmente se seleccionan para proporcionar niveles en sangre similares o menores a los que se logran usando dosis inyectables.

Cuando se usa para evitar la aparición de una afección, un compuesto de la invención se administrará a un paciente en riesgo de desarrollar la afección, generalmente por el consejo y bajo la supervisión de un médico, con los niveles de dosificación descritos anteriormente. Los pacientes en riesgo de desarrollar una afección particular generalmente incluyen aquellos que tienen una historia familiar de la afección, o aquellos que han sido identificados mediante pruebas genéticas o detección como particularmente susceptibles a desarrollar la afección.

Un compuesto de la invención se puede administrar como el agente activo solamente o se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo otros compuestos de la invención que demuestran la misma actividad terapéutica u otra similar y de los que se determinó que son seguros y eficaces para dicha administración combinada. En una realización específica, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite utilizar dosis significativamente menores de cada uno, reduciendo por lo tanto los efectos secundarios observados.

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

- 5 En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de una afección inflamatoria, los agentes particulares incluyen, entre otros, agente inmunoreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticosteroides (por ejemplo, prednisolona o dexametasona), ciclofosfamida, ciclosporina A, tacrolimús, micofenolato, mofetilo, muromonab-CD3 (OKT3, por ejemplo, Orthocolone®),
10 ATG, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam.

- En una realización, un compuesto de la invención se administra conjuntamente con otro agente terapéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de la artritis (por ejemplo, artritis reumatoidea), los agentes particulares incluyen, entre otros,
15 analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), esteroides, fármacos sintéticos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), (por ejemplo, entre otros, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, auranofina, aurotiomalato sódico, penicilamina, cloroquina, hidroxicloroquina, azatioprina, tofacitinib, baricitinib, fostamatinib y ciclosporina), y FARME biológicos (por
20 ejemplo, entre otros, infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab y abatacept).

- Por administración conjunta se incluye cualquier medio de administración de dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, como se tornará evidente al experto en la técnica. Si bien los dos o más agentes se pueden administrar simultáneamente en una sola formulación, es
25 decir como una sola composición farmacéutica, esto no es esencial. Los agentes se pueden administrar en diferentes formulaciones y en diferentes momentos.

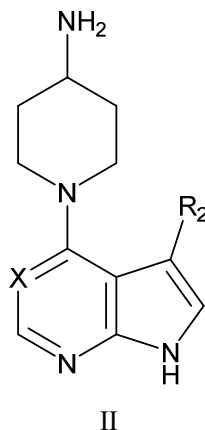
Procedimientos químicos sintéticos.

General

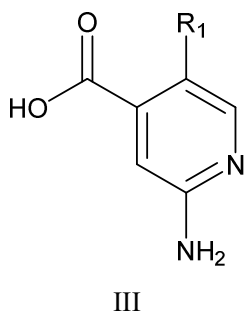
De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un proceso para preparar los compuestos de la Fórmula I. Los esquemas de la presente son ejemplos de esquemas sintéticos que se pueden usar para sintetizar los compuestos de la invención. En los esquemas de la presente, los grupos reactivos se pueden proteger con grupos protectores y desprotectores de acuerdo con técnicas ya bien establecidas.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de Fórmula I como se definió en la presente que comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de Fórmula II:



donde X y R₂ son como se definió en la presente, con un compuesto de Fórmula III:



o un derivado protegido de este, donde R¹ es como se definió en la presente;

(b) desproteger un derivado protegido de un compuesto de Fórmula I;

- (c) interconversión de un compuesto de Fórmula I o un derivado protegido de este en un compuesto adicional de Fórmula I o un derivado protegido de este; y
- (d) formación opcional de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I.

- 5 Los compuestos de las fórmulas II y III se pueden preparar de acuerdo con procedimientos descritos en la presente en los Esquemas 1A, 1B, 1C y los procedimientos para preparar los Compuestos 1 a 7.

- El compuesto de la invención se puede preparar con materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos
- 10 generales. Se apreciará que cuando se brindan condiciones de procedimiento típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, períodos, proporciones molares de los reactivos, disolventes, presiones, etc.), a menos que se indique lo contrario, también se pueden usar otras condiciones de procedimiento. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o
- 15 disolventes utilizados, pero tales condiciones las puede determinar un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización de rutina.

- Además, como se tornará evidente para los expertos en la técnica, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para evitar que ciertos grupos funcionales pasen por reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector
- 20 adecuado para un grupo funcional como así también las condiciones adecuadas para la protección y desprotección son ampliamente conocidas en la técnica.

- Los métodos a continuación se presentan con los detalles para la preparación de un compuesto de la invención como se definió anteriormente y los ejemplos comparativos. Un compuesto de la invención puede ser preparado por un experto
- 25 en la técnica de la síntesis orgánica con materiales de partida y reactivos conocidos y disponibles comercialmente.

Todos los reactivos son de grado comercial y se utilizan como se reciben sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. Para las reacciones realizadas en atmósfera inerte se utilizan disolventes anhidro disponibles en el comercio. En todos los casos restantes se utilizan disolventes de grado reactivo, a menos que se especifique lo contrario. La cromatografía en columna se realiza en gel de sílice 60 (35-70 μm). La cromatografía de capa fina se realiza usando placas 60F-254 previamente recubiertas con gel de sílice (0,25 mm de espesor). Los espectros de RMN se registran en espectrómetro Bruker DPX 300 MHz equipado con una sonda BBI 5 mm, Bruker AV400 MHz equipado con una sonda PABBO 5 mm, Bruker DRX 500 MHz equipado con una sonda PABBI 5 mm y Bruker Avance III 600 equipado con una sonda RT BBI de 5 mm. A menos que se indique lo contrario, las muestras se registran a 25°C usando como disolvente DMSO- d_6 o CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) para espectros ^1H NMR se informan en partes por millón (ppm) en relación con tetrametilsilano (δ 0,00) como referencia interna.

Los espectros MS por electroaspersión se obtuvieron en equipos UPLC (cromatografía líquida de ultra-alta resolución, por sus siglas en inglés) Waters Acquity con detector PDA Waters Acquity y espectrómetro de masas SQD (cuadrupolo simple, por sus siglas en inglés). Columnas utilizadas: UPLC BEH C18 1,7 μm , pre-columna VanGuard 2,1x5mm con Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , columna 2,1x50mm o Acquity UPLC CSH C18 1,7 μm , columna 2,1x50mm. En todos los métodos se usan gradientes MeCN/ H_2O . MeCN y H_2O contiene ácido fórmico 0,1% o NH_4HCO_3 10mM.

Para la purificación preparativa se usó el sistema de autopurificación dirigida HPLC Waters Mass. El sistema está compuesto por el administrador de muestras Waters 2767, el sistema organizador de fluidos Waters, el módulo de gradiente binario Waters 2545, la bomba HPLC Waters 515, el detector de matriz de

- fotodiodos Waters 2998 y el detector de MS Micromass ZQ Waters. Programas informáticos utilizados: FractionLynx y MassLynx v4.1. Parámetros generales el método HPLC: fase de gradiente móvil de ácido fórmico 0,1% en H₂O y MeCN o 10mM NH₄HCO₃ pH=10 y MeCN. Columna XBridge 30x150mm, 5µm.
- 5 Configuración del detector PDA: longitud de onda: 210-400 nm, resolución: 1,2 nm, velocidad de muestreo: 1,0 puntos/segundo, respuesta del filtro: 1. El calentamiento por microondas se realiza con un iniciador Biotage.

Lista de abreviaturas usadas en la sección de experimentos:

Abreviatura	Definición
µL	microlitro
AUC	Área bajo la curva
BAL	Lavado broncoalveolar
BALF	Fluido del lavado broncoalveolar
BINAP	2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno
br. d	Doblete amplio
Boc	tert-butiloxi-carbonilo
br. s	Singlete amplio
BSA	Albúmina de suero bovino
br. t	Triplete amplio
Cat.	Cantidad catalítica
cDNA	ácido desoxirribonucleico copia
Cpd	Compuesto
d	doblete
DavePhos	2-Diciclohexilfosfino-2'-(N,N-dimetilamino)bifenilo
DCM	Diclorometano
DEAD	dietil azodicarboxilato

Abreviatura	Definición
DIPE	Diisopropiléter
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMA	Dimetilacetamida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DME	Dimetoxietano
DMF	N,N-dimetilformamida
DMPU	1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona
DMSO	Dimetilsulfóxido
dppf	1,1'- Bis(difenilfosfino)ferroceno
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)
EDC.HCl	Clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
eq.	Equivalente
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOAc	Acetato etílico
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	gramo
h	hora
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HRP	peroxidasa de rábano
Int	Intermediario

Abreviatura	Definición
JohnPhos	(2-Bifenil)di- <i>tert</i> -butilfosfina
kg	kilogramo
L	litro
LCMS	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas
LDA	Diisopropilamida de litio
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de litio
m	multiplete
m-CPBA	Ácido 3-cloroperbenzoico
MeCN	Acetonitrilo
MEK	Metil etil cetona
MeOH	Metanol
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mmol	milimoles
MMP	Metaloproteinasa de matriz
Ms'd	Masa medida mediante LC-MS
Mtd	Método
MW	Peso molecular
N.A.	No disponible
nBuOH	n-butanol
Nva	Norvalina
RMN	Resonancia magnética nuclear
PBF	formalina tamponada con fosfato
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Abreviatura	Definición
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
Pd/C	Paladio sobre carbón 10%
$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Tris(dibencilidenoacetona) dipaladio(0)
PdCl_2dppf	[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II)
$\text{PdCl}_2[\text{P}(\text{o-Tol})_3]_2$	Diclorobis(tri- <i>o</i> -tolilfosfina)paladio(II)
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	Acetato de paladio(II)
PEG	Polietilenglicol
PEPPSI™-IPr	dicloruro de [1,3-Bis(2,6-Diisopropilfenil)imidazol-2-ilideno](3-cloropiridil)paladio(II)
ppm	partes por millón
q	cuadruplete
QrtPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
QTL	locus de carácter cuantitativo
r.t.	temperatura ambiente
RNA	Ácido ribonucleico
Rt	tiempo de retención
RuPhos	2-Diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenilo
s	singlete
sept	septuplete
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SM	Material de partida
Ster	Estereoquímica
t	triplete
TBAF	Fluoruro de Tetra- <i>n</i> -butilamonio
t-BuOH	Tert-butanol

Abreviatura	Definición
TBDPSCI	Cloruro de tert-butildifenilsililo

HPLC automática de masa dirigida

Cuando resultó aplicable, la purificación mediante HPLC automática de masa dirigida se llevó a cabo usando los siguientes aparatos y condiciones:

- 5 Hardware:
 - Módulo de gradiente binario Waters 2525.
 - Bomba de reposición Waters 515
 - Módulo de control de bomba Waters
 - Colector inyector Waters 2767
- 10
 - Administrador de fluidos en columna Waters
 - Detector de matriz de fotodiodos Waters 2996
 - Espectrómetro de masas Waters ZQ
 - Recolector de fracciones Gilson 202
 - Recolector de residuos Gilson Aspec
- 15 Software: Waters MassLynx versión 4 SP2

Columna: las columnas usadas fueron Waters Atlantis, cuyas dimensiones son 19mm x 100mm (pequeña escala) y 30mm x 100mm (gran escala). El tamaño de partícula de la fase estacionaria es 5m m.
- 20 **Método ácido:**

Disolventes:

 - A: Disolvente acuoso = Agua + Ácido Fórmico 0,1%
 - B: Disolvente orgánico = Acetonitrilo + Ácido Fórmico 0,1%
 - Disolvente de reposición = Metanol : Agua 80:20
- 25 Disolvente para limpieza de aguja = Metanol

Métodos:

Existieron cinco métodos utilizados según el tiempo de retención analítica del compuesto de interés: Cada uno tuvo un ciclo de 13,5 minutos, que comprendía un gradiente de 10 minutos seguido de un lavado de columna de 3,5 minutos y un

5 paso de reequilibrado.

Grande/Pequeña Escala 1,0-1,5 (HPLC), 0,4-0,6 (UPLC) = 5-30% B

Grande/Pequeña Escala 1,5-2,2 (HPLC), 0,6-0,9 (UPLC) = 15-55% B

Grande/Pequeña Escala 2,2-2,9 (HPLC), 0,9-1,2 (UPLC) = 30-85% B

Grande/Pequeña Escala 2,9-3,6 (HPLC), 1,2-1,4 (UPLC) = 50-99% B

10 Grande/Pequeña Escala 3,6-5,0 (HPLC), 1,4-2,0 (UPLC) = 80-99% B (en 6 minutos seguido de 7,5 minutos de lavado y re-equilibrado)

Caudal: todos los métodos mencionados tienen un caudal de 20mL/min (pequeña escala) o 40mL/min (gran escala).

15 **Método con pH alto:**

Columna: el análisis HPLC se realizó en una columna XBridge C18 (100nm x 19nm i.d. diámetro de la empaquetadura 5µm) a temperatura ambiente

Disolventes:

A: Bicarbonato de amonio 10 mM en agua, ajustado a pH 10 con solución de

20 amonio.

B: Acetonitrilo.

Métodos:

Existieron cinco métodos utilizados según el tiempo de retención analítica del compuesto de interés: Tuvieron un ciclo de 13,5 minutos, que comprendía un

25 gradiente de 10 minutos seguido de un lavado de columna de 5 minutos y un paso de reequilibrado.

Grande/Pequeña Escala 1,0-1,5 (HPLC), 0,4-0,6 (UPLC) = 1-30% B

Grande/Pequeña Escala 1,5-2,2 (HPLC), 0,6-0,9 (UPLC) = 15-55% B

Grande/Pequeña Escala 2,2-2,9 (HPLC), 0,9-1,2 (UPLC) = 30-85% B

Grande/Pequeña Escala 2,9-3,6 (HPLC), 1,2-1,4 (UPLC) = 50-99% B

- 5 Grande/Pequeña Escala 3,6-5,0 (HPLC), 1,4-2,0 (UPLC) = 80-99% B (en 6 minutos seguido de 7,5 minutos de lavado y re-equilibrado)

Caudal: todos los métodos mencionados tienen un caudal de 20ml/min (pequeña escala) o 40ml/min (gran escala).

Cromatografía líquida / Espectrometría de masas

- 10 El análisis de los Ejemplos anteriores mediante cromatografía líquida / espectrometría de masas (LC/MS) se realizó usando los aparatos y las condiciones indicadas en los métodos que se muestran a continuación

Cromatografía líquida:

- 15 Descripción del método: UPLC analítica genérica LC/MS de acceso abierto con ácido fórmico

Método de 2 minutos

Sistema LC/MS: Acquity UPLC acoplada con espectrómetro de masas SQD

Condiciones de LC

- 20 Columna: Acquity UPLC BEH C18 (50mm x 2,1mm i.d., diámetro empaquetadura 1,7µm)

Temperatura de columna: 40° C

Disolventes: A = solución de ácido fórmico en agua 0,1 % v/v

B = solución de ácido fórmico en acetonitrilo 0,1% v/v

- 25 Volumen de inyección: 2 µl

La tabla de gradiente:

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	%A	%B
--------------	-----------------	----	----

0	0,9	97	3
1,5	0,9	0	100
1,9	0,9	0	100
2,0	0,05	97	3

Tiempo de detención: 2 min

Condiciones UV

Rango PDA: 210 nm-350 nm

La detección UV fue una señal suma de longitudes de onda de 210 nm a 350 nm.

- 5 Velocidad de adquisición: 40 Hz

Condiciones MS

Modo ionización: Alternado - electroaspersión barrido positivo y negativo (ES^+/ES^-)

Rango de barrido: 100 a 1000 AMU

- 10 Tiempo de barrido: 0,15

Retardo entre barridos:

inter-scanan MS : 0,02 segundos

Cambio polaridad/modo entre barridos: 0,02 segundos

- 15 Descripción del método: UPCL analítica genérica LC/MS de acceso abierto con bicarbonato de amonio método de 2 minutos

Sistema LC/MS: Acquity UPLC acoplada con espectrómetro de masas SQD

Condiciones de LC

- 20 Columna: Acquity UPLC BEH C18 (50mm x 2,1mm i.d., diámetro empaquetadura 1,7 μ m)

Temperatura de columna: 40 °C

Disolventes: A = 10 mM solución acuosa de NH_4HCO_3 (ajustada a pH 10 with amonio)

B= Acetonitrilo

Volumen de inyección: 1 µl

Tabla de gradiente:

Tiempo (min)	Caudal (mL/min)	%A	%B
0	0,9	97	3
1,5	0,9	0	100
1,9	0,9	0	100
2,0	0,05	97	3

Tiempo de detención: 2 min

5 **Condiciones UV**

Rango PDA: 210 nm - 350 nm

La detección UV fue una señal suma de longitudes de onda de 210 nm a 350 nm.

Velocidad de adquisición: 40 Hz

Condiciones MS

- 10 Modo ionización: Alternado - electroaspersión barrido positivo y negativo (ES⁺/ES⁻)

Rango de barrido: 100 a 1000 AMU

Tiempo de barrido: 0,15

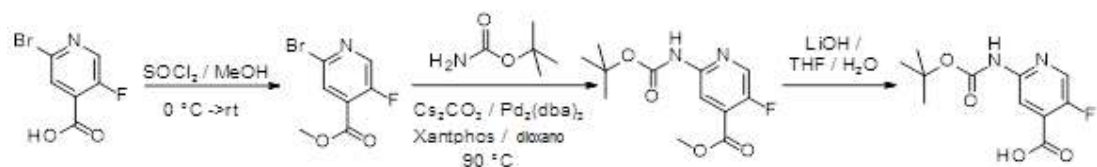
Retardo entre barridos:

- 15 MS entre barridos: 0,02 segundos

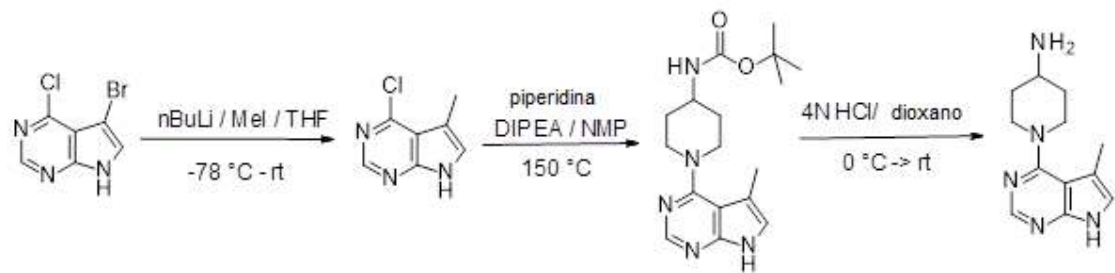
Cambio polaridad/modo entre barridos: 0,02 segundos

Preparación sintética de los Compuestos de la invención:

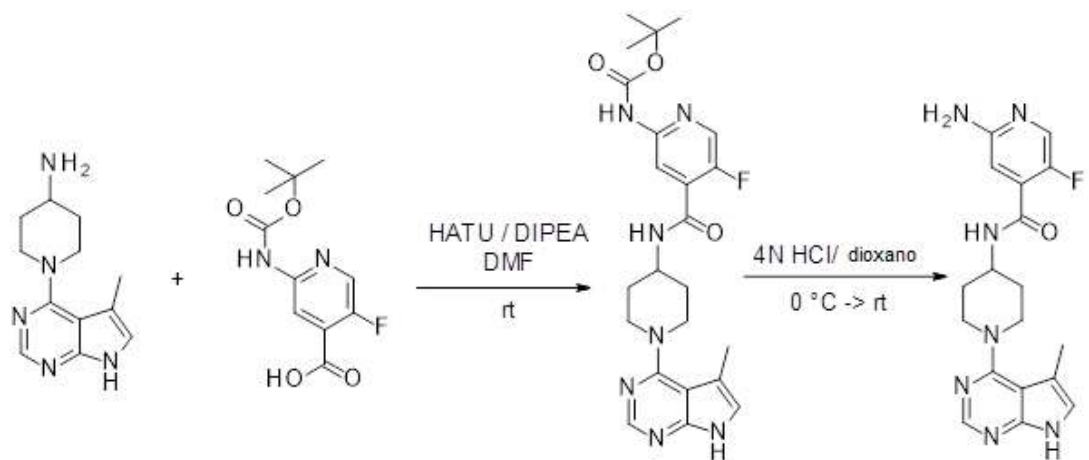
- 20 Esquema 1A Síntesis del intermediario A



Esquema 1B Síntesis del intermediario B

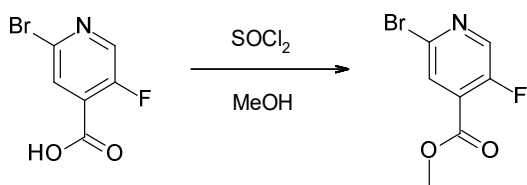


5 Esquema 1C Síntesis del Compuesto 1



1.1 Compuesto 1: 2-amino-5-fluoro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida

1.1.1 Paso 1: Síntesis de metil 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxilato

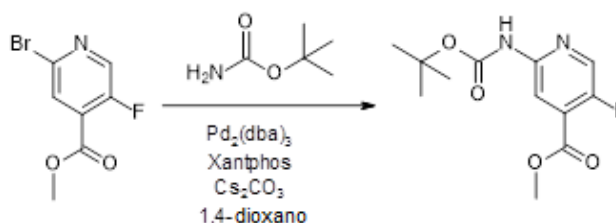


A una solución de ácido 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxílico (10,0 g, 45,5 mmol) en metanol (300 mL) enfriada a 0°C se añadió cloruro de tionilo (16,5 mL, 227,3 mmol) por goteo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se agregó tolueno (40 mL) a la mezcla de reacción. Después de la evaporación del metanol, se eliminó el cloruro de tionilo por destilación. El tolueno remanente se evaporó en un evaporador giratorio obteniéndose el producto bruto, que se disolvió en diclorometano (30 mL) y se evaporó bajo presión reducida obteniéndose metil 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxilato (10,3 g). LCMS: MW (calculada): 232,9; MS (ES⁺, *m/z*): 234, 236 (M+H)⁺.

1.1.2 Procedimiento sintético alternativo:

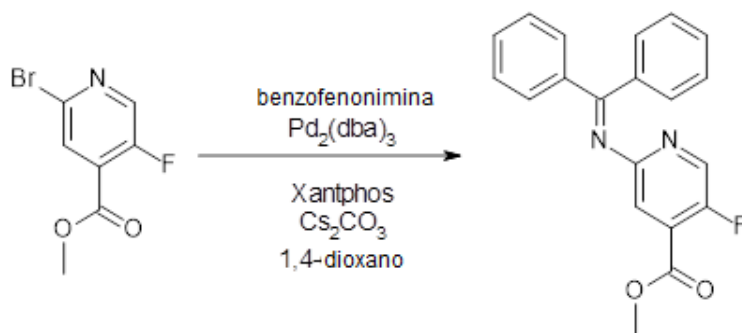
A una solución de ácido 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxílico (10,0 g, 45,5 mmol) en metanol (35 mL) y tolueno (65 mL) enfriada a 0°C se añadió (trimetilsilil)diazometano (solución en dietil éter 2,0 M; 45,5 mL, 90,9 mmol) por goteo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2h, la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida obteniéndose el producto bruto, que se disolvió en acetato de etilo (50 mL), se lavó con agua (100 mL) y salmuera (50 mL) respectivamente, se filtró a través de un filtro separador de fases y se evaporó bajo presión reducida obteniéndose metil 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxilato (10,46g). LCMS: MW (calculada): 232,9; MS (ES⁺, *m/z*): 234, 236 (M+H)⁺.

1.1.3 Paso 2: Síntesis de metil 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-5-fluoro-piridin-4-carboxilato



- A una solución de metil 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxilato (10,3 g, 44,0 mmol) en 1,4-dioxano (150 mL) se añadieron *tert*-butil carbamato (6,18 g, 52,8 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (0,86 g, 0,88 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxantina (1,02 g, 1,76 mmol) y carbonato de cesio (20,08 g, 61,6 mmol).
- 5 La mezcla de reacción se purgó con argón, se sonicó, se tapó y se dejó en agitación a 90°C durante 24h. La mezcla de reacción se enfrió, se filtró a través de una almohadilla de celite y se lavó con etil acetato. El licor madre se lavó con agua (2×100 mL) y salmuera (100 mL) y se evaporó bajo presión reducida obteniéndose el producto bruto, que se trituró de etil acetato obteniéndose metil 2-
- 10 (tert-butoxicarbonilamino)-5-fluoro-piridin-4-carboxilato (8,43g). LCMS: MW (calculada): 270,1; MS (ES⁺, *m/z*): 215,41 (M+H-56)⁺.

1.1.4 Procedimiento sintético alternativo (intermediario metil 2-((difenilmetilen)amino)-5-fluoroisonicotinato):

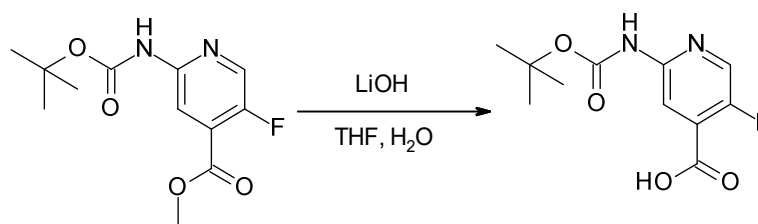


15

- A una suspensión desgasificada y purgada con argón de metil 2-bromo-5-fluoro-piridin-4-carboxilato (308 mg, 1,32 mmol) en 1,4-dioxano (6 mL) se añadieron benzofenoneimina (0,266 mL, 1,58 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (24,1 mg, 0,026 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxantina (30,5 mg, 0,053
- 20 mmol) y carbonato de cesio (602,0 mg, 0,053 mmol). La mezcla de reacción se lavó con argón, se sonicó, se tapó y se dejó en agitación a 100°C durante 16h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo (15 mL), se lavó con

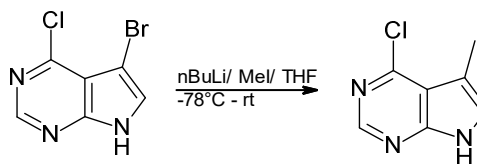
agua (15 mL), salmuera (15 mL), y se evaporó bajo presión reducida obteniéndose metil 2-((difenilmetilen)amino)-5-fluoroisonicotinato (230 mg). LCMS: MW (calculada): 334,1; MS (ES^+ , m/z): 335,34 ($M+H$) $^+$.

5 **1.1.5 Paso 3: Síntesis de ácido 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-5-fluoro-piridin-4-carboxílico**



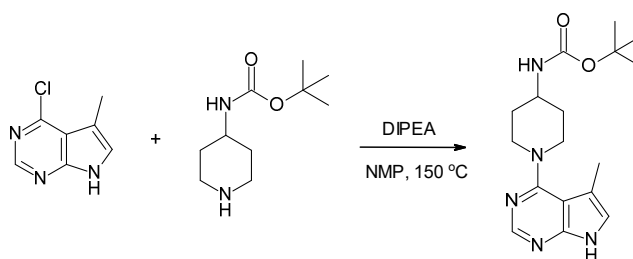
A una suspensión de metil 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-5-fluoro-piridin-4-carboxilato (8,43 g, 31,19 mmol) en tetrahidrofurano (100 mL) se añadió hidróxido de litio (2,98 g, 124,76 mmol) y agua (50 mL). La mezcla de reacción se dejó agitar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se evaporó el tetrahidrofurano bajo presión reducida, se ajustó el pH de la capa de agua a 4. El precipitado formado se filtró y evaporó conjuntamente con tolueno (4 x 20 mL) y se secó en horno de vacío a 40°C durante 5h obteniéndose ácido 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-5-fluoro-piridin-4-carboxílico (7,79 g). LCMS: MW (calculada): 256,08; MS (ES^+ , m/z): 201,4 ($M+H-56$) $^+$.

20 **1.1.6 Paso 4: Síntesis de 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina**



Se disolvió 5-Bromo-4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (10,0 g, 43,0 mmol) en THF seco (350 mL) y se enfrió a -78°C bajo una atmósfera de argón. Se añadió *n*-BuLi (2,5 M en hexano, 38 mL, 94,6 mmol) por goteo durante una hora. Luego de completar la adición, la solución se agitó durante 40 min y se añadió yodometano (4,3 mL, 68,8 mmol). Se dejó que la solución lentamente alcanzara temperatura ambiente. Se añadió agua (20 mL) y el disolvente se eliminó en vacío para obtener una suspensión marrón, que se disolvió en agua (200 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3x100 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (150 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y concentraron para obtener el compuesto bruto que se trituró de acetato de etilo para obtener 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d] (5,32 g). LCMS: MW (calculada): 167,03; MS (ES⁺, *m/z*): 168,37 (M+H)⁺.

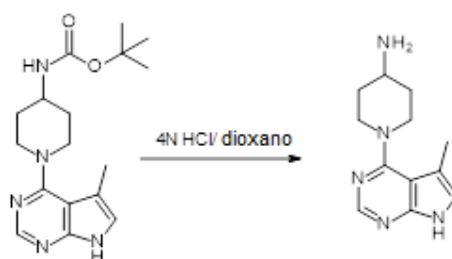
1.1.7 Paso 5: Síntesis de *tert*-butil *N*-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-carbamato



A una solución de 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidina (10,0 g, 59,7 mmol) en 1-metil-2-pirrolidinona (40 mL) se añadieron *tert*-butil*N*-(4-piperidil)carbamato (17,95 g, 89,6 mmol), y *N,N*-diisopropiletilamina (25,2 mL, 149,3 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 150 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió y luego se vertió en agua helada (300 mL). A la mezca se añadió acetato de etilo (40 mL) y se dejó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. El precipitado formado se filtró, se lavó con agua y éter dietílico y se dejó secar en

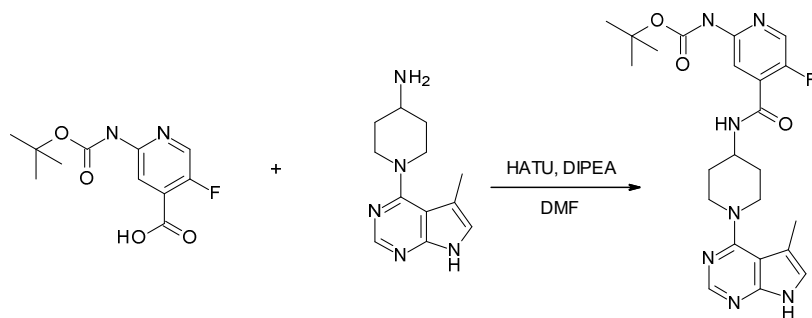
horno de vacío a 40°C durante toda la noche. El secado proporcionó tert-butil N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-carbamato (19,91 g). LCMS: MW (calculada): 331,2; MS (ES⁺, *m/z*): 332,7 (M+H)⁺.

5 1.1.8 Paso 6: Síntesis de 1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina



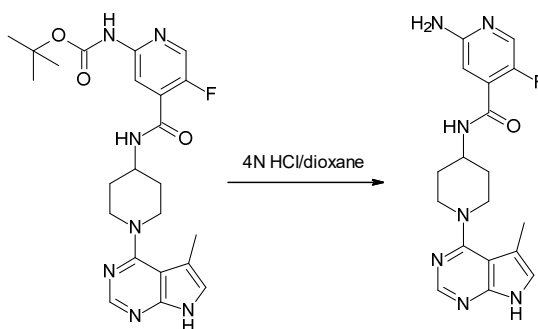
A una suspensión de tert-butil N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]carbamato (38,9 g, 117,3 mmol) en 1,4-dioxano (200 mL) enfriada a 0°C se añadió HCl (solución 4M en dioxano) (290 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 23h a mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida, se co-evaporó con tolueno (200 mL) y se secó en horno de vacío a 40°C durante toda la noche. El secado proporcionó 1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina (47,68 g) como sal HCl. LCMS: MW (calculada): 231,15; MS (ES⁺, *m/z*): 232,6 (M+H)⁺.

1.1.9 Paso 7: Síntesis de tert-butil N-[5-fluoro-4-[[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]carbamoil]-2-piridil]carbamato



A una suspensión de ácido 2-(tert-butoxycarbonylamino)-5-fluoropiridin-4-carboxílico (14,25 g, 55,6 mmol) en N,N-dimetilformamida (130 mL) se añadió HATU (19,03 g, 50,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min sobre la cual se agregaron 1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina×2HCl (16,92 g, 55,6 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (47,56 mL, 278,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3h la reacción se completó. La mezcla de reacción se vertió en agua helada (1,2 L). El precipitado formado se filtró, luego se lavó con acetonitrilo y se secó en horno de vacío a 40°C durante 4h proporcionando tert-butil N-[5-fluoro-4-[[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]carbamoil]-2-piridil]carbamato (19,26 g). LCMS: MW (calculada): 469,22; MS (ES⁺, *m/z*): 470,7 (M+H)⁺.

1.1.10 Paso 8: Síntesis de 2-amino-5-fluoro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida

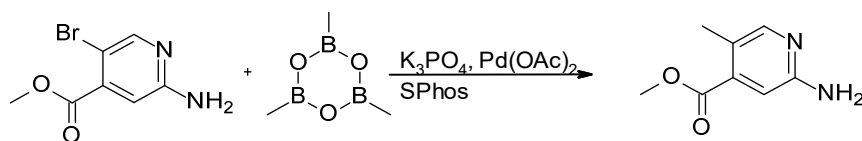


A una suspensión de *tert*-butil N-[5-fluoro-4-[[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]carbamoil]-2-piridil]carbamato (25,76 g 54,9 mmol) en diclorometano (300 mL) enfriada a 0°C se añadió HCl (solución en dioxano 4M) (130 mL) por goteo. Al cabo de pocos minutos se formó un residuo gomoso. Se
 5 añadió a la mezcla de reacción una cantidad adicional de diclorometano (200 mL). El residuo gomoso se trituró mediante ultrasonido (después de 45 min). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, el precipitado se filtró y lavó con agua, acetonitrilo y metanol y se secó en horno de vacío a 40°C durante 5 h y luego a temperatura ambiente durante
 10 toda la noche. El secado proporcionó 2-amino-5-fluoro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (13,65 g). LCMS: MW (calculada): 369,17; MS (ES⁺, *m/z*): 370,77 (M+H)⁺.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,59 - 1,70 (m, J = 12,3, 3,7 Hz, 2 H), 1,93 (dd, J = 12,6, 2,7 Hz, 2 H), 2,34 (s, 3H), 3,06 (t, J = 11,4 Hz, 2 H), 3,94 (d, J = 13,2 Hz,
 15 2 H), 3,95 - 4,03 (m, J = 11,2, 11,2, 7,5, 4,2, 4,2 Hz, 1 H), 6,02 (s, 2 H), 6,51 (d, J = 4,8 Hz, 1 H), 7,05 (s, 1 H), 7,91 (d, J = 1,5 Hz, 1 H), 8,19 (s, 1 H), 8,46 (d, J = 7,7 Hz, 1 H), 11,51 (br. s., 1 H) ppm.

1.2 Compuesto 2: (2-amino-5-metil-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida)

1.2.1 Paso 1: Síntesis de metil 2-amino-5-metil-piridin-4-carboxilato



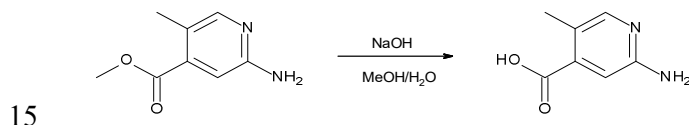
25 Se combinaron metil 2-amino-5-bromo-piridin-4-carboxilato (200 mg, 0,87 mmol), S-Fos (4,6 mg, 3,2 mmol), fosfato tripotásico (369, 3 mg, 1,74 mmol) y

diacetoxipaladio (19,5 g, 0,011 mmol), se desgasificó y llenó nuevamente con N₂ y luego se disolvió en DMSO (4 ml) y trimetilboroxina (467,5 µL, 3,2 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla luego se calentó a 80 °C y se agitó durante toda la noche. Luego de 16 horas la mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con H₂O. La

5 fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se absorbió sobre celite y se concentró en vacío para proporcionar el producto bruto que se purificó mediante el dispositivo de purificación Biotage en columna Interchim KP-Sil 4 g con un caudal de 9 ml/min, DCM como disolvente A y DCM:MeOH = 20:1 como disolvente B. Se recolectaron las fracciones apropiadas para obtener metil 2-

10 amino-5-metil-piridin-4-carboxilato (167,03 mg). LCMS: MW (calculada): 166,07; MS (ES⁺, *m/z*): 167,03 (M+H)⁺.

1.2.2 Paso 2: Síntesis de ácido 2-amino-5-metil-piridin-4-carboxílico

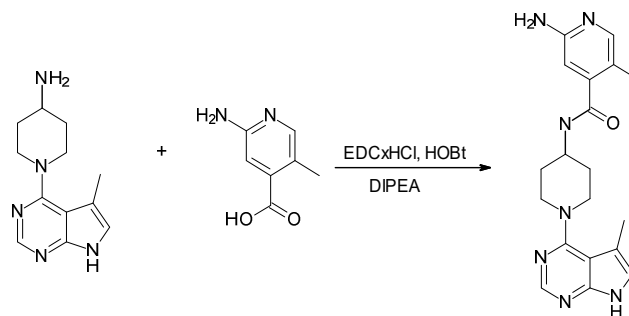


Se disolvió metil 2-amino-5-metil-piridin-4-carboxilato (125 mg, 0,75 mmol) en MeOH/H₂O (2/2) y se añadió NaOH (solución 1M, 0,75 µL). La mezcla luego se calentó a 60 °C y se agitó durante 1h. Luego de 1h se evaporó el MeOH y el residuo acuoso se extrajo con EtOAc. El producto deseado quedó en la capa

20 acuosa que se liofilizó durante toda la noche.

Luego de la liofilización, la mezcla se disolvió en acetona, se filtró y el licor madre se evaporó hasta obtener ácido 2-amino-5-metil-piridin-4-carboxílico (55 mg). LCMS: MW (calculada): 152,06; MS (ES⁺, *m/z*): 153,02 (M+H)⁺.

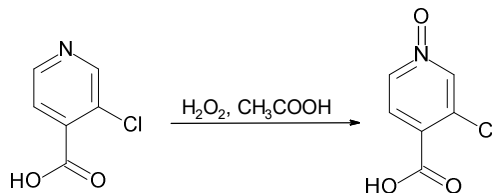
25 1.2.3 Paso 3: Síntesis de 2-amino-5-metil-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida)



- A una solución de ácido 2-amino-5-metil-piridin-4-carboxílico (33 mg, 0,22 mmol) en DMF (1 mL) a 0°C se añadieron EDCxHCl (54,8 mg, 0,29 mmol) y DIPEA (111,1 µL, 0,64 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se agregaron HOBtxH₂O (35,6 mg, 0,26 mmol) y 1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina (50,2 mg, 0,22 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente la mezcla de reacción se diluyó con agua (5 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 5 mL).
- 10 Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y concentraron en vacío para proporcionar el producto bruto que se purificó mediante dispositivo de purificación Biotage en columna Interchim KP-Sil 4 g con caudal de 9 ml/min, DCM como disolvente débil y DCM:MeOH:NH₄OH = 90:1,5:0,15 como disolvente fuerte. Las fracciones
- 15 apropiadas se recolectaron para proporcionar (2-amino-5-metil-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (8 mg). LCMS: MW (calculada): 365,20; MS (ES⁺, *m/z*): 366,23 (M+H)⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,51 (br. s., 1H), 8,35 (d, J=8,01 Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,81 (s, 2H), 3,95 (m, 3H), 3,05 (t, J=11,41 Hz, 2H), 2,34 (s, 3H),
- 20 2,06 (s, 3H), 1,92 (d, J=9,58 Hz, 2H), 1,56-1,70 (m, 2H) ppm.

1.3: Compuesto 3: 2-amino-5-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-piridin-4-carboxamida

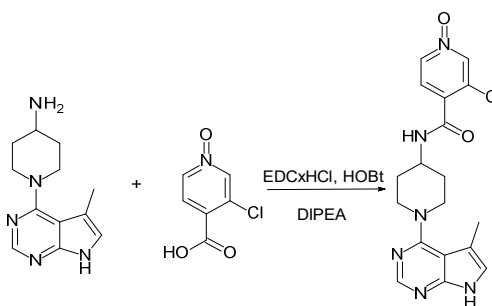
1.3.1 Paso 1: Síntesis de ácido 3-cloro-1-oxo-piridin-4-carboxílico



Se disolvió 3-Cloropiridin-4-carboxílico (620 mg, 3,94 mmol) en ácido acético (2 mL) y se añadió H₂O₂ ac 30% (6 mL). La mezcla de reacción se calentó durante 38 h a 80°C. Completado el calentamiento se concentró hasta la mitad de su volumen. Los cristales formados se separaron por filtración y se secó en secador de vacío para proporcionar ácido 3-cloro-1-oxo-piridin-4-carboxílico (420 mg). LCMS: MW (calculada): 172,99; MS (ES⁺, *m/z*): 174,33 (M+H)⁺.

10

1.3.2 Paso 2: Síntesis de 3-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-1-oxo-piridin-4-carboxamida

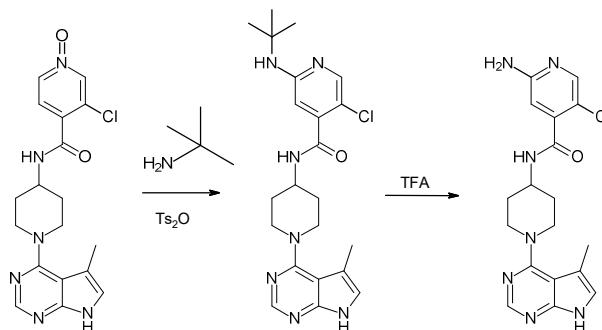


A una solución de ácido 3-cloro-1-oxo-piridin-4-carboxílico (52 mg, 0,30 mmol) en DMF (1 mL) a 0°C se añadieron EDCxHCl (74,8 mg, 0,39 mmol) y DIPEA (161 µL, 0,87 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se agregaron HOBTxH₂O (55,1 mg, 0,36 mmol) y 1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina (69,4 mg, 0,30 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía en columna con gel de sílice (eluyente débil: DCM,

20

eluyente fuerte: DCM:MeOH:NH₄OH=90:5:0,1) para proporcionar 3-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-1-oxo-piridin-4-carboxamida (87 mg). LCMS: MW (calculada): 386,13; MS (ES⁺, *m/z*): 387,49 (M+H)⁺.

5 1.3.3 Paso 3: Síntesis de 2-amino-5-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida

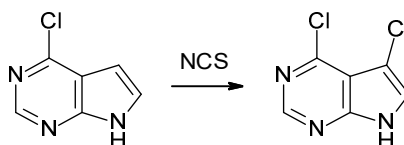


A una solución de 3-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-1-oxo-piridin-4-carboxamida (87 mg, 0,23 mmol) y *tert*-butilamina (0,160 mL, 1,53 mmol) en una mezcla de cloroformo (10 mL) y benzotrifluoruro (1 mL) a 0°C se añadió anhídrido *p*-toluensulfónico (260 mg, 0,57 mmol) en porciones mientras se mantenía la temperatura a 5°C. La reacción se completó luego de 10 min. La solución de ácido trifluoroacético (5 mL) y la mezcla de reacción se agitaron durante 3h a 80°C. Los disolventes se redujeron bajo vacío y el residuo se diluyó con diclorometano y se extinguió con NaOH 40% a pH 9-10. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (4 x 15 mL). Los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se concentraron y purificaron mediante cromatografía en columna con gel de sílice (eluyente débil: DCM, eluyente fuerte: DCM:MeOH:NH₄OH=90:9:0,5) para proporcionar 2-amino-5-cloro-N-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida (9,05 mg). LCMS: MW (calculada): 385,14; MS (ES⁺, *m/z*): 386,54 (M+H)⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11,52 (br. s., 1H), 8,52 (d, J=7,63 Hz, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,91 (d, J=4,88 Hz, 1H), 7,06 (s, 1H), 6,52 (d, J=4,88 Hz, 1H), 6,42 (s, 2H), 3,94 (m, 3H),

3,08 (t, J=11,44 Hz, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,95 (d, J=9,77 Hz, 2H), 1,57-1,71 (m, 2H) ppm.

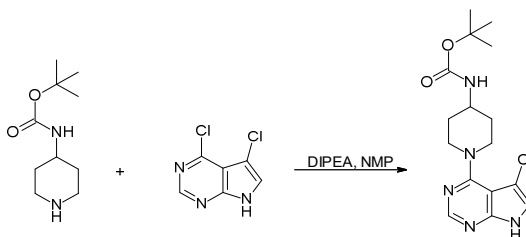
1.4: Compuesto 4: 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-piridin-4-carboxamida

1.4.1 Paso 1: Síntesis de 4,5-dicloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina



A una solución de 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (2,0 g, 13,04 mmol) en DCM (80 mL) se añadió *N*-clorosuccinimida (1,7 g, 13,04 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 días. La mezcla de reacción se disolvió en agua y se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y evaporaron para obtener 4,5-dicloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1,08 g). LCMS: MW (calculada): 186,97; MS (ES⁺, *m/z*): 187,98 (M+H)⁺.

1.4.2 Paso 2: Síntesis de *tert*-butil *N*-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)carbamato

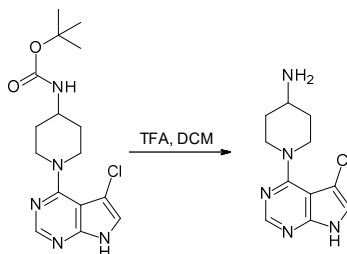


Tert-butil *N*-(4-piperidil)carbamato (895,3 mg, 4,47 mmol) y 4,5-dicloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1.080 mg, 5,36 mmol) se disolvieron en NMP (8 ml) y se añadió DIPEA (2,33 ml, 13,4 mmol) por goteo. La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente 3 días. La mezcla se disolvió en agua y se extrajo con EtOAc (3 x 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron y concentraron hasta proporcionar el producto bruto que fue recristalizado con acetonitrilo para proporcionar *tert*-butil N-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)carbamato

5 (1,42 g). LCMS: MW (calculada): 351,15; MS (ES⁺, *m/z*): 352,22 (M+H)⁺.

1.4.3 Paso 3. Síntesis de 1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina

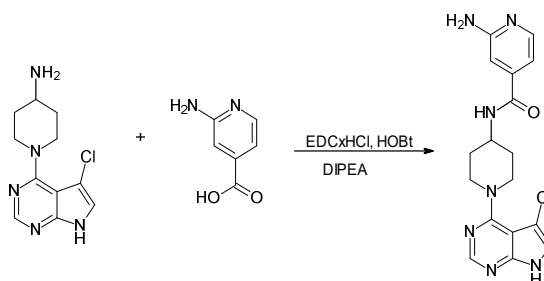


10

A una solución de *tert*-butil N-[1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]carbamato (2,0 g, 5,69 mmol) en DCM (10 mL) se añadió ácido trifluoroacético (3,3 mL) y la solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Completada la agitación, el disolvente se evaporó y el producto bruto se colocó en una columna SCX (20 g) previamente acondicionada (40 mL MeOH). La columna se lavó con MeOH (2 x 40 mL) y luego con NH₃ 7 N/MeOH (100 mL). El disolvente se evaporó para proporcionar 1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina (1,3 g). LCMS: MW (calculada): 251,09; MS (ES⁺, *m/z*): 252,10 (M+H)⁺.

20

1.4.4 Paso 4. Síntesis de 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]piridin-4-carboxamida



A una solución de ácido 2-aminopiridin-4-carboxílico (200 mg, 1,45 mmol) en DMF (4 mL) a 0°C se añadieron EDCxHCl (362,3 mg, 1,89 mmol) y DIPEA (732 µL, 4,21 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se agregaron

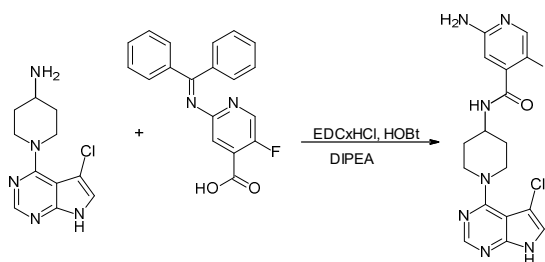
5 HOBTxH₂O (266,4 mg, 1,74 mmol) y 1-(5-cloro-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina (546,23 mg, 2,17 mmol). La reacción se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente, se diluyó con agua (10 mL) y se extrajo con EtOAc (3x10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y concentraron en vacío. El producto

10 bruto se purificó mediante dispositivo de purificación Biotage en columna Interchim KP-Sil 12 g: DCM como disolvente débil y DCM:MeOH:NH₄OH = 90:1,5:0,15 como disolvente fuerte. Las fracciones apropiadas se recolectaron para proporcionar un producto que se trituró con acetonitrilo para proporcionar 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-piridin-4-

15 carboxamida (162,1 mg). LCMS: MW (calculada): 371,13; MS (ES⁺, *m/z*): 372,18 (M+H)⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12,15 (br. s., 1H), 8,39 (d, J=7,32 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,97 (d, J=4,88 Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 6,77-6,87 (m, 2H), 6,09 (br. s., 2H), 4,21 (d, J=12,21 Hz, 2H), 4,05 (d, J=7,32 Hz, 1H), 3,10 (t, J=12,36 Hz, 2H), 1,91 (d, J=10,68 Hz, 2H), 1,74 (m, 2H) ppm.

20

1.5 Compuesto 5: Síntesis de 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida



A una solución de ácido 2-(benzihidrilideneamino)-5-fluoro-piridin-4-carboxílico (43,0 mg, 0,13 mmol) en DMF (5 mL) a 0°C se añadieron EDCxHCl (32,6 mg, 0,17 mmol) y DIPEA (66,1 µL, 0,38 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se agregaron HOBTxH₂O (24,5 mg, 0,16 mmol) y 1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidin-4-amina (50,3 mg, 0,20 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. El disolvente se evaporó hasta sequedad. El producto bruto se purificó mediante LC-MS preparativa. Las fracciones apropiadas se recolectaron y liofilizaron durante toda la noche para proporcionar 2-amino-N-[1-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida (17 mg). LCMS: MW (calculada): 389,12; MS (ES⁺, *m/z*): 390,39 (M+H)⁺. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12,15 (br. s., 1H), 8,47 (d, J=7,70 Hz, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 6,51 (d, J=4,40 Hz, 1H), 6,02 (s, 2H), 4,14 (d, J=12,65 Hz, 2H), 4,02 (m, 1H), 3,13 (t, J=11,83 Hz, 2H), 1,93 (d, J=10,82 Hz, 2H), 1,67 (m, 2H) ppm.

1.6 Compuesto 6: Síntesis de 2-amino-N-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida

1.6.1. Síntesis de 3-bromo-4-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo

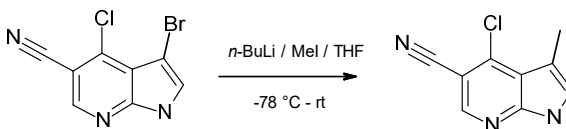
20



A una solución agitada de 4-cloro-1H-pirrolo(3,2-b)piridin-5-carbonitrilo (3 g, 16,89 mmol) en DMF (20 mL) se añadió N-bromosuccinimida (3,3 g, 18,582 mmol). La

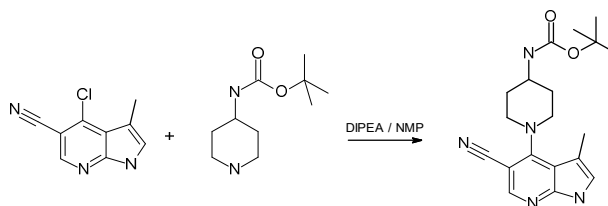
solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de reacción se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron en vacío. El polvo obtenido se trituro con EtOAc y se secó para proporcionar 3-bromo-4-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo (1,5 g). LCMS: MW (calculada): 256,49; MS (ES⁺, *m/z*): 257,93 (M+H)⁺.

1.6.2. Síntesis de 4-cloro-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo



A una solución de 3-bromo-4-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo (1,5 g, 5,85 mmol) en THF (48 mL) a -78°C bajo argón se añadió una solución de butillitio (5,2 mL, 12,87 mmol) y la reacción se agitó durante 20 min. Luego se agregó yodometano (590 µL, 9,36 mmol) por goteo y la reacción se dejó entibiar a temperatura ambiente en el baño helado. La reacción se extinguió con agua (30 mL) y el pH se ajustó a 7. El THF se evaporó y se agregó agua. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua y se trituro con EtOAc para proporcionar 4-cloro-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo (813 mg). LCMS: MW (calculada): 191,6; MS (ES⁺, *m/z*): 192,05 (M+H)⁺.

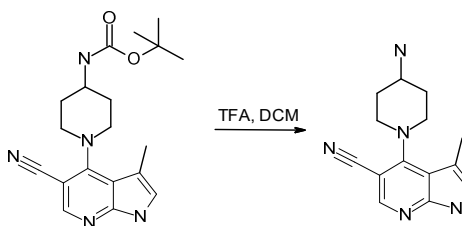
1.6.3. Síntesis de *tert*-butil *N*-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato



Una mezcla de 4-cloro-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo (813 mg, 4,24 mmol), 4-boc-aminopiperidina (1,27 g, 6,36 mmol) y DIPEA (1,85 mL, 10,61 mmol) en NMP (5 mL) se agitó a 150°C durante 3 h y la agitación continuó a temperatura ambiente durante el fin de semana. La mezcla de reacción se diluyó con agua (110 mL) y éter dietílico. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua y éter dietílico y se secó para proporcionar tert-butil N-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato (1,28 g). LCMS: MW (calculada): 355,43; MS (ES⁺, *m/z*): 356,30 (M+H)⁺.

10

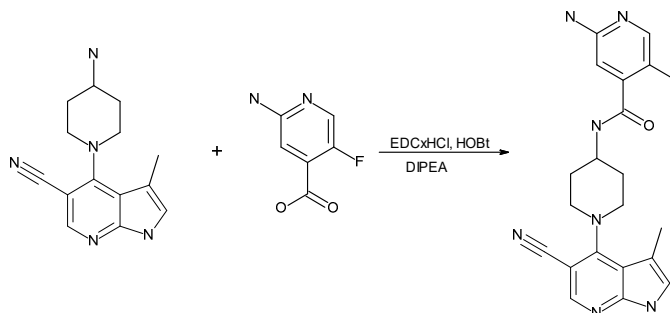
1.6.4. Síntesis de 4-(4-amino-1-piperidil)-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo



15 A una solución de tert-butil N-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato (1,28 g, 3,6 mmol) en DCM (40 mL) se añadió ácido trifluoroacético (5,5 mL, 72,03 mmol). La solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se cargó en una columna SCX (20 g, previamente acondicionada con 100 mL de MeOH). Se pasó MeOH (200 mL) a través de la columna y el compuesto se eluyó con NH₃ 7N en MeOH:MeOH = 1:4
20 (300 mL). El filtrado se concentró en vacío para proporcionar 4-(4-amino-1-

piperidil)-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo (1,06 g). LCMS: MW (calculada): 255,32; MS (ES^+ , m/z): 256,21 ($M+H$) $^+$.

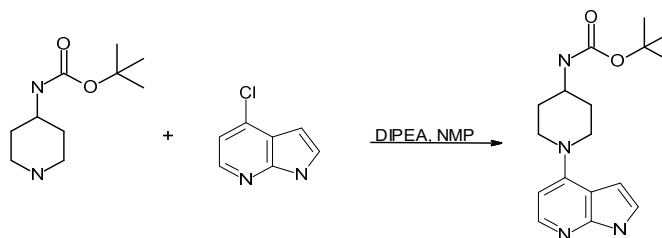
1.6.5. Síntesis de 2-amino-N-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida



A una solución de ácido 2-amino-5-fluoro-piridin-4-carboxílico (66,0 mg, 0,30 mmol) en DMF (1 mL) a 0°C se añadieron EDCxHCl (50,0 mg, 0,26 mmol) y DIPEA (101 μ L, 0,58 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se añadieron HOBtxH₂O (37,0 mg, 0,24 mmol) y 4-(4-amino-1-piperidil)-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo (108,0 mg, 0,30 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. El disolvente se evaporó hasta sequedad. El producto bruto se purificó mediante dispositivo de purificación Biotage en columna Interchim KP-Sil 4 g: DCM como disolvente débil y DCM:MeOH = 10:1 como disolvente fuerte. Las fracciones apropiadas se recolectaron para proporcionar (2-amino-N-[1-(5-ciano-3-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida (1,27 mg). LCMS: MW (calculada): 393,42; MS (ES^+ , m/z): 394,53 ($M+H$) $^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11,82 (br. s., 1H), 8,55 (d, $J=7,32$ Hz, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,54 (d, $J=4,27$ Hz, 1H), 6,04 (br. s., 2H), 3,97 (br. s., 1H), 3,62 (d, $J=12,21$ Hz, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,97 (d, $J=11,29$ Hz, 2H), 1,72-1,83 (m, 2H) ppm.

Compuesto 7: Síntesis de 2-amino-N-[1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida

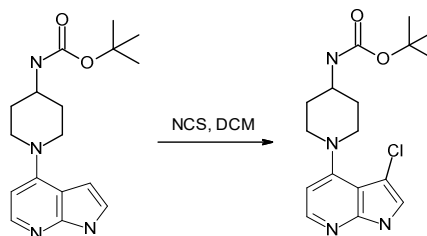
1.7.1. Síntesis de tert-butil N-[1-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato



5

Una mezcla de 4-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (4,0 g, 26,20 mmol), tert-butil N-(4-piperidil)carbamato (7,8 g, 39,30 mmol) y DIPEA (11,4 mL, 65,50 mmol) en NMP (28 mL) se agitó a 150°C durante 72 h. La mezcla de reacción se disolvió con agua y se extrajo con EtOAc (4x). Las capas orgánicas combinadas se secaron y concentraron para proporcionar el producto bruto que fue recristalizado con acetonitrilo para proporcionar tert-butil N-[1-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato (1,88 g). LCMS: MW (calculada): 316,41; MS (ES⁺, m/z): 317,22 (M+H)⁺.

1.7.2. Síntesis de tert-butil N-[1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato



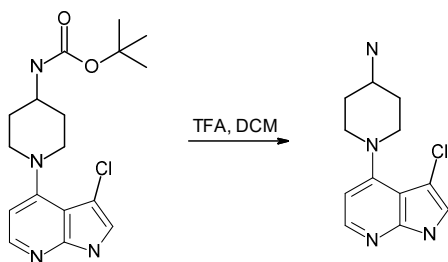
Se disolvió tert-butil N-[1-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato (316 mg, 1 mmol) en DCM seco (10 ml) y se añadió N-clorosuccinimida (147 mg, 1,1 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 40°C. Después de 16 h se añadió agua a la mezcla de reacción y se extrajo con DCM (3x). La capa orgánica

20

combinada se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró a través de un separador de fases y se evaporó para obtener el compuesto bruto que se purificó mediante un dispositivo de purificación Biotage en columna Interchim KP-Sil 4 g con caudal de 10 ml/min, DCM como solvente A y DCM : MeOH = 7:3 como solvente B. Método:

5 0-5 %B 4 CV; 20 % 4 CV; 20-40 %B 5 CV; 40 %B 5 CV; 40-60 %B 4 CV; 60 %B 4 CV. Las fracciones apropiadas se reunieron para proporcionar tert-butil N-[1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]carbamato (150 mg). LCMS: MW (calculada): 350,85; MS (ES⁺, *m/z*): 351,43 (M+H)⁺.

10 1.7.3. Síntesis de 1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)piperidin-4-amina

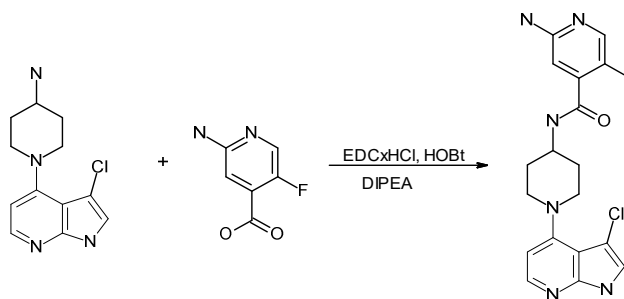


A una mezcla de tert-butil N-[1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil] carbamato (320 mg, 1,8 mmol) en DCM (10 mL) a 0°C se añadió TFA (1,5 mL). La

15 mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Completada la agitación, el disolvente se evaporó y el producto bruto se colocó en una columna SCX (5 g) previamente acondicionada (con MeOH). La columna se lavó con MeOH (2 x 5 mL) y luego con NH₃/MeOH 7 N (10 mL) para proporcionar 1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)piperidin-4-amina

20 (108 mg). LCMS: MW (calculada): 250,73; MS (ES⁺, *m/z*): 251,38 (M+H)⁺.

1.7.4. Síntesis de 2-amino-N-[1-(3-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida



A una solución de ácido 2-amino-5-fluoro-piridin-4-carboxílico (66,0 mg, 0,43 mmol) en DMF (1 mL) a 0°C se añadieron EDCxHCl (70,0 mg, 0,36 mmol) y DIPEA (141 µL, 0,81 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se

5 agregaron HOBTxH₂O (52,0 mg, 0,34 mmol) y 1-(3-cloro-1H-pirrólo[2,3-b]piridin-4-il)piperidin-4-amina (108,0 mg, 0,43 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua (10 mL) y el producto se precipitó. Se eliminaron los cristales por filtración y se secó en secador de vacío a 65°C durante 3 h. El filtrado se

10 extrajo con EtOAc (4x5 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y concentraron en vacío para obtener el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante dispositivo de purificación Biotage en columna Interchim KP-Sil 4 g: DCM como disolvente débil y E1 como disolvente fuerte. Las fracciones apropiadas se recolectaron para proporcionar (2-amino-N-[1-(3-cloro-

15 1H-pirrólo[2,3-b]piridin-4-il)-4-piperidil]-5-fluoro-piridin-4-carboxamida (7,77 mg). LCMS: MW (calculada): 388,8; MS (ES⁺, *m/z*): 389,47 (M+H)⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11,81 (br. s., 1H), 8,51 (d, J=7,63 Hz, 1H), 8,06 (d, J=5,19 Hz, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 6,47-6,64 (m, 2H), 6,03 (s, 2H), 3,94 (m, 1H), 3,50-3,64 (m, 2H), 2,87 (t, J=11,44 Hz, 2H), 1,96 (d, J=10,38 Hz, 2H), 1,72-1,87 (m, 2H)

20 ppm.

EJEMPLOS BIOLÓGICOS

2. *Ensayos in vitro*

Ensayos bioquímicos ASK1/2 2.1 (tecnología IMAP)

- La tecnología IMAP® proporciona un ensayo homogéneo aplicable a una amplia variedad de quinasas, fosfatasas y fosfodiesterasas sin considerar la secuencia peptídica del sustrato. El ensayo es un procedimiento simple de mezcla y lectura que permite la determinar con precisión la actividad enzimática. Sobre la base de
- 5 la interacción específica, de alta afinidad de grupos fosfo con nanopartículas que contienen metales trivalentes (perlas), IMAP es una plataforma genérica, no basada en anticuerpos, para evaluar la actividad quinasa, fosfatasa y fosfodiesterasa. Se realiza una reacción enzimática usando un sustrato marcado de manera fluorescente. La adición del sistema de unión IMAP detiene la reacción
- 10 enzimática e inicia la unión de las perlas con los sustratos fosforilados. La unión del sustrato con las perlas, que se correlaciona con la actividad enzimática, se puede detectar usando FP (Polarización fluorescente, por sus sigas en inglés) o TR-FRET (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo, por sus siglas en inglés) como lectura de datos.
- 15 La quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), también conocida como MAP3K5, es un miembro de una familia de proteína quinasa activada por mitógenos quinasa quinasas (MAP3K). Esta activa las vías Jnk y p38 a través de MAP2K MKK4/7 y MKK3/6 (respectivamente). Este ensayo IMAP ASK1 emplea el siguiente péptido IMAP: RP7140-T2 (5TAMRA-GTFRAAIRRLAARRR-OH, SEQ ID
- 20 NO: 1). Este ensayo se ha configurado para correr a Km para ATP (150 nM) de modo que será sensible a los inhibidores competitivos de ATP. Las condiciones finales del ensayo son ATP 150 mM, DTT 1 mM DTT, péptido 200 nM y ASK1 6 nM (proteína total). El reactivo de unión está compuesto de 100% A con una dilución final de 1:200.

25

Soluciones:

KIT IMAP FP, Cat. Nro. R8127; Tampón de reacción Tween (5x conc.), Molecular Devices, Cat. Nro. R7436; Dilución 1:5 con H₂O y conteniendo DTT (1mM de solución madre 1M); tampón de unión progresiva (PBB) A (5x conc.), Molecular Devices, Cat. Nro. R7282; reactivo de unión progresiva (Reactivo PB), Molecular Devices, Cat. Nro. R7284; solución enzimática (conteniendo 2x Ask1 en tampón de reacción); solución de sustrato (conteniendo 2x sustrato peptídico en tampón de reacción, y 2x 150 µM ATP en tampón de reacción); tampón de microesferas (tampón de unión progresiva A diluido 1:5 con H₂O); solución de microesferas (tampón de microesferas con 1:200 de reactivo de unión progresiva (2x))

10

Parte experimental

Se añadieron 100 nL del compuesto de ensayo en DMSO 100% a placas de 384 pocillos. Para un experimento dosis-respuesta se usó una dilución del compuesto 1 en 4 (25 µM concentración final superior). Se agregaron 3 µL de hASK1 (6 nM), hASK2 (25nM) o rASK1 (15nM) a cada pocillo, excepto al pocillo de control al que se agregaron 3 µL de tampón. Se agregaron 3 µL de solución de sustrato a cada pocillo y las placas se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente. Luego de ese período se añadieron 6 µL de solución de microesferas IMAP™ (tampón de unión progresiva A + reactivo PB; dilución final 1:100) a cada pocillo y se centrifugó durante 1 minuto a 1.000 rpm. Las placas luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente luego de lo cual las placas se leyeron en un lector de placas EnVision Perkin Elmer.

20

Análisis de datos

El cálculo de los datos de CI₅₀, curvas y análisis QC se realizó usando herramientas Excel y el software GraphPadPrism, v. 5.03. Suscintamente, las curvas concentración individual-efecto se generaron graficando el logaritmo de la

25

- concentración ensayada de los compuestos de ensayo (X) frente a los valores de inhibición porcentual correspondientes (Y) usando el ajuste por mínimos cuadrados (ordinarios). Se permitió excluir hasta $\frac{1}{4}$ de punto de controles alto/bajo, pero solo si los valores eran $>\text{Promedio} \pm 1 * \text{DS}$. Ecuación de ajuste usada para el cálculo de $\text{CI}_{50} = \log(\text{inhibidor})$ vs. respuesta - pendiente variable (cuatro parámetros). Resultados calculados: Calc 1: valor mP para medición FP = $1000 * (S - G * P) / (S + G * P)$ donde S = <detector 2 o canal FP-BodipyTAMRA_Ex531-Em579-optimizado(1) 2> P = <detector 1 o canal FP-BodipyTAMRA_Ex531-Em579-optimizado(1) 1> G = factor G. Ganancia=100. La limitación superior se usa solo si los valores superiores no están correctamente calculados.
- Mínimo limitado si es menor que -30%I o mayor que 30%I. Máximo restringido si es menor que 70%I o mayor que 130%I. Objetivo factor $Z' \geq 0,4$. Rango pendiente de Hill 0,5 a 5.

15

Se ensayaron compuestos ilustrativos de la invención de acuerdo con el método del Ejemplo 2.1. Los resultados se muestran a continuación:

Número de compuesto	Inhibición (pCI ₅₀) ASK1/ASK2
1	8,24/7,96
2	8,17/8,08
3	8,05/-
4	8,46/8,19
5	8,43/-
6	8,98/-
7	8,24/-

2.2 Ensayos bioquímicos ASK1/2 (Tecnología AlphaScreen)

Descripción de la tecnología AlphaScreen

Las actividades bioquímicas ASK1 y ASK2 también se cuantificaron usando la tecnología AlphaScreen que mide el grado de fosforilación de un sustrato de proteína (MKK7). La tecnología AlphaScreen se basa en la unión de un sustrato a dos tipos de microesferas, aceptora y donante. La unión a una microesfera se produce a través del marcador de la proteína sustrato. La unión de la segunda microesfera se produce a través de la unión fosfoespecífica de un anticuerpo al fosfotio del sustrato. Esto forma un "sandwich", con lo que las microesferas aceptora y donante se acercan mucho entre sí. Cuando las microesferas donantes son excitadas por la luz en el rango de 680 nm, se libera un oxígeno singlete y provoca la emisión de luz de la aceptora en el rango de 620 nm que puede detectarse usando un lector de placas adecuado.

15

Descripción del ensayo AlphaScreen ASK1/2

Los ensayos AlphaScreen ASK1/2 fueron posibilitados por la unión de proteína MKK7 inactiva de longitud completa con microesferas donantes de glutatona mediante el uso del marcador GST. El sitio de fosforilación en MKK7 (Ser271/Thr275) luego es reconocido por un anticuerpo fosfoespecífico. El anticuerpo fosfoespecífico se une a las microesferas aceptoras AlphaScreen a través de una interacción con Proteína A. La fosforilación de MKK7 por ASK1 o ASK2 posteriormente facilita la unión de las microesferas donantes y aceptoras en estrecha proximidad, tras lo cual la transferencia del oxígeno singlete conduce a la generación de la señal de AlphaScreen.

25

Reactivos, condiciones y protocolo del ensayo ASK1/2 AlphaScreen

Proteína ASK1 humana de longitud completa con un marcador de 6His-Avi N-terminal.

Heterodímero de proteína ASK1 de longitud completa con un marcador de 6His-Avi N-terminal (enzima inactiva donde la lisina 709 es reemplazada por metionina) y proteína ASK2 de longitud completa con un marcador 6His-FLAG.

MKK7 humana inactiva (Carna Bioscience, Nro. de Cat. 07-147-10).

Anticuerpo Fosfo-MKK7 (Ser171/Thr275) (Cell Signalling Technologies Nro. de Cat. 4171).

Perlas aceptoras de proteína A (Perkin Elmer, Nro. de Cat. 6760137).

Perlas donantes de glutatona (Perkin Elmer, Nro. de Cat. 6765301).

Adenosina trifosfato, ATP (Promega, Nro. de Cat. V915B).

Tampón de reacción: 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM CHAPS, pH 7,2.

Tampón de parada: 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 60 mM EDTA, 1 mM CHAPS, pH 7,2.

El ensayo se configuró para realizarlo usando las siguientes condiciones (concentraciones finales): 150 μ M ATP; 400 nM MKK7; 0,8 nM ASK1 y 2 nM ASK2.

Parte experimental

Se añadieron 100 nL del compuesto de ensayo (concentración inicial 6 μ M, 11 concentraciones con dilución de 1 en 3) en DMSO 100% a placas de 384 pocillos de volumen pequeño. Se agregaron 2,5 μ L de ASK1 o ASK2 a cada pocillo, excepto a los pocillos de control a los que se agregaron 2,5 μ L de tampón. Se agregaron 2,5 μ L de solución MKK7 a todos los pocillos. La placa se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las microesferas aceptoras de

proteína A y el anticuerpo fosfoespecífico se incubaron durante 30 minutos y luego se añadieron 2,5 μ L de mezcla de microesferas aceptoras de proteína A/microanticuerpo fosfoespecífico (concentración final de microesferas aceptoras 2,5 μ g/mL y dilución final del anticuerpo 1/800) a cada pocillo. La placa se incubó

5 durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se agregaron 2,5 μ L de microesferas donantes de GSH (concentración final de microesferas aceptoras 10 μ g/mL) a cada pocillo. La placa se incubó durante otros 60 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual la placa se leyó en un lector de placas Perkin Elmer Enspire.

10

Análisis de los datos

El cálculo de los datos de CI_{50} , curvas y análisis QC se realizó usando herramientas Excel y el software GraphPadPrism, v. 5.03. Suscintamente, las curvas concentración individual-efecto se generaron graficando el logaritmo de la

15 concentración ensayada de los compuestos de ensayo (X) frente a los valores de inhibición porcentual correspondientes (Y) usando el ajuste por mínimos cuadrados (ordinarios). Ecuación de ajuste usada para el cálculo de CI_{50} = log(inhibidor) vs. respuesta - pendiente variable (cuatro parámetros).

20 Se ensayaron compuestos ilustrativos de la invención de acuerdo con el método del Ejemplo 2.2. Los resultados se muestran a continuación:

Número de compuesto	Inhibición (pCI₅₀) ASK1/ASK2
1	8,72/7,71
2	8,9/-
3	8,7/7,8
4	9,4/8,2

Número de compuesto	Inhibición (pCI ₅₀) ASK1/ASK2
5	8,8/-
6	8,98/-
7	8,24/-

2.3 Ensayo celular ASK1/2

Se ensayó la actividad ASK1/2 *in vitro* determinando la cantidad de proteína fosfo-MKK3 en CMSP estimuladas por H₂O₂ usando el método de análisis de transferencia western. Se mostró que MKK3 es un sustrato directo de fosforilación catalizada por ASK1/2 en la vía de activación de p38.

2.3.1 Materiales y condiciones del ensayo

Lymphoprep (Axis-Shield, Nro. de Cat. 1114545)

10 Tampón de lisis de cloruro de amonio pH 7,4 (concentración 10x):

NH₄Cl - conc. final 1,5 M (Kemika, Nro. de Cat. 0137407)

NaHCO₃ - conc. final 100 mM (Kemika, Nro. de Cat. 1411007)

Na₂EDTA - conc. final 10 mM (Sigma Aldrich; Nro. de Cat. E-4884)

15 RPMI 1640 (Lonza Nro. de Cat. BE12-115F/U1)

FBS (Sigma Nro. de Cat. F7524, inactivado por calor 30' / 56°C)

Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, Nro. de Cat. D2650)

Tampón de lisis celular (pH 7,4): PBS + Triton X-100 1% (Sigma Aldrich; Nro. de Cat. X100) - 10 ml

20 Fosfo-Parada - 1 comprimido (Sigma, Nro. de Cat. 4693124001)

Inhibidor de proteasa - 1 comprimido (Sigma, Nro. de Cat. 4906837001)

Solución de peróxido de hidrógeno 3% p/p (Sigma Aldrich, Nro. de Cat. H-6520)
PBS (Sigma Aldrich, Nro. de Cat. P4417-100TAB)

5 Microplaca, 96 pocillos, pp, fondo en v, clara (Greiner bio-one; Nro. de Cat. 651201)

Placa para cultivo tisular, 6 pocillos, fondo plano con tapa para baja evaporación (Falcon, Nro. de Cat. 353224)

Tubo Falcon 50 mL (TPP, Nro. de Cat. 91050)

10 Kit para ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific, Nro. de Cat. 23225)
Placa de 96 pocillos 1B Immulon® Microtiter™ (Thermo Scientific, Nro. de Cat. 3355)

Kit maestro Wes 12-230 kDa (Protein Simple, Nro. de Cat. PS-MK14)

Anticuerpo monoclonal de conejo MKK3 (D4C3) (Cell Signaling, Nro. de Cat.

15 8535)

Anticuerpo monoclonal de conejo Fosfo-MKK3 (Ser189)/MKK6 (Ser207) (D8E9) (Cell Signaling, Nro. de Cat. 12280)

El ensayo se configuró para realizarlo usando las siguientes condiciones: Rango
20 de concentración de los compuestos ensayados: 1 – 0,0014 μ M (7 diluciones de 1 en 3); concentración H_2O_2 : 3 mM

2.3.2 Parte experimental

Para aislar las CMSP de la capa leucocitaria, la capa leucitaria se diluyó 1:1 en
25 PBS, luego la capa leucocitaria diluida (25 mL) se pipeteó cuidadosamente en la parte superior de 20 mL de Lymphoprep en un tubo falcon. Los tubos luego se centrifugaron durante 35 min a 400 x g. Luego se retiró cuidadosamente la capa

superior de plasma dejando la capa que contenía las células mononucleares (CM). Luego, la capa que contenía las CM se transfirió a un nuevo tubo, se agregó PBS hasta un volumen total de 50 mL y el tubo luego se centrifugó durante 10 minutos (200 x g, 25°C). Los gránulos obtenidos luego se resuspendieron en 2 mL de PBS, y se repitió el paso de lavado. Los gránulos finales se resuspendieron en tampón de lisis de cloruro de amonio hasta 50 mL, se mezclaron suavemente y centrifugaron durante 10 minutos (200 x g, 25°C), se resuspendieron en 2-3 mL de medio de cultivo celular y se diluyeron hasta 50 mL en medio de cultivo celular. Se determinó la densidad celular de una dilución 1/20 en medio de cultivo celular usando un contador celular automático.

Se sembraron 10×10^6 CMSP por pocillo en 1 mL de medio celular RPMI 1640 suplementado con FBS 10% en placas de 6 pocillos. Se prepararon siete conjuntos de diluciones de uno en tres de compuestos en DMSO comenzando por 1 mM en placas de 96 pocillos con fondo en v. Las soluciones de compuesto en DMSO se diluyeron 100x en el medio celular. Se agregaron 200 µL de solución de compuesto diluida 100x por pocillo, los pocillos de control contenían 200 µL de DMSO 1% preparado en medio celular. Se prepararon 7,5 mM H₂O₂ en medio celular y se agregaron 800 µL a cada pocillo, excepto al platillo de control negativo al que se agregaron 800 µL de medio celular. Las células se incubaron durante 30 min a 37°C, CO₂ 5%, 95% de humedad. Las células se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 300 x g a 4 °C, luego se lavaron con PBS 1 mL, los gránulos de células se resuspendieron en 100 µL de tampón de lisis y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Después de ese lapso, los lisados celulares se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 x g a 4°C y luego los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

Las muestras se diluyeron 5x en tampón de lisis celular y se determinó la cantidad total de proteínas en una placa Immulon 1B de 96 pocillos usando el kit de ensayo de proteínas BCA siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis de transferencia western se realizó usando el kit maestro y dispositivo

- 5 Protein Simple Wes, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cargaron 0,5 mg/mL de proteínas totales por muestra; los anticuerpos fosfo-MKK3 y MKK3 se diluyeron 300x.

Los resultados del ensayo de transferencia western se analizaron usando el software Compass 2.7.1 y la cantidad de fosfo-MKK3 se dividió por la cantidad de

- 10 MKK3 para cada muestra. Se calcularon los porcentajes de inhibición normalizando los datos a los controles usando la siguiente ecuación:

$$[(\text{Muestra} - \text{Control bajo})/(\text{Control Alto} - \text{control bajo})]*100$$

Se determinaron los valores CI_{50} de los compuestos graficando los porcentajes de inhibición y el logaritmo de las concentraciones de los compuestos usando el

- 15 software GraphPad Prism, regresión no lineal (ajuste de curvas), log (inhibidor) vs. respuesta - Pendiente variable (cuatro parámetros).

Se ensayaron compuestos ilustrativos de la invención de acuerdo con el método del Ejemplo 2.3. Los resultados se muestran a continuación:

Número de compuesto	Inhibición (pCI_{50})
1	8,05
2	8,5
3	7,4
4	8,1
5	8,2
6	7,9
7	7,9

2.4. Ensayo de ASK1/2 de sangre entera humana

Se ensayó la actividad de ASK1/2 *in vitro* determinando la cantidad de citocina CCL2 producida en sangre humana entera estimulada con LPS usando ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés). En la bibliografía especializada se describe que la producción de CCL2 disminuye en suero de ratones KO ASK1 en condiciones sin estimulación y con estimulación con LPS.

10

2.4.1 Materiales y condiciones del ensayo

- RPMI 1640 (Lonza Nro. de Cat. BE12-115F/U1)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, Nro. de Cat. D2650)
- Lipopolisacárido de *E.coli* (LPS) (Sigma, Nro. de Cat. L4391)
- 15 Microplaca, 96 pocillos, pp, fondo en v, clara (Greiner; Nro. de Cat. 651201)
- Master block 96 pocillos, 2 mL (Greiner, Nro. de Cat. 780271)
- Microplaca, 96 pocillos, ps, fondo en U, clara, con tapa (Greiner; Nro. de Cat. 650180)
- Tubo Falcon 50 mL (TPP, Nro. de Cat. 91050)
- 20 Placa con 96 pocillos Immulon 2HB (Thermo Fisher Scientific, Nro. de Cat. 3455)
- Sacarosa (Kemika, Nro. de Cat. 1800408)
- Streptavidina-HRP (Calbiochem, Cat. No. OR03L)
- Ácido sulfúrico (Kemika, Nro. de Cat. 1816501)
- Anticuerpo anti-hCCL2 (R&D Systems, Nro. de Cat. MAB679), disuelto en 1 ml de
- 25 PBS
- Anticuerpo de detección anti-hCCL2 (R&D Systems, Nro. de Cat. BAF279), disuelto en 1 mL de PBS

hCCL2 recombinante (estándar, R&D Systems, Nro. de Cat. 366-6C)

Tampón de lavado (PBS + Tween-20 0,05%)

PBS (Sigma, Nro. de Cat. P4417)

Tween-20 (Sigma, Nro. de Cat. P2287)

- 5 Sustrato para 20 ml: 18 ml H₂O + 2 ml acetato de sodio 1M + 200 µl mezcla de TMB + 2,5 µl 30% H₂O₂

Acetato de sodio (Kemika, Nro. de Cat. 1441908)

Mezcla de TMB (Sigma, Cat. No. T2885)

Peróxido de hidrógeno (Merck, Nro. de Cat. 1.08597)

- 10 Tampón de recubrimiento (15 mM Na₂CO₃ (xH₂O) + 35mM NaHCO₃)

Carbonato de sodio (Sigma, Nro. de Cat. S-2127)

Bicarbonato de sodio (Kemika, Nro. de Cat. 1411007)

Tampón de ensayo (PBS + Tween-20 0,05% + BSA 1%)

Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, Nro. de Cat. A2153)

- 15 *2.4.2 Parte experimental*

Se recolectó sangre entera en anticoagulante de citrato. Se usaron 100 µL para determinar el conteo celular usando un contador de células automático.

Se añadieron 300 µL de sangre entera a una placa Master Block de 96 pocillos de 2 mL. Se prepararon seis diluciones de uno en tres de compuestos en DMSO

- 20 comenzando por 10 mM en placas de 96 pocillos con fondo en V. Se añadieron 0,6 µL de compuestos preparados o 0,6 µL de DMSO (pocillos de control positivo y negativo) de la placa con fondo en V a la placa Master Block con sangre. Se prepararon 2 ng/mL LPS en medio de cultivo sin suero y se añadieron 300 µL por pocillo a la placa Master Block con sangre para los pocillos de ensayo. Se
- 25 añadieron 300 µL de medio de cultivo en los pocillos de control negativo. La placa se incubó con sangre entera durante toda la noche en incubador con CO₂ (37°C, CO₂ 5%, humedad 95%). La placa luego fue centrifugada durante 7 minutos a

1.500 x g y los sobrenadantes fueron transferidos a una placa de 96 pocillos con fondo en U para la determinación de citocina CCL2 o los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para futuros ensayos.

El día anterior a la realización del ensayo ELISA, la placa Immulon 2HB se
 5 recubrió con 100 µL por pocillo de anticuerpo anti-hCCL2 diluido 250x en tampón de recubrimiento. La placa luego se incubó a 4°C durante toda la noche. La placa se lavó tres veces con 300 µL por pocillo de tampón de lavado lo cual se repitió después de cada paso. Se añadieron 200 µL de bloqueo (tampón de ensayo + sacarosa 5%) a cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Se
 10 prepararon siete conjuntos de diluciones de 1 en 2 de hCCL2 estándar en tampón de ensayo comenzando por 2.000 pg/mL, en duplicados. Se prepararon pocillos en blanco que solo contenían tampón de ensayo. Las muestras de ensayo (sobrenadantes) se agregaron a la placa diluidas 10 veces en tampón de ensayo. El total del volumen final en la placa fue 100 µL. La placa se incubó durante 60
 15 minutos a 37°C. Se añadieron 100 µL por pocillo de anticuerpo de detección anti-hCCL2 diluido 500x en tampón de ensayo y la placa se incubó durante 45 minutos a 37°C. Se añadieron 100 µL por pocillo de 50 ng/mL estreptavidina-HRP en tampón de ensayo y la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron 100 µL por pocillo de la solución de sustrato preparada y la placa se incubó a
 20 temperatura ambiente, protegida de la luz hasta que el color azul apareció en los pocillos. Para detener la aparición de color se añadieron 100 µL por pocillo de ácido sulfúrico 1M. Se leyó la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector de placas.

2.4.3 Análisis de los datos

25 Se analizaron los resultados de ELISA (absorbancia a 450 nm) usando el software Microsoft Excel. De todos los valores se restó el promedio de blanco. Se graficó la curva normal con diluciones seriadas de estándares (pg/mL) en el eje de las X y

los valores de absorbancia correspondientes en el eje de las Y. La cantidad de citocina en las muestras (pg/mL) se calculó a partir de la curva normal. Se calcularon los porcentajes de inhibición normalizando los datos a los controles usando la siguiente ecuación:

$$5 \quad [(Muestra - Control\ bajo)/(Control\ Alto - control\ bajo)] * 100$$

Se determinaron los valores CI_{50} de los compuestos graficando los porcentajes de inhibición y el logaritmo de las concentraciones de los compuestos usando el software GraphPad Prism, regresión no lineal (ajuste de curvas), log (inhibidor) vs. respuesta - Pendiente variable (cuatro parámetros).

10 **3. Ensayos in vivo**

3.1 Hipersensibilidad en ratas inducida por CFA (adyuvante completo de Freund) evaluada usando el método de capacidad de soporte de peso

La inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund (CFA) provoca una reacción inflamatoria que induce hipersensibilidad y edema, e imita algunos
15 aspectos del dolor inflamatorio clínico. Estos efectos se pueden investigar usando equipos para medir la capacidad de soportar peso y un pletismómetro.

3.1.1 Capacidad de soportar peso

Las ratas no sometidas a tratamiento distribuyen su peso corporal de manera
20 equilibrada entre sus dos patas traseras. Sin embargo, cuando la pata trasera (izquierda) inyectada está inflamada y/o duele, el peso se redistribuye de modo que menos peso recaiga sobre la pata afectada (disminución de la capacidad de soportar peso en la pata dañada). Se midió la capacidad de soportar peso a través de cada pata trasera usando un medidor de incapacidad en ratas (Linton
25 Instruments, R.U.).

Las ratas se colocaron en el medidor de incapacidad con las patas traseras sobre sensores separados y se registró la fuerza promedio ejercida por ambas patas traseras a lo largo de 4 segundos.

- Se tomaron lecturas de la capacidad de soportar peso y el volumen de las patas en el momento inicial y se indujo hipersensibilidad mediante inyección de CFA (los registros de la capacidad de soportar peso y el volumen de las patas iniciales se tomaron antes de la inducción del estímulo agresivo). Se indujo la hipersensibilidad inflamatoria por inyección intraplantar de CFA (100 μ L de solución 1 mg/mL) en las patas traseras izquierdas de las ratas.
- 10 Los animales (machos de ratas Sprague Dawley (Charles River, R.U.), 212-260g) se clasificaron y se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de acuerdo con la ventana de capacidad de soportar peso CFA en un diseño de cuadrados Latinos. Los animales fueron tratados con Vehículo, Compuesto 1 10 mg/kg o Indometacina 10 mg/kg (10LI/kg dosis volumen) 24 horas después de
- 15 CFA. La capacidad de soportar peso se midió a 1, 2 y 4 horas después del tratamiento. Se tomaron para ambas patas traseras izquierda y derecha las lecturas de la capacidad de soportar peso (g) y se calculó la diferencia. Los datos se expresan como % de reversión de la hipersensibilidad al dolor (media $\pm$ ESM). Se tomaron lecturas del volumen de las patas (mLI) de las patas traseras
- 20 izquierdas. Los datos se expresan como % de la reversión del edema (media $\pm$ ESM). El análisis estadístico se realizó con mediciones repetidas ANOVA seguidas de ensayo de comparación Planned usando InVivoStat (invivostat.co.uk, Clark y colaboradores, 2012), $p < 0,05$ se consideró significativo.
- El Compuesto 1 y la indometacina (10mg/kg) inhibieron significativamente la
- 25 respuesta a la hipersensibilidad en todos los intervalos de tiempo ensayados después de la administración.

3.2 Hiperalgesia inducida por MIA en el modelo de dolor crónico en ratas *in vivo*

La administración intra-articular de yodoacetato monosódico (MIA) en la rodilla ipsilateral de ratas Sprague Dawley conduce al desarrollo de una fuerte y duradera hiperalgesia y alodinia asociadas inicialmente con una respuesta inflamatoria. El desarrollo de estos signos en este modelo animal se considera clínicamente importante, y refleja los síntomas exhibidos por pacientes que presentan dolor inflamatorio crónico con afecciones subyacentes tales como oosteoartritis (OA) o artritis reumatoidea (Bove SE et al., Osteoarthritis Cartilage 2003; 11 (11): 821-30; Fernihough J, et al., Pain 2004; 112 (1-2): 83-93; Kalbhen DA. J Rheumatol 1987; 14 Spec No: 130-1).

Capacidad de soportar peso

Las ratas no sometidas a tratamiento distribuyen su peso corporal de manera equilibrada entre sus dos patas traseras. Sin embargo, cuando la rodilla trasera (izquierda) inyectada está inflamada y/o duele, el peso se redistribuye de modo que menos peso recaiga sobre la extremidad afectada (disminución de la capacidad de soportar peso en la extremidad dañada). Se midió la capacidad de soportar peso a través de cada extremidad trasera usando un medidor de incapacidad en ratas (Linton Instruments, R.U.).

Se indujo osteoartritis (OA) en ratas ((Sprague Dawley, machos, grupos de 10) mediante inyección de solución MIA (Sigma, I2512), 25 µL de 80 mg/mL, (2 mg) en la articulación de la rodilla de la pata izquierda trasera. Se evaluó la capacidad de soportar peso en los Días 3, 5, 7, 9, 12 y 16, luego de la infección con MIA, para el desarrollo de dolor crónico. En el Día 3 se tomaron mediciones de la capacidad de soportar peso y los animales fueron clasificados y distribuidos aleatoriamente en grupos de acuerdo con su ventana MIA en un diseño de cuadrados Latinos.

Los animales fueron tratados con el Compuesto 1 10 mg/kg en metilcelulosa 0,5% o Vehículo (metilcelulosa 0,5%) 10 mL/kg por vía oral en el día 3 y luego diariamente hasta el día 16. Se tomaron mediciones de la capacidad de soportar peso 1, 2 y 4 horas después de la dosificación en el día 3 y 2 horas después de la dosificación en los días 5, 7, 9, 12 y 16.

Se tomaron lecturas de la capacidad de soportar peso (g) de ambas patas traseras derecha e izquierda y se calculó la diferencia. Los datos se expresan como relación % ipsilateral/contralateral ((CSP izquierda/CSP derecha)*100 (media $\pm$ ESM)

10 Cálculo: Lectura ipsilateral/lectura contralateral x 100. La diferencia CSP sin tratamiento - diferencia CSP pre dosis se definió como la ventana MIA.

Análisis estadístico: Mediciones repetidas ANOVA seguidas de ensayo de comparación Planned usando InVivoStat (invivostat.co.uk), ($p < 0,05$ se consideró significativo). Los datos se analizaron mediante la comparación de grupos de tratamiento con grupos de vehículo de control en cada intervalo de tiempo.

Una significativa y marcada reversión de la hipersensibilidad se observó con el Compuesto 1 cuando se dosificó a razón de 10 mg/kg a partir de 1 hora después de la dosificación, hasta el día 12 (9 días después de la dosificación). El Compuesto 1 administrado a razón de 10 mg/kg mostró reversión significativa en comparación con el vehículo en cada intervalo de tiempo, comparable con el control positivo celecoxib.

3.3 Modelo de fibrosis hepática CCl₄ – Protocolo 1

El objetivo de este estudio fue evaluar un modelo de fibrosis hepática por intoxicación con CCl₄. Se evalúan la aparición de la enfermedad y el efecto de potenciales referencias positivas por la evaluación de la fibrosis hepática mediante exploración histológica, bioquímica, estudios de imágenes y expresión génica en diferentes intervalos de tiempo. Starkel P., Animal models for the study

of hepatic fibrosis, Best practice & Research Clinical Gastroenterology 25: 319-333, 2011

3.3.1 Grupos de estudio:

El estudio se realiza usando ratones BalbC machos de 5 semanas de edad

5 (Janvier Lab).

Grupos	Protocolo	n*	Tratamiento	Sacrificio
Simulación	Aceite de oliva IP dos veces por semana	10		3 semanas
CCl₄	0,6 mL/kg IP dos veces por semana	10		3 semanas
Simulación	Aceite de oliva IP dos veces por semana	10		6 semanas
CCl₄	0,6 mL/kg IP Dos veces por semana	10		6 semanas
CCl₄	0,6 mL/kg IP dos veces por semana	10	Compuesto de ensayo 30 mg/kg, <i>b.i.d.</i> , <i>vía oral</i>	6 semanas
CCl₄ + ácido	0,6 mL/kg IP dos veces	10	Control positivo (Ácido valproico)	6 semanas

Grupos	Protocolo	n*	Tratamiento	Sacrificio
valproico	por semana		<i>ad libitum</i> agua potable 0,4%	

3.3.2 Materiales:

CCl₄ : Tetracloruro de carbono ACROS 99,8% CAS= 56-23-5 Lote A0293900

Aceite de oliva, SIGMA O1514-500 mL Lote Nro. BCBQ4885V

- 5 colF (ImmunoChemistry Technologies), ref. 6346 Lote 13Y39 Exp. 05/2017
solución madre para diluir en 100 µL de DMSO (6,8 mM) y almacenar a 4°C.
inyección de dilución 1:170 en agua PPI al animal 15 min antes de la toma de imágenes (100 µL, senos i.v.)
- 10 Se diluyó CCl₄ a 1/2 en aceite de oliva y se administró IP dos veces por semana a razón de 0,6 mL/kg.

3.3.2 Muestras y resultados

- La sangre se recolecta en tubos para suero y las muestras se centrifugan a 3.000t/min durante 5 min y se congelan a -20°C para evaluaciones de AST, ALT, ALP y bilirrubina total. También se toma una muestra del lóbulo medial derecho del hígado y se coloca rápidamente en tubos Eppendorf (2 mL fondo redondo) con 1 mL de RNeasy lysis buffer (tubos con cierre de seguridad) almacenados a 4°C.

- El hígado se extrae y se pesa. Se realiza inmediatamente la toma de imágenes *ex vivo* de la unión de colF en el hígado (Bruker Xtreme). Los hígados se colocan en formaldehído (vial 25 mL-60cc) para evaluación histológica para cuantificación IHQ de aSMA y col I.

Los bazo se pesan para análisis futuro.

Se utilizó un panel de 9 genes de fibrosis para análisis de expresión génica.

3.4 Modelo de fibrosis hepática CCl₄ – Protocolo 2

El objetivo de este estudio fue evaluar un modelo de fibrosis hepática por intoxicación con CCl₄. Se evalúan la aparición de la enfermedad y el efecto de potenciales referencias positivas por la evaluación de la fibrosis hepática mediante exploración histológica, biquímica, estudios de imágenes y expresión génica en diferentes intervalos de tiempo. Starkel P., Animal models for the study of hepatic fibrosis, Best practice & Research Clinical Gastroenterology 25: 319-333, 2011

3.4.1 Grupos de estudio:

El estudio se realiza usando ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad (Charles River, Italia).

Grupo	N	Estimulación/ Vía IP	Vehículo	Tratamiento	Vía y frecuencia del tratamiento	Programa de tratamiento
1	10	Negativo	-	-	-	-
2	10	CCl ₄ IP (0,6 mL/kg) 2 x semana D0 – D38	MC 0,5% + 1 HCl eq, agua dest. 98,9 %	Vehículo	PO BID	D21 – D41
3	10		MC 0,5%	Compuesto 1 5 mg/kg	PO QD	
4	10		MC 0,5%	Compuesto 1 15 mg/kg	PO QD	

5	10		MC 0,5%	Compuesto 1 15 mg/kg	PO BID	
----------	-----------	--	---------	--	-----------	--

3.4.2 Materiales:

Se añadirá CCl₄ (líquido) al aceite de oliva con una concentración de 0,06 mL/mL. La solución se administrará IP con una dosis de 0,6 mL/kg. El volumen de aplicación será 10 mL/kg.

El compuesto de ensayo se disolverá/suspenderá en metilcelulosa (MC 0,5%).

3.4.3 Muestras y resultados

Para la farmacocinética del estado estacionario se recolectarán muestra de sangre en tubos He-Litio para generar plasma. Todas las muestras de sangre se procesarán para obtener plasma mediante centrifugación (5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C) dentro de los 30 minutos de la recolección. Luego las muestras se almacenarán a -80°C hasta su análisis.

Las muestras de sangre finales se recolectarán en microtubos EDTA K₂ mediante el corte de la vena yugular. Todas las muestras de sangre se procesarán para obtener plasma mediante centrifugación (3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C) dentro de los 30 minutos de la recolección. El plasma de cada muestra de sangre se almacenará a -80°C hasta su análisis.

El hígado se extrae y porciones del lóbulo lateral izquierdo se almacenan para análisis de expresión génica de RNA, sección de medición de OH prolina, y el resto se coloca en formalina 10% para evaluación histopatológica.

Se usa un panel de 5 genes de fibrosis (Col1, Timp1, Pai1, Snail1, Acta2) para análisis de expresión génica.

3.5 Modelo de esteatohepatitis y fibrosis deficiente de colina y metionina

MCD es un nuevo modelo de ratón de esteatohepatitis y fibrosis inducida por una dieta: deficiente de metionina y colina (MCD). (Wehr y colaboradores 2013 J immunol, 190(10):5226-36; Baeck y colaboradores, 2014 Hepatology, 59(3):1060-72; Gautheron y colaboradores, 2014 EMBO, 6(8):1062-74).

3.5.1 Grupos de estudio y régimen de dosificación:

Ratones C57BL/6 de Janvier Labs (Francia) se dividen en grupos como se indica a continuación, los ratones tienen 8 semanas (>20grs) al inicio de la fase de inducción.

Dietas/ grupos	Proyecto	n	Frecuencia y vía	Vehículo	Aspecto
Dieta de control	Grupo de referencia	10	BID vía oral	PEG200/MC (25/75) + 1eqHCl	
Dieta MCD	Grupo de referencia	10	BID vía oral	PEG200/MC (25/75) + 1eqHCl	
Dieta MCD	Compuesto de ensayo	10	BID vía oral	PEG200/MC (25/75)	Suspensión homogénea

3.5.2 Materiales y compuestos

- Dieta MCD sin colina ni metionina Ref. EFTD.90262 MCD mod. lote 8206423, Ssniff, Soest, Alemania –
- Metilcelulosa 0,5%, VWR,
- PEG 400: P3265, Sigma
- Cryomold® Standard 25 x 20 x 5 mm (Sakura Finetec, 4557)

- O.C.T.™ Compound cryomold (Sakura Finetec, 4583)
- Formalina para preservación de muestras - tamponada 4% con MetOH

3.5.3 Preparación de Compuestos:

- 5 Los Compuestos se disuelven/suspenden en un vehículo apropiado (ver la tabla a continuación), con agitación. Después de la preparación, las soluciones/suspensiones se mantienen a temperatura ambiente en la oscuridad bajo agitación magnética constante. Cuando se dosifica se usan 10mL / kg y la concentración de la solución se ajusta de acuerdo con el peso del animal.

10

3.5.4 Protocolo:

La fase de inducción es de 3 semanas. No se proporciona glucosa en ayuno. A los ratones se les proporciona la dieta de control MCD o la dieta MCD.

- Durante la fase de tratamiento los ratones son mantenidos en la dieta de control MCD o en la dieta MCD como en la fase de inducción. Los ratones se asignan aleatoriamente a un grupo de tratamiento de acuerdo con su peso corporal a fin de asegurar una repartición homogénea. A los ratones se los dosifica con una dosis diaria o dos dosis al día del compuesto de ensayo durante la fase de evaluación

20 **3.6 Modelo de ratones de 14 días de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina profiláctica**

El objetivo de este estudio es ensayar la eficacia de un compuesto de ensayo con tres dosis diferentes en un modelo de 14 días de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones.

25 **3.6.1 Animales**

Este estudio se lleva a cabo en ratones machos C527BL/6N, suministrados por Charles River, Italia, que se aclimataron durante al menos 5 días en un ambiente

mantenido a 22°C, con 55% de humedad relativa, con 15-20 cambios de aire por hora con ciclos de luz de 12 h. Se proporciona a los ratones alimento en gránulos y agua *ad libitum*.

- Al menos un día antes del inicio del experimento, todos los animales son asignados aleatoriamente a grupos según se indica en la tabla a continuación.

Toda la investigación relacionada con animales se realiza de conformidad con la norma 2010/63/EU y la legislación de los EE.UU. que regula el uso de animales de laboratorio en la investigación científica y para otros fines (Boletín Oficial 55/13).

10 3.6.2 Grupos de estudio

Grupos	Propósito	n	Dosis	Días del esquema de tratamiento (frecuencia)	Vía	Vehículo
1 PBS + Vehículo	control	15	-	D0-D14 (BID)	NA	NA
2 BLM + Vehículo	control	15	-	D0-D14 (BID)	PO	PEG/MC
3 BLM+ Pirfenidona	control	15	50 mg/kg	D0-D14 (BID)	PO	Nastrosol 0,1%
4 BLM+ compuesto de ensayo	Activo	15	1 mg/kg	D0-D14 (BID)	PO	PEG400/MC 0,5% 20/80 (v/v)

Grupos	Propósito	n	Dosis	Días del esquema de tratamiento (frecuencia)	Vía	Vehículo
5 BLM+ compuesto de ensayo	Activo	15	3 mg/kg	D0-D14 (BID)	PO	PEG400/MC 0,5% 20/80 (v/v)
6 BLM+ compuesto de ensayo	Activo	15	10 mg/kg	D0-D14 (BID)	PO	PEG400/MC 0,5% 20/80 (v/v)
7 BLM+ compuesto de ensayo satélite para PK	Activo	10	10 mg/kg	D0-D7 (BID)	PO	PEG400/MC 0,5% 20/80 (v/v)

3.6.3 Materiales

El disolvente para las soluciones de ensayo se preparó añadiendo 0,5 g de hidroxietilcelulosa (Natrosol) a 500 mL de agua destilada (0,1%) con agitación continua sin calentamiento durante 5 h en un agitador magnético.

La solución anestésica se preparó añadiendo 1 mL de Narketan (Narketan 10, Vetoquinol, Bern, Suiza, 03605877535982) y 0,5 mL de Rompun (Rompun, 2%: Bayer, Leverkusen, Alemania) en 9 mL de solución salina. La solución obtenida se administró a razón de 10 mL/kg.

Para preparar una solución para estimulación intranasal (i.n.), se descongelan 0,8 mg/mL de soluciones madre de bleomicina (sulfato de bleomicina, Enzo Life Sciences, Inc., EE.UU.; CAS Nro. 9041-93-4; Nro. de Cat. BML-AP302-0010) y se diluyen en 330 µL de solución salina.

- 5 Antes de la administración i.n., los ratones son anestesiados i.p. con la solución anestésica descrita anteriormente.

Se prepara diariamente una formulación de pirfenidona nueva en formulaciones de Natrosol 0,1% hasta una concentración final de 5 mg/mL. Antes de la dosificación, los animales se pesan y la cantidad de pirfenidona administrada se
10 ajusta de acuerdo con los pesos individuales correspondiendo a 10 mL/kg de peso corporal, dos veces al día, por vía oral, con un intervalo de 7,5 h entre dos administraciones.

Finalmente, se preparan las soluciones del compuesto de ensayo disolviendo la cantidad adecuada de dicho compuesto de ensayo en PEG 400 (20% del volumen
15 final) luego MC 0,5% (80% del volumen final) para alcanzar concentraciones finales de 1 mg/mL, 0,3 mg/mL y 0,1 mg/mL, proporcionando así compuesto para dosis de 10 mg/kg, 3 mg/kg y 1 mg/kg. Antes de la dosificación, los animales se pesan y la cantidad administrada se ajusta de acuerdo con los pesos individuales. El volumen de aplicación de las dosis de ensayo corresponde a 10 mL/kg de peso
20 corporal, y los compuestos de ensayo se administran por vía oral dos veces al día, con un intervalo de 7,5 h entre dos administraciones.

3.6.4 Estudio

Los animales son examinados clínicamente dos veces al día. La lista de signos y parámetros clínicos se indican en una tabla de puntos de referencia humanos. Los
25 animales son pesados diariamente comenzando a partir de D0.

En el día 14, dos horas después de la dosis con pirfenidona o el compuesto de ensayo, los ratones son sacrificados mediante una sobredosis de anestésico.

Se extraen los pulmones y se pesan individualmente. Para todos los grupos: el lóbulo pulmonar derecho superior completo se coloca en un tubo Precellys que contiene microesferas de sílice y se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se somete a análisis de expresión génica.

- 5 Todos los pulmones restantes se colocan en botellas marcadas que contienen formalina tamponada 10% para ulterior evaluación histopatológica.

3.6.5 *Análisis de muestras, procesamiento de datos y evaluación estadística*

- Los datos de peso corporal y los datos del peso pulmonar se procesaron usando Excel MS. El análisis estadístico y la representación gráfica se realizaron usando
10 el software GraphPad Prism (versión 5.04).

Para los pesos pulmonares se emplearon un ANOVA de una vía o el ensayo de Mann-Whitney.

Se emplearon ANOVA de dos vías para los cambios de pesos corporales.

- Las diferencias entre los grupos se considerarán con significación estadística
15 cuando $p < 0,05$.

Para la evaluación histopatológica, se embeben los pulmones completos (excepto la muestra del pulmón superior derecho) en parafina y se tiñen con tinción tricrómica de Mallory.

- Los cambios histológicos en los pulmones se evalúan usando la modificación de
20 Matsuse de la puntuación de Ashcroft (Ashcroft y colaboradores, 1988; Matsuse y colaboradores, 1999). El análisis estadístico y la representación gráfica se realizaron usando el software GraphPad Prism (versión 5.04). Se emplea el ensayo de Mann-Whitney.

- Las diferencias entre los grupos se considerarán con significación estadística
25 cuando $p < 0,05$.

	Puntuación de Ashcroft
1	Pulmones normales (sin fibrosis)

2	Engrosamiento fibrótico mínimo de las paredes alveolares o bronquiales (red de fibrillas finas de colágeno)
3	Engrosamiento fibrótico moderado de las paredes sin daño evidente de la arquitectura pulmonar
4	Fibrosis con daño de la estructura pulmonar (bandas de fibras gruesas o pequeñas masas fibrosas, fibrillas de colágeno intra-alveolares)
5	Área de fibras largas con grave distorsión de la estructura pulmonar

3.6.6 *Análisis PK - Grupo 7*

3.6.6.1 *Protocolo*

Solo los animales en el grupo 7 (n=10) se incluyen para estudio PK y no están
5 sujetos a puntaje de signos clínicos.

A estos animales se les induce la enfermedad al inicio del tratamiento el día 0 y son sacrificados secuencialmente en el día 7 luego de 1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 24 h después de la primera administración del compuesto de ensayo.

Se toma una muestra de sangre (50 μ L) de la vena de la cola en tubos con
10 anticoagulante Li-heparina en cada intervalo de tiempo y se mantiene en hielo hasta la separación. Dentro de un período máximo de 30 min después de la recolección, las muestras de sangre son centrifugadas a 2.000 g durante 10 min a 4°C y las muestras de plasma obtenidas se separan en alícuotas en tubos de polipropileno (1x 25 μ L). Las muestras se almacenan congeladas a -20°C hasta el
15 análisis.

El tejido pulmonar se recolecta al momento del sacrificio después de tomar las muestras de sangre de cada animal, luego de pesa y se coloca en tubos de polipropileno antes de congelarlos. Las muestras se almacenan congeladas a -80°C hasta el análisis.

3.6.6.2 *Concentración en plasma y análisis farmacocinético*

El plasma y las concentraciones pulmonares se miden mediante LC-MS/MS. Las muestras se preparan para análisis LC-MS/MS mediante la precipitación de proteínas. Las concentraciones en plasma que se miden por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) se informan como debajo del límite de cuantificación (BLQ).

Las concentraciones del compuesto de ensayo en plasma se expresan en ng/mL. Se calculan las concentraciones medias de plasma. Para el cálculo de la media, las concentraciones por debajo de LLOQ se establecen en cero. Por lo tanto, los valores de la media pueden ser BLQ. El desvío estándar (DS), el error estándar de la media (ES) y el coeficiente de variación (CV, %) se tabulan cuando al menos tres valores de concentración de plasma están por arriba de LLOQ.

El análisis no compartimental sobre las concentraciones individuales de plasma se realiza usando PhoenixTM WinNonlin[®] 6.3 (Pharsight Corporation) para determinar al menos, los siguientes parámetros farmacocinéticos:

Concentración máxima en plasma, C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) con el tiempo correspondiente, t_{max} (h),

Área bajo la concentración en plasma frente a la curva de tiempo hasta la última concentración cuantificable AUC_{0-t} o hasta AUC_{0-24h} ($\mu\text{g.h/mL}$) (si el compuesto es cuantificable hasta 24 h después de la dosificación), y/o hasta infinito $AUC_{0-\infty}$, ($\mu\text{g.h/mL}$) se calcula de acuerdo con la regla del trapecio lineal arriba/logarítmica abajo. Si se lo considera necesario se puede calcular el AUC parcial. Las concentraciones por debajo del límite de cuantificación (BLQ) se establecen en cero. No se calcula el AUC si existen menos de tres intervalos cuantificables. Se considera $AUC_{0-\infty}$ si $\%AUC_{extra} < 20\%$.

La semivida de eliminación terminal aparente, $t_{1/2}$ (h) solo se informa si tres o más intervalos de tiempo, excluyendo t_{max} se usan para regresión lineal, y si la R^2 ajustada es $> 0,80$.

AUC normalizada y dosis C_{max} .

- 5 Se calculan los parámetros farmacocinéticos medios. La desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV, %) se tabulan si al menos están disponibles tres valores.

3.7 modelo CIA

10 3.7.1 *Materiales*

El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) se compraron a Difco. El colágeno bovino tipo II (CII), los liposacáridos (LPS), y Enbrel se obtuvieron de Chondrex (L'Isle-d'Abeau, Francia), Sigma (P4252, L'Isle-d'Abeau, Francia), Wyeth (jeringa inyectable 25 mg, Francia) Acros

- 15 Organics (Palo Alto, CA), respectivamente. Todos los demás reactivos usados son de grado reactivo y todos los disolventes son de grado analítico.

3.7.1 *Animales*

Las ratas negras Agouti (machos, 7-8 semanas de edad) se obtuvieron de Harlan Laboratories (Maison-Alfort, Francia). Las ratas se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz/oscuridad (0700 - 1900). La temperatura se mantuvo a 22°C, y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*.

3.7.3 *Artritis inducida por colágeno (CIA)*

- 25 Un día antes del experimento, se preparó una solución CII (2 mg/mL) con 0,05 M de ácido acético y se almacenó a 4 °C. Inmediatamente antes de la inmunización, se mezclaron volúmenes iguales de adyuvante (IFA) y CII con un

homogeneizador en una botella de vidrio previamente enfriada en un baño de agua helada. Si no se forma una emulsión se puede requerir adyuvante extra y homogeneización prolongada. Se inyectaron 0,2 mL de la emulsión intradérmicamente en la base de la cola de cada rata en el Día 1, una segunda
 5 inyección intradérmica de refuerzo (solución de CII a razón de 2 mg/mL en solución salina CFA 0,1 mL) se aplica en el día 9. Este método de inmunización está modificado en relación con los métodos publicados (Jou et al. 2005; Sims et al. 2004).

3.7.4 *Diseño del estudio*

10 Los efectos terapéuticos de los compuestos se ensayaron en el modelo CIA de rata. Las ratas se dividen aleatoriamente en grupos iguales y cada grupo contiene 10 ratas. Todas las ratas se inmunizan en el Día 1 y reciben un refuerzo en el Día 9. La dosis terapéutica duró desde el Día 16 hasta el Día 30 El grupo de control negativo es tratado con vehículo y el grupo de control positivo con Enbrel (10
 15 mg/kg, 3x/semana, s.c.). Un compuesto de interés generalmente se ensaya en 4 dosis, por ejemplo, 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg, por vía oral.

3.7.5 *Evaluación clínica de artritis*

Se le asigna un puntaje a la artritis de acuerdo con los métodos descritos en la bibliografía especializada (Khachigian 2006 Nat Protoc. 2006;1(5):2512-6; Lin y
 20 colaboradores 2007, Br J Pharmacol, 150, pp862-872; Nishida y colaboradores 2004, Arthritis and Rheumatism, 50(10), pp3365-3376). La hinchazón en cada una de las cuatro patas se clasifica según el puntaje artrítico como sigue: 0 - sin síntomas; 1 - leve, pero enrojecimiento definido e hinchazón de un tipo de articulación tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón
 25 evidentes limitados a dedos individuales, independientemente de la cantidad de dedos afectados; 2 - enrojecimiento e hinchazón moderados de dos o más tipos de articulaciones; 3 - grave enrojecimiento e hinchazón de toda la pata inclusive

los dedos; 4 - extremidad inflamada al máximo con compromiso de múltiples articulaciones (puntaje de artrosis clínica acumulado máximo 16 por animal) (Nishida y colaboradores, 2004).

Para permitir el meta-análisis de múltiples estudios los valores de los puntajes clínicos se pueden normalizar como sigue:

AUC del puntaje clínico (puntaje AUC): Se calculó el área bajo la curva (AUC) desde el Día 1 hasta el Día 14 para cada rata individual. El AUC de cada animal se divide por el AUC promedio obtenida para el vehículo en el estudio del cual se obtuvieron los datos de ese animal y se multiplica por 100 (es decir, el AUC se expresa como un porcentaje del AUC del vehículo promedio por estudio).

Aumento del puntaje clínico desde el Día 1 hasta el Día 14 (puntaje del criterio de valoración): La diferencia del puntaje clínico para cada animal se divide por la diferencia del puntaje clínico promedio obtenida para el vehículo en el estudio del cual se obtuvieron los datos para ese animal y se multiplica por 100 (es decir, la diferencia se expresa como un porcentaje de la diferencia del puntaje clínico promedio para el vehículo por estudio).

3.7.6 Cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis

Clínicamente, la pérdida de peso corporal está asociada con la artritis (Rall & Roubenoff 2004 Rheumatology (Oxford); 43(10):1219-23; Shelton y colaboradores, 2005 Pain ;116(1-2):8-16; Walsmith y colaboradores, 2004 J Rheumatol. ;31(1):23-9). Por lo tanto, los cambios en el peso corporal después de la aparición de la artritis se pueden usar como un criterio de valoración no específico para evaluar el efecto de los agentes terapéuticos en el modelo de rata. El cambio en el peso corporal (%) después de la aparición de la artritis se calcula como sigue:

$$\text{Ratones: } \frac{\text{Peso corporal (semana 6)} - \text{Peso corporal (Semana 5)}}{\text{Peso corporal (Semana 5)}} * 100\%$$

$$\text{Ratas: } \frac{\text{Peso corporal (semana 4)} - \text{Peso corporal (Semana 3)}}{\text{Peso corporal (Semana 3)}} * 100\%$$

3.7.7 Radiología

- 5 Se toman radiografías de las patas traseras de cada animal individual. Se asigna un número de identidad aleatorio enmascarado a cada una de las fotos, y dos evaluadores independientes le asignan un puntaje a la gravedad de la erosión ósea con el sistema de puntaje radiológico de Larsen como sigue: 0 - normal con márgenes óseos intactos y espacio articular normal; 1 - ligera anormalidad con
- 10 uno o dos de los huesos metatarsales exteriores con signos de leve erosión ósea; 2 - definida anormalidad temprana con tres a cinco de los huesos metatarsales exteriores con signos de erosión ósea; 3 - anormalidad destructiva media con la totalidad de los huesos metatarsales como así también cualquiera o dos de los huesos metatarsales interiores con signos definidos de erosiones óseas; 4 -
- 15 anormalidad destructiva grave con todos los huesos metatarsales con signos definidos de erosión ósea y al menos una de las articulaciones metatarsales internas completamente erosionada dejando solo algunos márgenes de articulaciones óseas parcialmente conservados; 5 - anormalidad mutilante sin márgenes óseos. Este sistema de puntaje es una modificación de los protocolos
- 20 de la bibliografía especializada (Bush y colaboradores 2002, Arthritis and Rheumatism, 46(3), 802-805; Jou y colaboradores 2005, Arthritis Rheum, 52(1), 339-44; Salvemini y colaboradores, 2001, Arthritis Rheum, 44(12), 2909-21; Sims y colaboradores, 2004, Arthritis Rheum, 50(7), 2338-46).

3.7.8 Histología

- 25 Después del análisis radiológico, las patas traseras de los ratones se fijaron en formalina tamponada con fosfato 10% (pH7,4), se descalcificaron con descalcificador óseo rápido para análisis histológico fino (EUROBIO, Les Ulis,

Francia) y se embebieron en parafina. Para asegurar la evaluación extensiva de las articulaciones artríticas, se cortaron al menos cuatro series de secciones (5 μm de espesor) y cada serie de secciones estaba separada por 100 μm . Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los exámenes histológicos para determinar la inflamación sinovial y el daño óseo y de los cartílagos se realizaron con enmascaramiento doble. En cada pata se evaluaron cuatro parámetros usando una escala de cuatro puntos. Los parámetros fueron infiltración celular, gravedad del pannus, erosión de cartílagos y erosión ósea. El puntaje se realizó como sigue: 1-normal, 2-leve, 3-moderado, 4-marcado. Los cuatro puntajes se suman entre sí y se representan como un puntaje adicional, a saber el "puntaje total del AR".

3.7.9 *Análisis por tomografía micro-computada (μCT) del calcáneo (hueso del talón)*

La degradación ósea observada en el AR ocurre especialmente en el hueso cortical y se puede revelar mediante análisis (μCT)(Oste y colaboradores, 2007; Sims y colaboradores, 2004). Después del barrido y la reconstrucción de volumen 3D del hueso calcáneo, se mide la degradación ósea como la cantidad de objetos discretos presentes por imagen, aislados *in silico* perpendiculares al eje longitudinal del hueso. Cuanto más degradado está el hueso, mayor es la cantidad de objetos discretos medidos. Se analizaron mil cortes, distribuidos de forma pareja en el calcáneo (separados por aproximadamente 10,8 μm).

3.7.10 *PK del estado estacionario*

En Día 7 o después, se recolectaron muestras de sangre en el seno retro-orbital con heparina de litio como anticoagulante en los siguientes intervalos de tiempo: predosis, 1, 3 y 6 h. Las muestras de sangre completa se centrifugaron y las muestras de plasma obtenidas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. Las concentraciones en plasma de cada compuesto de ensayo se

determinaron mediante un método LC-MS/MS en el cual el espectrómetro de masas es operado en modo de electroaspersión positiva. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando WinNonlin® (Pharsight®, EE.UU.) y se asume que los niveles en plasma predosis son iguales a los niveles en plasma a las 24 h.

3.8 *Modelo MAB*

El modelo MAB permite una rápida evaluación de la modulación de una respuesta inflamatoria del tipo AR mediante agentes terapéuticos Khachigian, 2006. Los ratones DBA/J se inyectaron i.v. con un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el colágeno II. Un día más tarde, se inició el tratamiento con el compuesto. Tres días más tarde, los ratones recibieron una inyección i.p. LPS (50 µg/mouse), que dio por resultado la rápida aparición de inflamación. El tratamiento con el Compuesto continuó hasta 10 días después de la inyección de anticuerpos monoclonales. La inflamación se lee por la medición de la hinchazón de las patas y registrando el puntaje clínico de cada pata. Se presenta el puntaje de artritis clínica acumulado de cuatro extremidades para mostrar la gravedad de la inflamación. Se aplica un sistema de puntajes a cada extremidad usando una escala de 0-4, donde 4 es la inflamación más grave.

0 Libre de síntomas

1 Enrojecimiento e hinchazón leves pero definidos de un tipo de articulación tal como el tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón evidentes limitados a dedos individuales, independientemente de la cantidad de dedos afectados

2 Enrojecimiento e hinchazón moderados de dos o más tipos de articulaciones.

3 Enrojecimiento e hinchazón graves de toda la pata, incluidos los dedos.

4 Extremidad inflamada al máximo con compromiso de múltiples articulaciones

3.9 Modelo de rata menisectomizada (MNX) in vivo

5 3.9.1 Eficacia in vivo en el modelo de rata MNX

Se estudió la eficacia in vivo en un modelo de rata menisectomizada (MNX) Lewis hembra. El modelo de rata MNX es un modelo de enfermedad ampliamente validado de osteoartritis (Bendele, 2001, J Musculoskel Neuron Interact, 1(4), 377-85; Janusz y colaboradores, 2002, Osteoarthr Cartilage, 10, 785-91; Pritzker y
10 colaboradores, 2006, Osteoarthr Cartilage, 14, 13-29).

3.9.2 Cirugía y dosificación

La osteoartritis fue inducida por menisectomía en el Día 0 (D0) en la pata derecha de cada rata mediante una transección del ligamento colateral medial y se extrajeron 4 mm de ligamento. La parte interna del menisco se transectó
15 verticalmente en dos colgajos que se empujaron hacia la parte anterior y posterior de la cavidad sinovial. Los animales para simulación solo recibieron anestesia, incisión en la piel y en los músculos y luego sutura. En el Día 1, las ratas se asignaron aleatoriamente a un grupo de tratamiento (n=20 por grupo) de acuerdo con su peso corporal, a fin de obtener una distribución homogénea. Desde C2 a
20 D21, las ratas fueron dosificadas por vía oral una vez al día (qd) o dos veces al día (bid) con compuestos formulados en metilcelulosa (MC) 0,5% o en HP β CD 10% pH 3,0.

3.9.3 Determinación de PK en estado estacionario (ssPK)

Después de al menos 7 días de tratamiento, se tomaron muestras de sangre en 4
25 intervalos de tiempo posteriores a la administración: 0, 1, 3 y 6 h (y asumiendo que 24 h es igual a la muestra previa a la dosis), a fin de determinar la exposición en plasma en estado estacionario.

3.9.4 Histología

- En el momento del sacrificio, se recoge y procesa para análisis histológico la tibia derecha de cada rata. Después de 48 h de fijación en formaldehído 4%, las tibias se descalcificaron en Osteosoft durante 7 días, y se cortaron en dos mitades
- 5 antes de embeberlas enfrentadas entre sí en parafina. Se cortaron cinco series de secciones a intervalos de 200 μ m, cubriendo aproximadamente 1,5 mm de la parte media del hueso. Una serie de portaobjetos se tiñó con Safranin O y verde claro para evaluación morfológica y puntuación OARSI. Las otras series de portaobjetos se montaron con DAPI para medir la densidad de condrocitos.
- 10 El alcance del daño al cartílago que refleja osteoartritis en la meseta tibial se evaluó y se le asignó un puntaje usando el método OARSI basado en la gradación y el estadio de la lesión del cartílago (Pritzker y colaboradores, 2006). El puntaje OARSI es asignado con enmascaramiento por dos lectores diferentes. Por cada tibia, se atribuye un puntaje como la mediana del puntaje OARSI de las 5
- 15 secciones.
- Para el análisis estadístico, se compararon las medianas de los grupos con un ensayo estratificado de Kruskal-Wallis seguido del ensayo de comparación múltiple de Dunnett *post hoc*.
- Niveles de significancia: ns: sin significancia estadística; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;
- 20 *** $p < 0,001$ versus MNX-vehículo. Se realizaron análisis estadísticos en todos los grupos del estudio.

3.10 - Modelo de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) de ratón inducido por dieta

- 25 Este modelo usa una dieta rica en grasas, definida en L aminoácidos, deficiente en colina (CDAHFD, por sus siglas en inglés) que consiste en 60 kcal% de grasa y metionina 0,1% para inducir EHNA.

3.10.1 Grupos de estudio y régimen de dosificación:

Ratones C57/BL6 (Charles River) se dividen en grupos como se indica a continuación, los ratones tienen 8 semanas (>20grs) al inicio de la fase de inducción.

5

Dietas/ grupos	Proyecto	N	Dosis	Frecuencia y vía	Vehículo
Dieta de control	Vehículo	10	n/a	BID vía oral	MC 0,5% + 1 HCl eq, agua dest. 98,9 %
Dieta CDAHFD	Vehículo	10	n/a	BID vía oral	MC 0,5% + 1 HCl eq, agua dest. 98,9 %
Dieta CDAHFD	Compuesto 1	10	5 mg/kg	QD vía oral	MC 0,5%
Dieta CDAHFD	Compuesto 1	10	15 mg/kg	QD vía oral	MC 0,5%
Dieta CDAHFD	Compuesto 1	10	15 mg/kg	BID vía oral	MC 0,5%

3.10.2 Materiales y compuestos

CDAHFD; Research Diets Inc., Ref. Nro. A06071302

Dieta de control: dieta normal (VRF 1, P), Special Diets Services

10 3.10.3 Protocolo de tratamiento:

Fase de inducción: durante 4 semanas

A fin de inducir una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), los animales serán alimentados con una dieta rica en grasas, definida en L-aminoácidos, deficiente en colina (CDAHFD).

5 *Fase de tratamiento: durante 6 semanas*

Los ratones se asignaron aleatoriamente a un grupo de tratamiento y se trataron de acuerdo con un esquema presentado en la Tabla precedente hasta la fase de evaluación.

10 *3.10.4 - Muestreo*

Muestreo para la farmacocinética del estado estacionario - Se recolectarán muestras de sangre en tubos K2-EDTA para generar plasma. Todas las muestras de sangre se procesarán para obtener plasma mediante centrifugación (5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C) dentro de los 30 minutos de la recolección. El plasma de cada muestra de sangre se congelará rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenará en un congelador mantenido a -80°C hasta el análisis.

Muestra de sangre final - La sangre se recolectará en tubos para la preparación de suero conteniendo inhibidores de proteasa. Todas las muestras de sangre se procesarán mediante centrifugación (3.500 rpm durante 15 minutos a 4°C). Las alícuotas de las muestras de suero obtenidas se almacenarán congeladas a -80°C hasta el análisis ulterior.

Muestras de tejidos: El hígado se extrae y porciones del lóbulo lateral izquierdo se almacenan para análisis de expresión génica de ARN, ensayo TG, se seccionan para medición de OH prolina, y el resto se coloca en formalina 10% para evaluación histopatológica. La evaluación histopatológica incluye secciones teñidas con rojo Sirio para evaluar el alcance de la fibrosis, y secciones teñidas con F4/80 para evaluar la acumulación de macrófagos.

Para el análisis de expresión génica se usan un panel con 6 genes de fibrosis (Col1A1, Timp1, Pai1, CTGF, TGF β y Acta2), genes de inflamación (TNF α , IL10 y CCL2) y 2 genes constitutivos.

5 3.10.5 Resultados

Cuando se ensayó en este modelo, el Compuesto 1 mostró un efecto significativo en al menos las dosis más altas ensayadas en los niveles de expresión de Pai1, TIMP1, CTGF y TGF β en el panel de genes de fibrosis, (Figura 3) y en los tres genes en el panel de inflamación (Figura 4). Adicionalmente, este mostró un efecto significativo en los niveles de hidroxiprolina a 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID (Figura 5), un efecto significativo en la cuantificación de fibrosis con rojo Sirio a 15 mg/kg/QD y 15 mg/kg/BID (Figura 6), y un efecto significativo en la cuantificación con F4/80 a 15 mg/kg/BID (Figura 7).

4 Inhibición de CYP

15 Se evalúa el potencial inhibitorio de un compuesto de ensayo para isoenzimas P450 de citocromo humano (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4) usando isoenzimas P450 de citocromo humano expresadas por cDNA y sustratos no fluorescentes que están metabolizados a metabolitos fluorescentes.

Los compuestos se ensayaron a 3,3 y 10 μ M, con una concentración final de DMSO de 0,3%. Los compuestos se incubaron durante 15 min con enzima antes de añadir la mezcla cofactor-sustrato. Las concentraciones de la reacción final en la mezcla de cofactor para los ensayos CYP3A4 (BD Biosciences, 456202), CYP2C9 (BD Biosciences, 456258), CYP2C19 (BD Biosciences, 456259) y CYP1A2 (BD Biosciences, 456203) son: 0,4 U/mL glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH, Roche, 10165875001), 3,3 mM MgCl₂ (Sigma, M2670), 3,3 mM D-glucosa-6-fosfato (Sigma, G7879) y 1,3 mM NADP⁺ (Sigma, N0505). Para CYP2D6 (BD Biosciences, 456217), las concentraciones de la reacción final

en el ensayo son 0,4 U/ml G6PDH, 0,41 mM MgCl₂, 0,41 mM D-glucosa-6-fosfato y 8,2 µM NADP⁺. Las concentraciones de enzima y sustrato se informan en 0. Luego de un período de incubación, la reacción se detiene con la adición de una solución de parada. Para los experimentos con DBF como sustrato, se usó una

5 solución de parada de NaOH 2 N, mientras que para todos los otros sustratos la solución de parada es MeCN 80%/tris base 0,5 M 20%.

La fluorescencia se lee inmediatamente (para CEC, AMMC, BFC), o después de 20 min (para CYP2C9 y CYP3A4 usando DBF como sustrato) en un lector PerkinElmer EnVision® con la excitación y emisión de longitud de onda apropiada

10 (cf. 0).

Luego se calcula el porcentaje de inhibición de CYP por el compuesto de ensayo normalizando los datos a muestras blanco: 100% de inhibición es la muestra blanco detenida antes de la adición de la mezcla de enzima/sustrato, y 0% de inhibición es la muestra blanco detenida después de que la reacción enzimática

15 se ha producido (50 min).

Condiciones del ensayo de inhibición usadas para cada isoenzima CYP450 estudiada

	CYP3A4	CYP3A4	CYP2C19	CYP2C9	CYP1A2	CYP2D6
Sustrato						
(µM)	1	-	-	0.5	-	-
DBF	-	-	35	-	4	-
CEC	-	-	-	-	-	0,5
AMMC	-	120	-	-	-	-
BFC						
Tampón						
fosfato pH	200	90	25	25	25	25
7,4 (mM)						

Enzima (pmol/pocillo)	1	1,5	6	2	1,5	3
Tiempo de incubación (min)	50	50	50	50	50	50
Control positivo	cetoconazol	cetoconazol	fluvoxamina	sulfafenazol	fluvoxamina	quinidina
Longitud de onda de excitación (nm)	485	400	400	485	400	380
Longitud de onda de emisión (nm)	530	530	460	530	460	460

AMMC: aminoetil-7-metoxi-4-metilcumarina

BFC: 7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina

CEC: 3-ciano-7-etoxicumarina

DBF: dibencilfluoresceína

5

5 *Inhibición de CYP3A4 dependiente del tiempo*

La inhibición por los compuestos de CYP3A4 dependiente del tiempo, evaluada en HLM agrupado, se establece mediante la determinación de CI_{50} de acuerdo con Grimm y colaboradores. *Drug Metabolism and Disposition*

- 10 **2009**, 37, 1355-1370 and the draft FDA Guidance for Industry (Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations), 2006, <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Se usó testosterona como sustrato sonda y troleandomicina se usó como control positivo.