

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 932 526**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07D 451/14 (2006.01)
C07D 451/04 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2018 PCT/US2018/057682**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2019 WO19084383**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2018 E 18801171 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3672965**

(54) Título: **Compuesto de pirimidina como inhibidor de la cinasa JAK**

(30) Prioridad:

27.10.2017 US 201762577852 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.01.2023

(73) Titular/es:

**THERAVANCE BIOPHARMA R&D IP, LLC (100.0%)
901 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US**

(72) Inventor/es:

**KOZAK, JENNIFER;
HUDSON, RYAN;
BRANDT, GARY E.L.;
MCKINNELL, ROBERT MURRAY;
DABROS, MARTA y
NZEREM, JERRY**

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

ES 2 932 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuesto de pirimidina como inhibidor de la cinasa JAK

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere a un compuesto de pirimidina útil como inhibidor de la cinasa JAK. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho compuesto, a formas cristalinas de dichos compuestos y procesos e intermedios útiles para preparar dicho compuesto.

Estado de la técnica

15 La inhibición de la familia de las enzimas JAK puede inhibir la señalización de muchas citocinas proinflamatorias clave. Por lo tanto, es probable que los inhibidores de JAK sean útiles en el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias cutáneas, rinitis alérgica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras enfermedades inflamatorias pulmonares, colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias gastrointestinales, así como enfermedades inflamatorias oculares. El documento WO2016/191524, us2016/052930 y WO2015/094803 son 20 documentos de patente dirigidos a compuestos para su uso como inhibidores de la cinasa JAK.

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica habitual que afecta aproximadamente a 14 millones de personas solo en los Estados Unidos. Se calcula que la DA afecta al 10-20 % de los niños y al 1-3 % de los adultos en los países desarrollados (Bao *et al.*, JAK-STAT, 2013, 2, e24137) y la prevalencia está aumentando. 25 La elevación de las citocinas proinflamatorias que dependen de la vía JAK-STAT, en concreto, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFNy y TSLP, se ha asociado a la DA (Bao *et al.*, Leung *et al.*, The Journal of Clinical Investigation, 2004, 113, 651-657). Además, se ha demostrado que la regulación positiva de IL-31, otra citocina que señaliza a través de un emparejamiento con JAK, desempeña un papel en el prurito asociado con el estado crónico de la DA (Sonkoly *et al.*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117, 411-417).

30 Debido al efecto modulador de la vía JAK/STAT en el sistema inmunitario, la exposición sistémica a inhibidores de JAK puede tener un efecto inmunosupresor sistémico adverso. Por lo tanto, sería deseable proporcionar un nuevo inhibidor de JAK que tenga su efecto en el lugar de acción sin efectos sistémicos significativos. En concreto, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias cutáneas, como la dermatitis atópica, sería deseable proporcionar un 35 nuevo inhibidor de JAK que pueda administrarse por vía tópica y lograr una exposición terapéuticamente apropiada en la piel que se elimine rápidamente para minimizar la exposición sistémica.

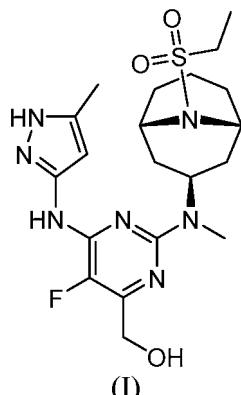
Sumario de la invención

40 El alcance de la invención se define por medio de las reivindicaciones.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

45 En un aspecto, la invención proporciona un compuesto que tiene actividad como inhibidor de las cinasas JAK.

Por consiguiente, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



50

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención también proporciona una forma cristalina del compuesto (I).

5 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias cutáneas, en concreto la dermatitis atópica y la alopecia areata, en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, al 10 mamífero.

La invención también proporciona procesos de síntesis e intermedios que se describen en el presente documento que son útiles para la preparación del compuesto (I).

15 Breve descripción de los dibujos

Se ilustran diversos aspectos de la presente invención remitiéndose a los dibujos adjuntos.

20 La figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de la forma cristalina I del compuesto (I) (en lo sucesivo en el presente documento forma I).

La figura 2 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (CDB) de la forma cristalina I.

La figura 3 muestra un gráfico de análisis termogravimétrico (ATG) de la forma cristalina I.

La figura 4 muestra la isoterma dinámica de sorción de humedad de la forma cristalina I.

25 La figura 5 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de la forma cristalina II del compuesto (I) (en lo sucesivo en el presente documento forma II). La figura 6 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (CDB) de la forma cristalina II.

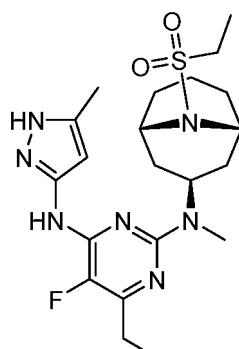
La figura 7 muestra un gráfico de análisis termogravimétrico (ATG) de la forma cristalina II.

La figura 8 muestra la isoterma dinámica de sorción de humedad de la forma cristalina II.

30 Descripción detallada de la invención

Entre otros aspectos, la invención proporciona un inhibidor de cinasas JAK de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables e intermedios para su preparación.

35 Las estructuras químicas se nombran en el presente documento según las convenciones de la IUPAC implementadas en el software ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA). Por ejemplo, el compuesto (I):



(I)

40 se denomina (2-(((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol.

La notación (1R,3s,5S) describe la orientación exo del grupo pirimidinilamino con respecto al grupo 9-azabicyclo[3.3.1]nonano.

45 Además, el resto pirazolilo del compuesto (I), así como otros compuestos descritos en el presente documento, existen en forma tautomérica. Se comprenderá que aunque se muestran o nombran estructuras específicas de forma concreta, la invención también incluye sus tautómeros.

50 Los compuestos de la descripción contienen uno o más centros quirales y, por tanto, dichos compuestos (y sus intermedios) pueden existir en forma de mezclas racémicas; en forma de estereoisómeros puros (es decir, enantiómeros o diastereómeros); en forma de mezclas enriquecidas en estereoisómeros y similares. Los compuestos

quirales que se muestran o se nombran en el presente documento sin una estereoquímica definida en un centro quiral tienen por objeto incluir cualquiera o todas las posibles variaciones de estereoisómeros en el estereocentro sin definir a menos que se indique lo contrario. La representación o nombramiento de un estereoisómero concreto significa que el estereocentro indicado tiene la estereoquímica señalada, entendiendo que también pueden estar presentes pequeñas cantidades de otros estereoisómeros, a menos que se indique lo contrario, a condición de que la utilidad del compuesto representado o nombrado no se elimine por la presencia de otro estereoisómero.

El compuesto (I) puede existir como forma libre o en diversas formas salinas, tal como una forma de sal monoprotonada, una forma de sal diprotonada, una forma de sal triprotonada o sus mezclas. Todas estas formas se incluyen dentro del alcance de la presente invención, a menos que se indique lo contrario.

Esta invención también incluye versiones marcadas isotópicamente de los compuestos de la descripción, que incluyen el compuesto (I) en el que se ha reemplazado un átomo o se ha enriquecido con un átomo que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica diferente de la masa atómica que predomina en la naturaleza. Los ejemplos de 15 isótopos que pueden incorporarse en un compuesto de fórmula (I) incluyen, entre otros, ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁵O, ¹⁷O, ¹⁸O, ³⁵S y ¹⁸F. Son de especial interés los compuestos de fórmula (I) enriquecidos en tritio o carbono-14, que pueden usarse, por ejemplo, en estudios de distribución en tejidos. También son de especial interés los compuestos de fórmula (I) enriquecidos en deuterio, especialmente en un lugar de metabolismo, ya que se prevé que tengan una 20 mayor estabilidad metabólica. Además, son de especial interés los compuestos de fórmula (I) enriquecidos en un isótopo emisor de positrones, como ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O y ¹³N, que pueden usarse, por ejemplo, en estudios de tomografía por emisión de positrones (PET).

Definiciones

25 Cuando se describe la presente invención incluyendo sus diversos aspectos y realizaciones, los siguientes términos y expresiones tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario.

El término "alquilo" significa un grupo hidrocarbonado saturado monovalente que puede ser lineal o ramificado o sus combinaciones. A menos que se defina de otro modo, dichos grupos alquilo contienen normalmente de 1 a 10 átomos 30 de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, metilo (Me), etilo (Et), n-propilo (n-Pr) o (nPr), isopropilo (i-Pr) o (iPr), n-butilo (n-Bu) o (nBu), sec-butilo, isobutilo, *terc*-butilo (t-Bu) o (tBu), n-pentilo, n-hexilo, 2,2-dimetilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2-ethylbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2-propilpentilo y similares.

35 Cuando se pretende mencionar un número específico de átomos de carbono para un término concreto, el número de átomos de carbono se muestra después del término. Por ejemplo, la expresión "alquilo C₁₋₃" significa un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, en el que los átomos de carbono están en cualquier configuración químicamente aceptable, incluidas las configuraciones lineales o ramificadas.

40 El término "alcoxi" significa el grupo monovalente -O-alquilo, en el que alquilo se define como anteriormente. Los grupos alcoxi representativos incluyen, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y similares.

El término "cicloalquilo" significa un grupo carbocíclico saturado monovalente que puede ser monocíclico o multicíclico. A menos que se defina de otro modo, dichos grupos cicloalquilo normalmente contienen de 3 a 10 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, ciclopropilo (cPr), ciclobutilo, ciclopentilo, 45 ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, adamantilo y similares.

El término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

50 El término "heterociclico", "heterociclo", "heterocíclico" o la expresión "anillo heterocíclico" significa un grupo no aromático cíclico monovalente saturado o parcialmente insaturado, que tiene de 3 a 10 átomos totales en el anillo, en el que el anillo contiene de 2 a 9 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los grupos heterocíclicos pueden ser monocíclicos o multicíclicos (es decir, condensados o unidos con puente). Los grupos heterocíclicos representativos incluyen, a modo de ejemplo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, tiomorfólico, indolin-3-ilo, 2-imidazolinilo, tetrahidropiranilo, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-ilo, quinuclidinilo, 7-azanorbomanilo, nortropanilo y similares, en los que el punto de unión está en cualquier átomo de carbono o nitrógeno disponible en el anillo. Cuando el contexto hace evidente el punto de unión del grupo heterocíclico, dichos grupos pueden denominarse, como alternativa, especies no valentes, es decir, pirrolidina, piperidina, piperazina, imidazol, tetrahidropirano, etc.

60 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un paciente que necesita tratamiento.

65 El término "tratamiento" como se usa en el presente documento significa el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección médica (tal como una enfermedad inflamatoria gastrointestinal), en un paciente, tal como un mamífero (en concreto, un ser humano) que incluye uno o más de los siguientes:

- (a) prevenir la aparición de la enfermedad, trastorno o afección, es decir, prevenir la reaparición de la enfermedad o afección médica o el tratamiento profiláctico de un paciente predisponente a la enfermedad o afección médica;

(b) mejorar la enfermedad, trastorno o afección médica, es decir, eliminar o provocar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección médica en un paciente, que incluye contrarrestar los efectos de otros agentes terapéuticos;

5 (c) suprimir la enfermedad, trastorno o afección médica, es decir, frenar o detener el desarrollo de la enfermedad, trastorno o afección médica en un paciente; o

(d) aliviar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección médica en un paciente.

10 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es aceptable para la administración a un paciente o a un mamífero, tal como un ser humano (por ejemplo, sales que tienen una seguridad aceptable en mamíferos para una pauta de dosificación dada). Las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen las sales de los ácidos acético, ascórbico, bencenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, edisílico, fumárico, gentísico, gluconíco, glucurónico, glutámico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, lactobiónico, maleico, mállico, mandélico, metanosulfónico, múcico, naftalenosulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, naftaleno-2,6-disulfónico, 15 nicotínico, nítrico, orótico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y xinafoico, y similares.

20 La expresión "una de sus sales" significa un compuesto formado cuando el hidrógeno de un ácido se reemplaza por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico y similares. Por ejemplo, el catión puede ser una forma protonada de un compuesto de fórmula (I), es decir, una forma en la que uno o más grupos amino han sido protonados por un ácido. Habitualmente, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para las sales de los compuestos intermedios que no están destinadas a la administración a un paciente.

25 La expresión "grupo protector de amino" significa un grupo protector adecuado para prevenir reacciones no deseadas en un nitrógeno de amino. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, entre otros, formilo; grupos acilo, por ejemplo, grupos alcanoilo, tales como acetilo y trifluoroacetilo; grupos alcoxcarbonilo, tal como *terc*-butoxicarbonilo (Boc); grupos arilmethoxcarbonilo, tales como benciloxicarbonilo (Cbz) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); grupos arilmethyl, tales como bencilo (Bn), trilito (Tr) y 1,1-di-(4'-metoxifenil)metilo; grupos sililo, tales como trimetilsililo (TMS), triisopropilsililo (TIPS), *terc*-butildimetsililo (TBS o TBDMS), [2-(trimetilsilil)-etoxi]metilo (SEM); y similares. Se describen numerosos grupos protectores y su introducción y retirada en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, tercera edición, Wiley, Nueva York.

30

Procedimientos de síntesis generales

- 35 El compuesto (I), y sus intermedios, se pueden preparar según los siguientes métodos y procedimientos generales que usan materiales de partida y reactivos disponibles en el mercado o preparados habitualmente. Los sustituyentes y las variables (por ejemplo, R y X) utilizados en los siguientes esquemas tienen los mismos significados que los que se definen en otra parte del presente documento, a menos que se indique lo contrario. Además, se pueden usar o se pueden producir compuestos que tengan un átomo o un grupo funcional ácido o básico en forma de una sal, a menos que se indique lo contrario (en algunos casos, el uso de una sal en una reacción concreta requerirá la conversión de la sal en una forma no salina, por ejemplo, una base libre, usando procedimientos habituales antes de llevar a cabo la reacción).

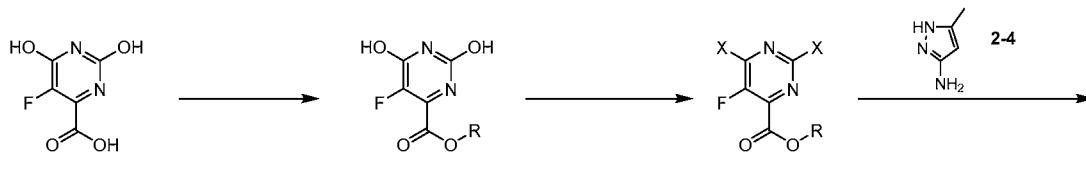
40

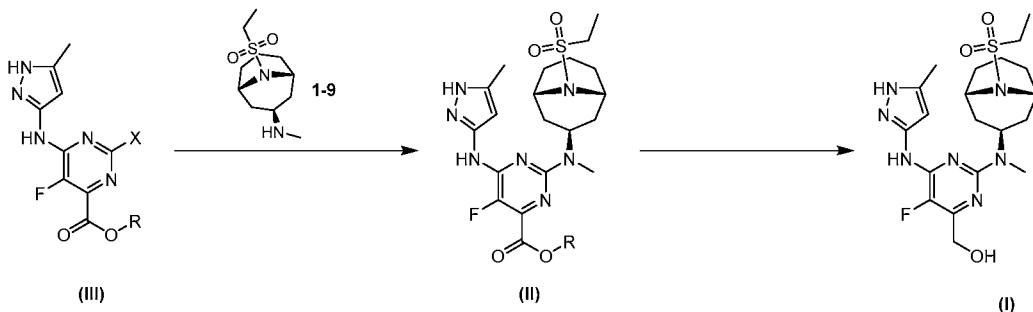
45 Aunque puede mostrarse o describirse una realización concreta de la presente invención en los siguientes procedimientos, los expertos en la materia reconocerán que también pueden prepararse otras realizaciones o aspectos de la presente invención usando dichos procedimientos o mediante el uso de otros métodos, reactivos y materiales de partida conocidos por los expertos en la materia. En concreto, se apreciará que el compuesto (I) se puede preparar por diferentes vías de proceso en las que los reactivos se combinan en órdenes diferentes para proporcionar productos intermedios diferentes en el camino a la producción de los productos finales.

50

Los métodos generales para preparar el compuesto (I) se ilustran en los esquemas 1 y 2.

Esquema 1

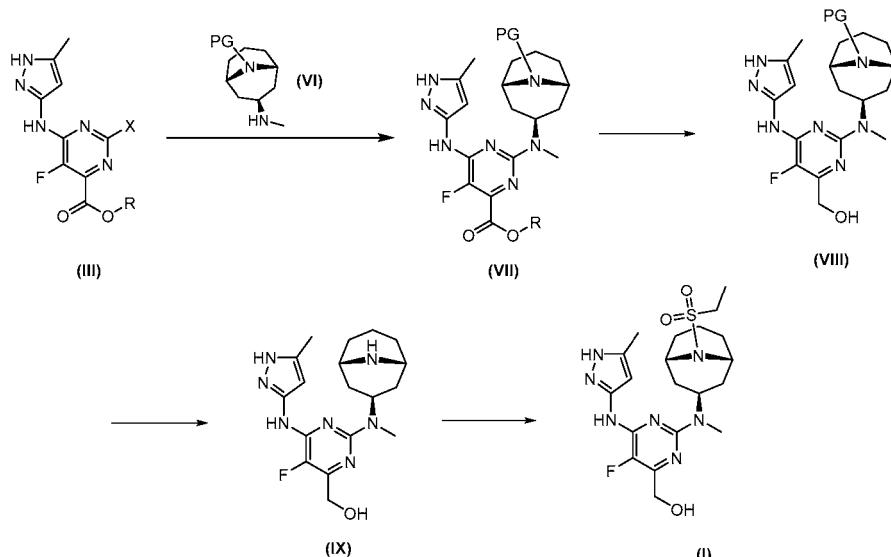




El material de partida 2-1 puede convertirse en el éster (V), por reacción con un alcohol en presencia de un ácido, en el que R es un grupo alquilo. En algunas realizaciones, R es un grupo alquilo C₁₋₁₂. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol. El compuesto (V) se puede convertir en el compuesto dihalo (IV). En algunas realizaciones, (IV) es un análogo de dicloro. En algunas realizaciones, el reactivo es POCl₃. El compuesto (IV) se puede convertir en (III) por reacción con 2-4 en presencia de una base. El compuesto (II) se puede formar haciendo reaccionar (III) con 1-9 en presencia de una base. Por último, (II) puede reducirse a (I) en presencia de un agente reductor. En algunas realizaciones, el agente reductor es una fuente de hidruro de sodio o litio. En algunas realizaciones, el agente reductor es LiAlH₄, NaBH₄ o LiBH₄. En algunas realizaciones, R es etilo. Opcionalmente, se puede formar una sal farmacéuticamente aceptable de (I).

Para este método general, en algunas realizaciones, R es un alquilo C₁₋₁₂. En algunas realizaciones, R es un alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, R es un alquilo C₁₋₃. En algunas realizaciones, R es etilo. En algunas realizaciones, X es F, Cl o Br. En algunas realizaciones, X es Cl. En algunas realizaciones, R es etilo y X es Cl.

Esquema 2

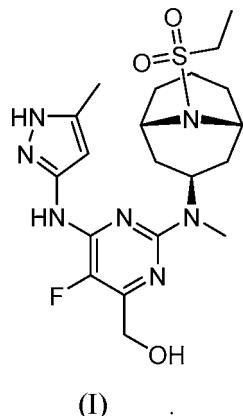


Como alternativa, el compuesto (III) se puede hacer reaccionar con el compuesto (VI) en el que PG es un grupo protector de amino, en presencia de una base, tal como DIPEA, para obtener el compuesto (VII). El compuesto (VII) se puede reducir al correspondiente alcohol (VIII) con un agente reductor. En algunas realizaciones, el agente reductor es una fuente de hidruro de sodio o litio. En algunas realizaciones, el agente reductor es LiAlH₄, NaBH₄ o LiBH₄. El compuesto (VIII) se puede desproteger para obtener el compuesto (IX). Cuando PG es Boc, la desprotección puede realizarse en presencia de un ácido fuerte como TFA o HCl. Por último, el compuesto (IX) puede hacerse reaccionar con una fuente de etanosulfonilo, tal como cloruro de etanosulfonilo.

Para este método general, en algunas realizaciones, PG es *terc*-butoxicarbonilo (Boc). En algunas realizaciones, R es un alquilo C₁₋₁₂. En algunas realizaciones, R es un alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, R es un alquilo C₁₋₃. En algunas realizaciones, R es etilo. En algunas realizaciones, X es F, Cl o Br. En algunas realizaciones, X es Cl. En algunas realizaciones, R es etilo y X es Cl.

Forma cristalina I

En otro aspecto, la descripción proporciona una forma cristalina (forma I) del compuesto (I)



(I)

5

En un aspecto, la forma cristalina se caracteriza por una difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores de 2θ de $11,19 \pm 0,20$, $11,73 \pm 0,20$, $18,80 \pm 0,20$ y $19,29 \pm 0,20$. En otro aspecto, la forma cristalina se caracteriza además por tener otros picos de difracción en un valor de 2θ de $6,75 \pm 0,20$. En otro aspecto, la forma cristalina se caracteriza además por tener dos o más picos de difracción adicionales en valores de 2θ seleccionados entre $5,91 \pm 0,20$, $6,28 \pm 0,20$, $8,08 \pm 0,20$, $16,68 \pm 0,20$, $17,62 \pm 0,20$, $20,53 \pm 0,20$ y $22,16 \pm 0,20$.

Como es bien sabido en el campo de la difracción de rayos X de polvo, las posiciones de los picos de los patrones de DRXP son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como los detalles de la preparación de muestras y la geometría del instrumento, que las alturas relativas de los picos. Por tanto, en un aspecto, la forma cristalina I se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo en el que las posiciones de los picos están sustancialmente de acuerdo con las posiciones de los picos del patrón que se muestra en la figura 1.

En otro aspecto, la forma cristalina I se caracteriza por su comportamiento cuando se expone a temperatura alta. Como se demostró en la figura 2, la señal de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrada a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto presenta un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, que muestra un máximo en el flujo de calor endotérmico a una temperatura de $250,9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. En otro aspecto, la forma I se caracteriza por una señal de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con la que se muestra en la figura 2.

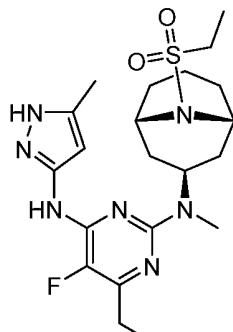
La señal del análisis termogravimétrico (TGA) de la figura 3 muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,70 % entre $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $125\text{ }^{\circ}\text{C}$, con purga de N_2 . El compuesto se descompone a una temperatura de inicio de aproximadamente $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Como se describe en la preparación 2, la forma I se puede preparar disolviendo el compuesto (I) en etanol después de un calentamiento. A continuación, la solución resultante se enfriá hasta aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. La forma I puede aislar por filtración.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar la forma cristalina I, comprendiendo dicho método: (a) disolver el compuesto (I) en un diluyente, tal como etanol, y opcionalmente aplicar calor para formar una mezcla de reacción; (b) enfriar la solución hasta aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación opcional; y (c) aislar la forma cristalina I de la mezcla de reacción, por ejemplo, mediante filtración.

Forma cristalina II

En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina (forma II) del compuesto (I):



(I)

que es una forma cristalina anhidra de base libre.

- 5 En un aspecto, la forma cristalina se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores de 2θ de $11,4 \pm 0,2$, $16,2 \pm 0,2$, $16,6 \pm 0,2$, $17,7 \pm 0,2$ y $21,9 \pm 0,2$.

En otro aspecto, la forma cristalina se caracteriza además por tener otros picos de difracción en valores de 2θ de $8,9 \pm 0,2$, $9,5 \pm 0,2$ y $10,2 \pm 0,2$.

- 10 En otro aspecto, la forma cristalina ademas se caracteriza porque tiene uno o más picos de difracción adicionales a valores de 2θ seleccionados entre $14,4 \pm 0,2$, $19,0 \pm 0,2$, $19,2 \pm 0,2$, $19,8 \pm 0,2$, $20,1 \pm 0,2$, $20,4 \pm 0,2$, $20,6 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$, $21,3 \pm 0,2$, $25,9 \pm 0,2$, $30,1 \pm 0,2$, $30,5 \pm 0,2$, $30,9 \pm 0,2$, $32,6 \pm 0,2$ y $33,8 \pm 0,2$.

- 15 Como es bien sabido en el campo de la difracción de rayos X de polvo, las posiciones de los picos de los patrones de DRXP son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como los detalles de la preparación de muestras y la geometría del instrumento, que las alturas relativas de los picos. Por tanto, en un aspecto, la forma cristalina II se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo en el que las posiciones de los picos están sustancialmente de acuerdo con las posiciones de los picos del patrón que se muestra en la figura 5.

- 20 En otro aspecto, la forma cristalina II se caracteriza por su comportamiento cuando se expone a temperatura alta. Como se demostró en la figura 6, la señal de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrada a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto presenta un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, que muestra un máximo en el flujo de calor endotérmico a una temperatura de $238,1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 25 En otro aspecto, la forma II se caracteriza por una señal de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con la que se muestra en la figura 6.

La señal del análisis termogravimétrico (TGA) de la figura 7 muestra una pérdida de peso asociada con la descomposición después de $222\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 30 En la figura 8 se muestra una señal representativa de DMS para la forma II. La absorción de humedad total entre el 5 y el 90 % de HR fue de aproximadamente el 0,02 %. La forma II no es higroscópica.

- 35 Como se describe en la preparación 20, la forma II se puede preparar suspendiendo el compuesto 2-6 en una mezcla de EtOH y THF, enfriada a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A esta suspensión se le puede añadir LiBH₄. Después de la adición, la temperatura se puede aumentar hasta $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la mezcla de reacción se puede agitar durante 2 horas. La reacción se puede extinguir con una mezcla de cloruro de amonio disuelto en agua. Despues de calentar hasta $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, se puede agregar lentamente agua para generar cristales. La suspensión resultante se puede mantener a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante unas pocas horas, luego se agita a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se filtra. La forma cristalina II se puede enjuagar con EtOH y agua y luego secar para obtener la forma II de grado intermedio.

- 40 Este grado intermedio se puede disolver en DMSO al calentarla, seguido de la adición lenta de n-PrOH mientras se mantiene la temperatura interna a aproximadamente $86\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se agita a aproximadamente $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 4 horas. Luego, la mezcla resultante se enfria lentamente hasta aproximadamente $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agita a aproximadamente $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante algunas horas. A continuación, la forma II puede aislarse por filtración. La forma cristalina II se puede lavar con nPrOH y etanol, seguido de filtración.

- 45 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para purificar la forma cristalina II de grado intermedio, comprendiendo dicho método: (a) disolver la forma II de grado intermedio en un diluyente, tal como DMSO, y aplicar calor a la mezcla; (b) agregar lentamente n-PrOH; (c) calentar la mezcla a aproximadamente $90\text{ }^{\circ}\text{C}$; (d) enfriar la solución hasta aproximadamente $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; y (e) aislar la forma cristalina II de la mezcla de reacción, por ejemplo, mediante filtración.

Composiciones farmacéuticas

- 5 El compuesto (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables se usan habitualmente en la forma de una composición o formulación farmacéutica. El compuesto (I) puede estar presente en forma cristalina, tal como la forma I o la forma II. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un paciente por cualquier vía de administración aceptable, que incluye, entre otras, los modos de administración oral, tópica (que incluye la vía transdérmica), rectal, nasal, inhalada y parenteral.
- 10 Por consiguiente, en uno de sus aspectos de composición, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto de la composición, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y una forma cristalina del compuesto (I), o una sal de sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, la forma I o la forma II.
- 15 Opcionalmente, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación si se desea. Cuando se analizan las composiciones y sus usos, el "compuesto de la invención" también puede denominarse en el presente documento el "agente activo".
- 20 Las composiciones farmacéuticas de esta descripción contienen habitualmente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los expertos en la técnica reconocerán, sin embargo, que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, composiciones a granel, o menos de una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para la administración múltiple para conseguir una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 25 Habitualmente, dichas composiciones farmacéuticas contendrán de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 95 % en peso del agente activo; incluido de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 70 % en peso del agente activo.
- 30 Puede usarse cualquier vehículo o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de la invención. La elección de un vehículo o excipiente concreto, o combinaciones de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración que se use para tratar a un paciente o tipo de afección médica o patología particular. En este sentido, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo particular de administración está dentro del alcance de los expertos en las técnicas farmacéuticas. Además, los vehículos o excipientes utilizados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención están disponibles en el mercado. A modo de ilustración adicional, se describen técnicas de formulación convencionales en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); y H.C. Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7^a edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).
- 35 40 Los ejemplos representativos de materiales que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, los siguientes: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, tal como celulosa microcristalina y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua aspirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas.
- 45 50 Las composiciones farmacéuticas se preparan normalmente mezclando o combinando completa e íntimamente el agente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. Después, la mezcla combinada de forma uniforme resultante se puede conformar o cargar en comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, usando procedimientos y equipos convencionales.
- 55 60 Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden empaquetar en una forma farmacéutica unitaria. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a una unidad físicamente aislada adecuada para administrar a un paciente, es decir, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, ya sea sola o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas farmacéuticas unitarias pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares, o envases unitarios adecuados para la administración parenteral.
- 65 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, oblesas, grageas, polvos, gránulos; o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite; o como un elixir o jarabe; y similares; en los que cada uno contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de esta descripción, o una de

sus sales farmacéuticamente aceptables, como principio activo.

Cuando se prevé la administración oral en una forma farmacéutica sólida (es decir, en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras y similares), las composiciones farmacéuticas de esta descripción comprenderán habitualmente el agente activo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 Opcionalmente, dichas formas farmacéuticas sólidas pueden comprender: cargas o expansores, tales como almidones, celulosa microcristalina, lactosa, fosfato de dicalcio, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silílico; aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como croscarmelosa sodio, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y/o carbonato de sodio; agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y/o arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y/o sus mezclas; agentes colorantes; y agentes tamponantes.

10 15 También pueden estar presentes agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes en las composiciones farmacéuticas de esta descripción. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares. Los agentes de recubrimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, incluyen los utilizados para recubrimientos entéricos, tales como acetato ftalato de celulosa, polí(acetato ftalato de vinilo), ftalato de hidroxipropilmetylcelulosa, ácido metacrílico, copolímeros de éster del ácido metacrílico, acetato trimelitato de celulosa, carboximetiletilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetylcelulosa y similares.

20 25 30 35 Las composiciones farmacéuticas de la descripción también pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetylcelulosa en proporciones variables; u otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden formularse de manera que liberen solo el principio activo o, preferentemente, en una determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede estar en forma microencapsulada, si procede, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

30 35 40 45 Las formas farmacéuticas líquidas adecuadas para la administración oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Las formas farmacéuticas líquidas habitualmente comprenden el agente activo y un diluyente inerte, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en especial, de semillas de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), ácido oleico, glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y sus mezclas. Como alternativa, determinadas formulaciones líquidas pueden convertirse, por ejemplo, mediante secado por pulverización, en un polvo, que se usa para preparar formas farmacéuticas sólidas mediante procedimientos convencionales.

50 Las suspensiones, además del ingrediente activo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y sus mezclas.

55 60 65 El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal). Para la administración parenteral, el agente activo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, normalmente se mezcla con un vehículo adecuado para la administración parenteral que incluye, a modo de ejemplo, soluciones acuosas estériles, solución salina, alcoholes de bajo peso molecular, tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, gelatina, ésteres de ácidos grasos, tales como oleato de etilo y similares. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más antioxidantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes tamponantes o agentes dispersantes. Estas formulaciones se pueden esterilizar usando un medio inyectable estéril, un agente esterilizante, filtración, irradiación o calor.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la descripción se formulan para la administración por inhalación. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por inhalación estarán normalmente en forma de un aerosol o un polvo. Dichas composiciones se administran generalmente usando dispositivos de administración bien conocidos, tales como un inhalador dosificador, un inhalador de polvo seco, un nebulizador o un dispositivo de administración similar.

Cuando se administran por inhalación usando un recipiente presurizado, las composiciones farmacéuticas de esta descripción comprenderán habitualmente el ingrediente activo, o una sal de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un propelador adecuado, tal como díclorodifluorometano, triclorofluorometano, díclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. Además, la composición farmacéutica puede estar en forma de una cápsula o cartucho (fabricado, por ejemplo, de gelatina) que comprende un compuesto de la invención, o una sal de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un polvo adecuado para su uso en un inhalador de polvo. Las bases en polvo adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, lactosa o almidón.

Formulaciones tópicas

Para tratar afecciones cutáneas, el compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se formula preferentemente para la administración tópica a la piel. Las composiciones tópicas comprenden vehículos fluidos o semisólidos que pueden incluir, entre otros, polímeros, espesantes, tampones, neutralizantes, agentes quelantes, conservantes, tensioactivos o emulsionantes, antioxidantes, ceras o aceites, emolientes, protectores solares y un sistema disolvente o disolvente mixto. Las composiciones tópicas útiles en la presente invención se pueden convertir en una amplia variedad de tipos de productos. Estos incluyen, entre otros, lociones, cremas, geles, barras, pulverizaciones, pomadas, pastas, espumas, mousse y limpiadores. Estos tipos de productos pueden comprender varios tipos de sistemas vehículo, incluidos, entre otros, partículas, nanopartículas y liposomas. Si se desea, pueden añadirse agentes desengranadores, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una de sus sales, tal como alginato de sodio. Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995). La formulación se puede seleccionar para maximizar la administración a un lugar diana deseado en el cuerpo.

Las lociones, que son preparaciones que se aplican en la superficie de la piel o del pelo sin fricción, son generalmente preparaciones líquidas o semilíquidas en las que partículas sólidas, finamente divididas, productos cerosos o líquidos se dispersan. Las lociones normalmente contendrán agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sodio, o similares.

Las cremas que contienen el agente activo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la administración según la presente descripción, son líquidos viscosos o emulsiones semisólidas, ya sea de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases para cremas normalmente son lavables con agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa se compone generalmente de vaselina o un alcohol graso, tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa, habitual, aunque no necesariamente, supera a la fase oleosa en volumen y, generalmente, contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema, como se explica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. Los componentes de las formulaciones en crema pueden incluir: bases oleosas, tales como vaselina, aceites minerales, aceites vegetales y animales, y triglicéridos; bases para cremas, tales como alcoholes de lanolina, ácido esteárico y alcohol cetoestearílico; una base para geles, tal como poli(alcohol vinílico); disolventes, tales como, propileneglicol y polietileneglicol; emulsionantes, tales como polisorbatos, estearatos, tales como estearato de glicerilo, octilhidroxiestearato, estearato de polioxilo, PEG estearílico éteres, palmitato de isopropilo y monoestearato de sorbitán; estabilizantes, tales como polisacáridos y sulfato de sodio; emolientes (es decir, humectantes), tales como triglicéridos de longitud de cadena intermedia, miristato de isopropilo y dimeticona; agentes endurecedores, tales como alcohol cetílico y alcohol estearílico; agentes antimicrobianos, tales como metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, ácido sóblico, diazolidinil urea e hidroxianisol butilado; potenciadores de la penetración, tales como N-metilpirrolidona, propileneglicol, monolaurato de polietileneglicol y similares; y agentes quelantes, tales como edetato disódico.

Las formulaciones en gel también se pueden usar en relación con la presente invención. Como apreciarán los que trabajan en el campo de la formulación tópica de fármacos, los geles son semisólidos. Los geles monofásicos contienen macromoléculas orgánicas distribuidas de manera sustancialmente uniforme a través del vehículo líquido, que es normalmente acuoso, pero también puede ser un disolvente o una mezcla de disolventes.

Las pomadas, que son preparados semisólidos, normalmente tienen una base de vaselina u otros derivados del petróleo. Como apreciarán los expertos en la materia, la base para pomadas específica que se usará será aquella que proporcione un transporte óptimo para el agente activo seleccionado para una formulación dada y, preferentemente, que proporcione otras características deseadas también, por ejemplo, emolientia o similares. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base para pomadas debería ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co. (1995), págs. 1399-1404, las bases para pomadas se pueden agrupar en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases hidrosolubles. Las bases para pomadas oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases para pomadas emulsionables, también conocidas como bases para pomadas absorbentes, contienen poco o nada de agua, e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxiestearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases para pomadas de emulsión son emulsiones de agua en aceite ("water-in-oil", W/O) o emulsiones de aceite en agua ("oil-in-water", O/W), e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases para ungüentos solubles en agua se pueden preparar a partir de polietilenoglicoles de peso molecular variable; de nuevo,

- puede remitirse a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, citado anteriormente, para mayor información. Los materiales oleosos adecuados para su uso en formulaciones en pomada incluyen vaselina, cera de abeja, manteca de cacao, manteca de karité y alcohol cetílico. Las pomadas pueden incluir opcionalmente potenciadores de la penetración, si se desea.
- 5 Las formulaciones útiles de la invención también abarcan pulverizaciones. Las pulverizaciones generalmente proporcionan el agente activo en una solución acuosa y/o alcohólica que puede rociarse sobre la piel o el pelo para su administración. Dichas pulverizaciones incluyen aquellas formuladas para proporcionar la concentración de la solución del agente activo en el lugar de la administración tras su administración, por ejemplo, la solución de pulverización
- 10 puede comprender principalmente alcohol u otro líquido volátil similar, en el que se puede disolver el fármaco o agente activo. Al aplicarse a la piel o al cabello, el vehículo se evapora, dejando el agente activo concentrado en el lugar de la administración.
- 15 Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender vehículos adecuados en fase sólida o gel. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen, entre otros, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros, tales como polietilenglicoles.
- 20 Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender un emulsionante adecuado, que significa un agente que mejora o facilita el mezclado y la suspensión del aceite en agua o del agua en aceite. El agente emulsionante utilizado en el presente documento puede consistir en un solo agente emulsionante o puede ser un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero o una mezcla de dos o más de tales tensioactivos; en el presente documento, se prefiere usar emulsionantes no iónicos o aniónicos. Dichos agentes tensioactivos se describen en "McCutcheon's Detergent and Emulsifiers", edición norteamericana, 1980 Anual publicado por la McCutcheon Division, MC Publishing Company, 175 Rock Road, Glen Rock, Nueva Jersey, 07452, EE. UU.
- 25 Se pueden utilizar alcoholes de alto peso molecular como el alcohol cetearílico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, cera emulsionante, monoestearato de glicerilo. Otros ejemplos son el diestearato de etilenglicol, triestearato de sorbitán, monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monoestearato de sorbitán (SPAN 60), monolaurato de dietilenglicol, monopalmitato de sorbitán, dioleato de sacarosa, estearato de sacarosa (CRODESTA
- 30 F-160), éter laurílico de polioxietileno (BRIJ 30), éter estearílico de polioxietileno (2) (BRIJ 72), éter estearílico de polioxietileno (21) (BRIJ 721), monoestearato de polioxietileno (Myrj 45), monoestearato de polioxietilensorbitán (TWEEN 60), monooleato de polioxietilensorbitán (TWEEN 80), monolaurato de polioxietilensorbitán (TWEEN 20) y oleato de sodio. El colesterol y los derivados del colesterol también pueden emplearse en emulsiones de uso externo.
- 35 Paul L. Lindner describe ejemplos de agentes emulsionantes no iónicos adecuados en "Emulsions and Emulsion", editado por Kenneth Lissant, publicado por Dekker, Nueva York, N. Y., 1974. Los ejemplos de emulsionantes no iónicos que se pueden usar incluyen, entre otros, los productos BRIJ, como BRIJ 2 (un éter estearílico de polioxietileno (2)), BRIJ S20 (un éter estearílico de polioxietileno (20)), BRIJ 72 (un éter estearílico de polioxietileno (2) que tiene un HLB de 4,9), BRIJ 721 (un éter estearílico de polioxietileno (21) que tiene un HLB de 15,5), Brij 30 (un éter laurílico de polioxietileno con un HLB de 9,7), Polawax (cera emulsionante con un HLB de 8,0), Span 60 (monoestearato de sorbitán con un HLB de 4,7), Crodesta F-160 (estearato de sacarosa que tiene un HLB de 14,5).
- 45 Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender emolientes adecuados. Los "emolientes" son materiales utilizados para prevenir o aliviar la sequedad, así como para la protección de la piel o el cabello. Los emolientes útiles incluyen, entre otros, alcohol cetílico, miristato de isopropilo, alcohol estearílico, y similares. Se conoce una amplia variedad de emolientes adecuados y se pueden utilizar en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Sagarín, Cosmetics, Science and Technology, 2^a edición, vol. 1, págs. 32-43 (1972), y la patente de EE. UU. n.º 4.919.934, de Deckner *et al.*, emitido el 24 de abril de 1990, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.
- 50 Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender antioxidantes adecuados, sustancias conocidas por inhibir la oxidación. Los antioxidantes adecuados para su uso según la presente invención incluyen, entre otros, hidroxitolueno butilado, ácido ascórbico, ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, palmitato ascórbico, hidroxianisol butilado, 2,4,5-trihidroxibutirofenona, 4-metil-2,6-di-terc-butilfenol, ácido eritórbico, goma de guayaco, galato de propilo, ácido tiodipropiónico, tiodipropionato de dilaurilo, terc-butilhidroquinona y tocoferoles, tales como vitamina E y similares, incluidas las sales farmacéuticamente aceptables y los ésteres de estos compuestos. Preferentemente, el antioxidante es hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, galato de propilo, ácido ascórbico, o sus ésteres o sales farmacéuticamente aceptables o mezclas de estos. Lo más preferentemente, el antioxidante es hidroxitolueno butilado.
- 55 60 Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender conservantes adecuados. Los conservantes son compuestos que se agregan a una formulación farmacéutica para actuar como un agente antimicrobiano. Entre los conservantes conocidos en la técnica como eficaces y aceptables en formulaciones parenterales se encuentran cloruro de benzalconio, bencetonio, clorhexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, ácido benzoico y diversas mezclas de estos. Véase, por ejemplo, Wallhausser, K.-H., Develop. Biol. Standard, 24:9-28 (1974) (S. Krager, Basilea).

- Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender agentes quelantes adecuados para formar complejos con cationes metálicos que no atraviesan una bicapa lipídica. Los ejemplos de agentes quelantes adecuados incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), etilenglicol-ácido bis(beta-aminoetilo)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) y 8-amino-2-[(2-amino-5-metilfenoxi)metil]-6-metoxiquinolina-ácido N,N,N',N'-tetraacético, sal de tetrapotasio (QUIN-2). Preferentemente, los agentes quelantes son EDTA y ácido cítrico.
- Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender agentes neutralizantes adecuados usados para ajustar el pH de la formulación dentro de un intervalo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de agentes neutralizantes incluyen, entre otros, trometamina, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido acético.
- Las composiciones farmacéuticas tópicas también pueden comprender agentes adecuados para aumentar la viscosidad. Estos componentes son compuestos difundibles capaces de aumentar la viscosidad de una solución que contiene polímero a través de la interacción del agente con el polímero. Puede usarse Carbopol Ultrez 10 como agente para aumentar la viscosidad.
- Las formas líquidas, tales como lociones adecuadas para la administración tópica, pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispersión, espesantes, potenciadores de la penetración y similares. Las formas sólidas, como cremas o pastas o similares, pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, agua, aceite, alcohol o grasa como sustrato con tensioactivo, polímeros, tales como polietilenglicol, espesantes, sólidos y similares. Las formulaciones líquidas o sólidas pueden incluir tecnologías de administración mejoradas, como liposomas, microsomas, microesponjas y similares. Además, los compuestos pueden administrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Diversos tipos de materiales de liberación sostenida han quedado establecidos y son bien conocidos por los expertos en la materia.
- Cuando está formulado para la aplicación tópica, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede estar presente entre el 0,1 y el 50 % en peso. En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,1 y 25 % en peso. En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,1 y 10 % en peso. En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,25 y 5 % en peso. En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,25 y 2 % en peso. En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,25 y 1 % en peso. En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,05 y 0,5 % en peso.
- En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente en aproximadamente el 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 % en peso.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el compuesto (I), o una sal de sus sales farmacéuticamente aceptables, comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales son útiles para tratar una enfermedad cutánea autoinmunitaria. En algunas realizaciones, dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales son útiles para tratar una enfermedad cutánea inflamatoria. En algunas realizaciones, dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales son útiles para tratar la dermatitis atópica. En algunas realizaciones, dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales son útiles para tratar la alopecia areata. En párrafos posteriores se ejemplifican clases específicas de compuestos o compuestos específicos que pueden combinarse con el compuesto (I) en una composición farmacéutica.
- Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención.
- Forma farmacéutica sólida oral en comprimidos*
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se combina en seco con celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona y croscarmelosa de sodio en una proporción de 4:5:1:1 y se comprime en comprimidos para proporcionar una dosis unitaria, por ejemplo, de 5 mg, 20 mg o 40 mg de agente activo por comprimido.
- Forma farmacéutica sólida oral en cápsulas*
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se combina con celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona y croscarmelosa de sodio en una proporción de 4:5:1:1 mediante granulación húmeda y se carga en cápsulas de gelatina o hidroxipropilmetylcelulosa para proporcionar una dosis unitaria, por ejemplo, de 5 mg, 20 mg o 40 mg de agente activo por cápsula.
- Formulación líquida*

- Se forma una formulación líquida que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables (al 0,1 %), agua (al 98,9 %) y ácido ascórbico (al 1,0 %) añadiendo un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, a una mezcla de agua y ácido ascórbico.
- 5 *Forma farmacéutica oral con recubrimiento entérico*
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se disuelve en una solución acuosa que contiene polivinilpirrolidona y se aplica como recubrimiento mediante pulverización sobre esferas de celulosa microcristalina o de azúcar en una proporción de 1:5 en p/p de agente activo:esferas y después se aplica un aumento de aproximadamente el 5 % en peso de un recubrimiento entérico que comprende un copolímero acrílico, por ejemplo, una combinación de copolímeros acrílicos disponible con los nombres comerciales Eudragit-L® y Eudragit-S® o succinato acetato de hidroxipropilmetylcelulosa. Las esferas con recubrimiento entérico se cargan en cápsulas de gelatina o hidroxipropilmetylcelulosa para proporcionar una dosis unitaria, por ejemplo, de 30 mg de agente activo por cápsula.
- 10 *Forma farmacéutica oral con recubrimiento entérico*
- Un recubrimiento entérico que comprende una combinación de Eudragit-L® y Eudragit-S® o succinato acetato de hidroxipropilmetylcelulosa se aplica a una forma farmacéutica oral en comprimidos o una forma farmacéutica oral en cápsulas descrita anteriormente.
- 15 *Formulación en pomada para la administración tópica*
- 25 El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con vaselina, triglicérido C₈-C₁₀, octilhidroxiestearato y N-metilpirrolidona en una proporción que suministra una composición que contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.
- 30 *Formulación en pomada para la administración tópica*
- El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con vaselina, triglicérido C₈-C₁₀, octilhidroxiestearato, alcohol bencílico y N-metilpirrolidona en una proporción que suministra una composición que contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.
- 35 *Formulación en pomada para la administración tópica*
- El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con vaselina blanca, propilenglicol, mono- y diglicéridos, parafina, hidroxitolueno butilado y edetato de calcio disódico en una proporción que suministra una composición que contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo por peso.
- 40 *Formulación en pomada para la administración tópica*
- El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con aceite mineral, parafina, carbonato de propileno, vaselina blanca y cera blanca para proporcionar una composición que contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.
- 45 *Formulación en crema para la administración tópica*
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se combina con aceite mineral, propilenglicol, palmitato de isopropilo, polisorbato 60, alcohol cetílico, monoestearato de sorbitán, estearato de polioxilo 40, ácido sórbico, metilparabeno y propilparabeno para formar una fase oleosa, que se combina con agua purificada mediante combinación por cizallamiento para proporcionar una composición que contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.
- 55 *Formulación en crema para la administración tópica*
- Una formulación en crema que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, alcohol bencílico, alcohol cetílico, ácido cítrico anhidro, mono- y diglicéridos, alcohol oleílico, propilenglicol, cetoestearilsulfato de sodio, hidróxido de sodio, alcohol estearílico, triglicéridos y agua contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.
- 60 *Formulación en crema para la administración tópica*
- Una formulación en crema que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, alcohol cetoestearílico, miristato de isopropilo, propilenglicol, cetomacrogol 1000, dimeticona 360, ácido cítrico, citrato de sodio y agua purificada, con imidurea, metilparabeno y propilparabeno como conservantes, contiene del 0,05 % al 5 % de

agente activo en peso.

Formulación en crema para la administración tópica

- 5 Una formulación en crema que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, ácido esteárico, alcohol cetoestearílico, palmitato de isopropilo, octilhidroxiestearato, BRIJ S2 (éter estearílico de PEG 2), BRIJ S20 (éter estearílico de PEG 20), N-metilpirrolidina, PEG y agua contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.

10 *Formulación en crema para la administración tópica*

- Una formulación en crema que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, ácido esteárico, alcohol cetoestearílico, palmitato de isopropilo, octilhidroxiestearato, BRIJ S2 (éter estearílico de PEG 2), BRIJ S20 (éter estearílico de PEG 20), N-metilpirrolidina, PEG400 y agua contiene del 0,05 % al 5 % de agente activo en peso.

15 Utilidad

- 20 El compuesto (I) ha demostrado ser un potente inhibidor de la familia de enzimas JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. La inhibición de la familia de las enzimas JAK podría inhibir la señalización de muchas citocinas proinflamatorias clave. Por lo tanto, se espera que el compuesto (I) sea útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias gastrointestinales, enfermedades inflamatorias y pruriginosas cutáneas, enfermedades inflamatorias oculares y enfermedades inflamatorias respiratorias.

25 Enfermedades inflamatorias cutáneas

- La dermatitis atópica se ha asociado a la elevación de las citocinas proinflamatorias que dependen de la vía JAK-STAT, en concreto, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFNy. Dado que el compuesto (I) presenta una inhibición potente de las cuatro enzimas JAK, se espera que inhiba potentemente las citocinas proinflamatorias características de la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias cutáneas. El compuesto (I) también demuestra en el presente documento que presenta un valor de pCl₅₀ de 7,8 para la inhibición de TARC inducida por TSLP en el ensayo 4. El compuesto (I) presentó un valor de pCl₅₀ de 8,5 para la inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en los ensayos celulares descritos en el ensayo 2. El compuesto (I) también presentó un valor de pCl₅₀ valor de 8,3 para la inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en queratinocitos epidérmicos humanos normales en el ensayo 13. Además, las formulaciones modelo de crema y pomada del compuesto (I) del ensayo 6 han demostrado una exposición significativa al compuesto en las capas de la epidermis y la dermis en minicerdos sin exposición detectable al plasma. En un ensayo farmacodinámico *ex vivo* que emplea piel humana recién extirpada, se demostró que el compuesto (I) inhibía la expresión génica de CXCL10 y CCL2. Se demostró que el compuesto (I) presentaba una buena permeabilidad en un ensayo de piel humana. El compuesto (I) también inhibió la producción de pSTAT3 inducida por IL-31 en un 80 % en un modelo *in vivo* modelo en el ensayo 9. Por último, el compuesto (I) presentó un efecto dependiente de la dosis en un modelo de dermatitis de contacto irritante inducida por TPA en ratones en el ensayo 10.

- También se ha demostrado que el compuesto (I) muestra un valor de pCl₅₀ de 8,4 para la inhibición de la fosforilación de STAT5 inducida por IL-2 en los ensayos celulares descritos en el ensayo 11, un valor de pCl₅₀ de 7,2 para la inhibición de la fosforilación de STAT4 inducida por IL-12 en células T CD3+ humanas en el ensayo 12, y un valor de pCl₅₀ de 8,4 para la inhibición de la fosforilación de STAT3 inducida por IL-22 en queratinocitos epidérmicos humanos normales en el ensayo 14. Por último, la recuperación del compuesto (I) para la interleucina-22 (IL-22) suprimió la expresión de filagrina a una concentración < 1 µM. IL-12, IL-22 e IL-23 son citocinas implicadas en la psoriasis (Baliwag *et al.*, Cytokine, 2015, 73(2), 342-350, 2015). Estas citocinas emiten señales a través de las enzimas JAK2 y Tyk2 (Ishizaki *et al.*, J. Immunol., 2011, 187, 181-189). Las terapias con anticuerpos dirigidas a estas citoquinas han demostrado utilidad clínica en la psoriasis (Schadler *et al.*, Disease-a-Month, 2018, 1-40). Se prevé que un inhibidor tópico de JAK que pueda bloquear estas citoquinas sea eficaz en esta enfermedad. Debido a que estas citocinas emiten señales a través de Tyk2 y JAK2, se espera que el compuesto (I) tenga actividad en esta enfermedad.

- 55 Se espera que los niveles dérmicos sostenidos de inhibidores de JAK en ausencia de niveles sistémicos significativos den como resultado una actividad antiinflamatoria y antipruriginosa local potente en la piel sin efectos adversos sistémicos. Se espera que dichos compuestos sean beneficiosos en una serie de afecciones inflamatorias o pruriginosas dérmicas que incluyen, entre otras, dermatitis atópica, vitíligo, linfoma cutáneo de células T y subtipos (síndrome de Sézary, micosis fungoide, reticulosis pagetoide, piel floja granulomatosa, papulosis linfomatoides, pitiriasis liquenoide crónica, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, linfoma cutáneo de linfocitos T CD30+, linfoma cutáneo secundario de células grandes CD30+, linfoma cutáneo de linfocitos T grandes CD30- que no es micosis fungoide, linfoma pleomórfico de linfocitos T, linfoma de Lennert, linfoma subcutáneo de linfocitos T, linfoma angiocéntrico, linfoma blástico de linfocitos NK), prurigo nodular, liquen plano, dermatitis de contacto, eccema dishidrótico, eccema, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis por estasis, amiloidosis cutánea primaria localizada, penfigoide ampolloso, manifestaciones cutáneas de la enfermedad del injerto contra el receptor, penfigoide, lupus disoide, granuloma anular, liquen simple crónico, prurito, prurito vulvar/escrotal/perianal, liquen escleroso, picor de la neuralgia

- posherpética, liquen plano pilar, psoriasis y foliculitis decalvans. En concreto, la dermatitis atópica (Bao *et al.*, JAK-STAT, 2013, 2, e24137), la alopecia areata (Xing *et al.*, Nat. Med., 2014, 20, 1043-1049) que incluye subtipos como alopecia areata monocularis, alopecia areata multilocularis, ofiasis, alopecia areata universalis, alopecia areata totalis y alopecia areata barba, vitílico (Craiglow *et al.*, JAMA Dermatol., 2015, 151, 1110-1112), el linfoma cutáneo de linfocitos T (Netchiporuk *et al.*, Cell Cycle, 2014, 13, 3331-3335), el prurigo nodular (Sonkoly *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol., 2006, 117, 411-417), el liquen plano (Welz-Kubiak *et al.*, J. Immunol. Res., 2015, ID: 854747), la amiloidosis cutánea primaria localizada (Tanaka *et al.*, Br. J. Dermatol., 2009, 161, 1217-1224), el penfigoide ampolloso (Feliciani *et al.*, Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 1999, 12, 55-61) y las manifestaciones dérmicas de la enfermedad del injerto contra receptor (Okiyama *et al.*, J. Invest. Dermatol., 2014, 134, 992-1000) se caracterizan por la elevación de determinadas citocinas que señalizan a través de la activación de JAK. Por consiguiente, el compuesto (I) puede ser capaz de aliviar la inflamación dérmica asociada o el prurito provocado por estas citocinas. En concreto, se prevé que el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, sea útil para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias cutáneas.
- Como se ilustra en la tabla 13, se ha demostrado que el compuesto (I) tiene un alto aclaramiento en los microsomas humanos. Así, tiene la ventaja de ser eliminado rápidamente, lo que minimiza la exposición sistémica y reduce el riesgo de efectos adversos.
- Como se ilustra en la tabla 13, el compuesto (I) también posee una alta permeabilidad que es beneficiosa para las indicaciones cutáneas, ya que parece estar relacionada con una mejor penetración en la piel.
- En algunas realizaciones, por lo tanto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria cutánea en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), que comprende aplicar una composición farmacéutica que comprende un compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéutico a la piel del mamífero.
- En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria cutánea es la dermatitis atópica. En algunas realizaciones, la dermatitis atópica es de leve a moderada. En algunas realizaciones, la dermatitis atópica es de moderada a grave.
- En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria cutánea es la alopecia areata.
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también puede usarse en combinación con uno o más compuestos útiles para enfermedades inflamatorias cutáneas. En algunas realizaciones, dichos uno o más compuestos es un esteroide, un corticoesteroide, un antibiótico, un antagonista del receptor HI de histamina, un inhibidor de calcineurina, un antagonista de IL-13, un inhibidor de PDE 4, un antagonista del receptor 44 acoplado a proteína G, un antagonista de IL-4, un antagonista de receptores de 5-HT 1a, un antagonista de receptores 5-HT 2b, un agonista de los receptores adrenérgicos alfa 2, un antagonista del receptor cannabinoid CB1, una antagonista de quimiocina CCR3, un inhibidor de colagenasa, un inhibidor de la fosfolipasa A2 citosólica, un inhibidor del ligando de eotaxina, un inhibidor del factor de transcripción GATA 3, un antagonista del receptor H4 de histamina, un antagonista de IL-10, un antagonista de IL-12, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-2, un antagonista de IL-23, un modulador de los receptores de IL-4, un antagonista de IL-15, un antagonista de IL-6, un antagonista de IL-8, un antagonista de IL-9, un antagonista de IL-5, un antagonista de inmunoglobulina E, un modulador de inmunoglobulina E, un antagonista del receptor de interferón gamma, un ligando de interferón gamma, un inhibidor del ligando de interleucina 33, un antagonista del receptor de interleucina-31, un antagonista de leucotrienos, un agonista del receptor X del hígado, un agonista beta del receptor X del hígado, un inhibidor del factor nuclear kappa B, un antagonista del receptor de OX-40, un antagonista de PGD2, un inhibidor de la fosfolipasa A2, un estimulador de la inositol fosfatasa 1 de dominio SH2, un inhibidor del ligando de la linfoproteína del estroma tímico, un modulador de TLR, un modulador de ligando TNF alfa, un estimulador del gen de TLR9, un estimulador de la proteína 4 de linfocitos T citotóxicos, un agonista del receptor opioideo kappa, un inhibidor de galectina-3, un inhibidor de la histona desacetilasa-1, un inhibidor de la histona desacetilasa-2, un inhibidor de la histona desacetilasa-3, un inhibidor de la histona desacetilasa-6, un inhibidor de la histona desacetilasa, un agonista de glucocorticoides, un inhibidor de la tirosina cinasa Syk, un antagonista del receptor TrkA, un antagonista de la integrina alfa-4/beta-1, un antagonista del receptor similar a interleucina 1, un Inhibidor de la enzima convertidora de interleucina-1, un antagonista del receptor de interleucina-31, un inhibidor del canal 3 de potasio activado por voltaje KCNA, un inhibidor del gen PDE4B, un Inhibidor de calicreína 2, un agonista del receptor 1 de esfingosina-1-fosfato, un estimulador de la proteína del epitelio pigmentario de la retina, un inhibidor de la glucoproteína de superficie de linfocitos T CD28, un antagonista de TGF beta o antagonista de vainilloide VR1.
- En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra en combinación con betametasona, ácido fúcídico, GR-MD-02, dupilumab, acetato de rosiprator, AS-101, ciclosporina, IMD-0354, secukinumab, Actimmune, lebrikizumab, CMP-001, mepolizumab, pegcantratinib, tezepelumab, MM-36, crisaborol, ALX-101, bertilimumab, FB-825, AX-1602, BNZ-1, abatacept, tacrolimus, ANB-020, JTE-052, ZPL-389, ustekinumab, GBR-830, GSK-3772847, ASN-002, remetinostat, apremilast, timaprant, MOR-106, asivatripa, nemolizumab, fevipiprant, doxiciclina, MDPK-67b, desloratadina, tralokinumab, fexofenadina, pimecrolimus, bepotastina, nalfurafina, VTP-38543, Q-301, ligelizumab, RVT-201, DMT-210, KPI-150, AKP-11, E-6005, AMG-0101, AVX-001, PG-102, ZPL-521, MEDI-9314, AM-1030, WOL-071007, MT-0814, valerato de betametasona, SB-011,

epinastina, tacrolimus, tranilast o viromed, o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra en combinación con un esteroide, un antibiótico y un humectante (Lakhani *et al.*, Pediatric Dermatology, 2017, 34, 3, 322-325). En algunas realizaciones, dicho uno o más compuestos es un antibiótico para grampositivos, como mupirocina o ácido fusídico.

El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también pueden usarse en combinación con antibióticos para grampositivos, tales como la mupirocina y el ácido fusídico, para tratar enfermedades inflamatorias cutáneas. En un aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria cutánea en un mamífero, comprendiendo el método aplicar un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un antibiótico para grampositivos a la piel del mamífero. En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un antibiótico para grampositivos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, por lo tanto, la invención proporciona una combinación terapéutica para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios cutáneos, comprendiendo la combinación el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para tratar trastornos inflamatorios cutáneos. El agente o agentes secundarios, cuando se incluyen, están presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en cualquier cantidad que produzca un efecto terapéuticamente beneficioso cuando se coadministra con el compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporciona, por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticas, y uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para tratar trastornos inflamatorios cutáneos.

Además, en un aspecto del método, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios cutáneos, comprendiendo el uso administrar al mamífero el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para tratar trastornos inflamatorios cutáneos.

Enfermedades inflamatorias gastrointestinales

Debido a su inhibición de la familia de enzimas JAK, se prevé que el compuesto (I) sea útil para una diversidad de indicaciones inflamatorias gastrointestinales que incluyen, entre otras, colitis ulcerosa (proctosigmoiditis, pancolitis, proctitis ulcerosa y colitis del lado izquierdo), enfermedad de Crohn, colitis colágena, colitis linfocítica, enfermedad de Behcet, enfermedad celíaca, colitis inducida por el inhibidor del punto de control inmunitario, ileítis, esofagitis eosinofílica, colitis relacionada con enfermedad del injerto contra el receptor y colitis infecciosa. La colitis ulcerosa (Reimund *et al.*, J. Clin. Immunology, 1996, 16, 144-150), la enfermedad de Crohn (Woywodt *et al.*, Eur. J. Gastroenterology Hepatology, 1999, 11, 267-276), la colitis collagenosa (Kumawat *et al.*, Mol. Immunology, 2013, 55, 355-364), la colitis linfocítica (Kumawat *et al.*, 2013), la esofagitis eosinofílica (Weinbrand-Goichberg *et al.*, Immunol Res., 2013, 56, 249-260), la colitis relacionada con la enfermedad de injerto contra el receptor (Coghill *et al.*, Blood, 2001, 117, 3268-3276), la colitis infecciosa (Stallmach *et al.*, Int. J. Colorectal Dis., 2004, 19, 308-315), la enfermedad de Behcet (Zhou *et al.*, Autoimmun. Rev., 2012, 11, 699-704), la enfermedad celíaca (de Nitto *et al.*, World J. Gastroenterol., 2009, 15, 4609-4614), la colitis inducida por inhibidor del punto de control inmunitario (por ejemplo, la colitis inducida por inhibidor de CTLA-4; Yano *et al.*, J. Translation Med., 2014, 12, 191), la colitis inducida por inhibidores de PD-1 o PD-L1) y la ileítis (Yamamoto *et al.*, Dig. Liver Dis., 2008, 40, 253-259) se caracterizan por la elevación de determinados niveles de citocinas proinflamatorias. Como muchas citocinas proinflamatorias señalizan a través de la activación de JAK, los compuestos que se describen en la presente solicitud pueden ser capaces de aliviar la inflamación y proporcionar alivio de los síntomas.

En algunas realizaciones, por lo tanto, la descripción proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria gastrointestinal en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria gastrointestinal en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), que comprende administrar al mamífero el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona además un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la colitis ulcerosa en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la divulgación, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Cuando se usa para tratar la colitis ulcerosa, el compuesto de la invención normalmente se administrará por vía oral en una sola dosis diaria o en múltiples dosis por día, aunque pueden usarse otras formas de administración. La

- cantidad de agente activo administrada por dosis o la cantidad total administrada por día normalmente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado y su actividad relativa, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.
- 5 Se prevé que las dosis adecuadas para el tratamiento de la colitis ulcerosa y otros trastornos inflamatorios gastrointestinales varíen de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 mg/día de agente activo, incluido de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg/día y de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 mg por día de activo agente para un ser humano promedio de 70 kg.
- 10 El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también puede usarse en combinación con uno o más agentes que actúan mediante el mismo mecanismo o mediante mecanismos diferentes para efectuar el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales. Las clases útiles de agentes para la terapia de combinación incluyen, entre otras, aminosalicilatos, esteroides, inmunosupresores sistémicos, pueden usarse anticuerpos anti-TNF_a, anticuerpos anti VLA-4, anticuerpos antiintegrina $\alpha_4\beta_7$, agentes antibacterianos y medicamentos antidiarreicos.
- 15 Los aminosalicilatos que pueden usarse en combinación con el compuesto (I) incluyen, entre otros, mesalamina, osalazina y sulfasalazina. Los ejemplos de esteroides incluyen, entre otros, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, budesonida, beclometasona y fluticasona. Los inmunosupresores sistémicos útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios incluyen, entre otros, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina y tacrolimus. Además, pueden usarse anticuerpos anti-TNF_a, que incluyen, entre otros, infliximab, adalimumab, golimumab y certolizumab, en la terapia combinada. Los compuestos útiles que actúan mediante otros mecanismos incluyen anticuerpos anti-VLA-4, tales como natalizumab, anticuerpos antiintegrina $\alpha_4\beta_7$, tales como vedolizumab, agentes antibacterianos, tales como rifaximina, y medicamentos antidiarreicos, tales como loperamida (Mozaffari *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 583-600; Danese, Gut, 2012, 61, 918-932; Lam *et al.*, Immunotherapy, 2014, 6, 963-971).
- 20 Los aminosalicilatos que pueden usarse en combinación con el compuesto (I) incluyen, entre otros, mesalamina, osalazina y sulfasalazina. Los ejemplos de esteroides incluyen, entre otros, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, budesonida, beclometasona y fluticasona. Los inmunosupresores sistémicos útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios incluyen, entre otros, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina y tacrolimus. Además, pueden usarse anticuerpos anti-TNF_a, que incluyen, entre otros, infliximab, adalimumab, golimumab y certolizumab, en la terapia combinada. Los compuestos útiles que actúan mediante otros mecanismos incluyen anticuerpos anti-VLA-4, tales como natalizumab, anticuerpos antiintegrina $\alpha_4\beta_7$, tales como vedolizumab, agentes antibacterianos, tales como rifaximina, y medicamentos antidiarreicos, tales como loperamida (Mozaffari *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 583-600; Danese, Gut, 2012, 61, 918-932; Lam *et al.*, Immunotherapy, 2014, 6, 963-971).
- 25 Los aminosalicilatos que pueden usarse en combinación con el compuesto (I) incluyen, entre otros, mesalamina, osalazina y sulfasalazina. Los ejemplos de esteroides incluyen, entre otros, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, budesonida, beclometasona y fluticasona. Los inmunosupresores sistémicos útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios incluyen, entre otros, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina y tacrolimus. Además, pueden usarse anticuerpos anti-TNF_a, que incluyen, entre otros, infliximab, adalimumab, golimumab y certolizumab, en la terapia combinada. Los compuestos útiles que actúan mediante otros mecanismos incluyen anticuerpos anti-VLA-4, tales como natalizumab, anticuerpos antiintegrina $\alpha_4\beta_7$, tales como vedolizumab, agentes antibacterianos, tales como rifaximina, y medicamentos antidiarreicos, tales como loperamida (Mozaffari *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 583-600; Danese, Gut, 2012, 61, 918-932; Lam *et al.*, Immunotherapy, 2014, 6, 963-971).
- 30 En otro aspecto, por lo tanto, la invención proporciona una combinación terapéutica para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales, comprendiendo la combinación un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para tratar trastornos inflamatorios gastrointestinales. Por ejemplo, la invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes seleccionados entre aminosalicilatos, esteroides, inmunosupresores sistémicos, pueden usarse anticuerpos anti-TNF_a, anticuerpos anti VLA-4, anticuerpos antiintegrina $\alpha_4\beta_7$, agentes antibacterianos y medicamentos antidiarreicos. El agente o agentes secundarios, cuando se incluyen, están presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en cualquier cantidad que produzca un efecto terapéuticamente beneficioso cuando se coadministra con un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 35 También se proporciona, por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para tratar trastornos inflamatorios gastrointestinales.
- 40 Enfermedades respiratorias
- 45 Las citocinas que señalizan a través de la ruta JAK-STAT, en concreto, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), interferón-γ (IFN_γ) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) también se han implicado en la inflamación asmática y en otras enfermedades respiratorias inflamatorias. Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado que el compuesto (I) es un potente inhibidor de las cinasas JAK y ha demostrado una potente inhibición de las citocinas proinflamatorias IL-13 en ensayos celulares.
- 50 La actividad antiinflamatoria de los inhibidores de JAK se ha demostrado sólidamente en modelos preclínicos de asma (Malaviya *et al.*, Int. Immunopharmacol., 2010, 10, 829-836; Matsunaga *et al.*, Biochem. and Biophys. Res. Commun., 2011, 404, 261-267; Kudlacz *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 2008, 582, 154-161). Por consiguiente, el compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede ser útil para el tratamiento de trastornos respiratorios inflamatorios como el asma. La inflamación y la fibrosis del pulmón son características de otras enfermedades respiratorias además del asma, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), neumonitis, enfermedades pulmonares intersticiales (incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática), lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, bronquitis, enfisema y bronquiolitis obliterante. El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, puede ser útil para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, neumonitis, enfermedades pulmonares intersticiales (incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática), lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterante, disfunción crónica del aloinjerto pulmonar (DCAP), rechazos de trasplantes de pulmón y sarcoidosis.
- 55 En un aspecto, por lo tanto, la descripción proporciona un método para tratar una enfermedad respiratoria en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende administrar al mamífero el compuesto (I) o una sal de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 60
- 65

- En un aspecto, la enfermedad respiratoria es asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, neumonitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), neumonitis, enfermedades pulmonares intersticiales (incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática), lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterante, rinitis alérgica o sarcoidosis. En otro aspecto, la enfermedad respiratoria es asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- En otro aspecto, la enfermedad respiratoria es una infección pulmonar, una helmintosis, hipertensión pulmonar arterial, sarcoidosis, linfangioleiomomatosis, bronquiectasia o una enfermedad pulmonar infiltrante. En otro aspecto más, la enfermedad respiratoria es neumonitis inducida por fármacos, neumonitis inducida por hongos, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, granulomatosis eosinofílica con poliangitis, neumonía eosinofílica aguda idiopática, neumonía eosinofílica crónica idiopática, síndrome hipereosinófilo, síndrome de Loffler, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada o neumonitis inducida por inhibidores del punto de control inmunitario.
- La invención proporciona además un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad respiratoria, comprendiendo el método administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también puede usarse en combinación con uno o más compuestos útiles para enfermedades oculares.
- Enfermedades oculares**
- Se ha demostrado que muchas enfermedades oculares se asocian a elevaciones de citocinas proinflamatorias que dependen de la vía JAK-STAT.
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, puede ser útil para el tratamiento de una serie de enfermedades oculares que incluyen, entre otras, uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad del ojo seco, degeneración macular senil y queratoconjuntivitis atópica.
- En concreto, la uveítis (Horai y Caspi, *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011, 31, 733-744), la retinopatía diabética (Abcouwer, *J. Clin. Cell Immunol.*, 2013, supl. 1, 1-12), el edema macular diabético (Sohn *et al.*, *American Journal of Ophthalmology*, 2011, 152, 686-694), la enfermedad del ojo seco (Stevenson *et al.*, *Arch. Ophthalmol.*, 2012, 130, 90-100), la oclusión venosa retiniana (Shchuko *et al.*, *Indian Journal of Ophthalmology*, 2015, 63(12), 905-911) y la degeneración macular senil (Knickelbein *et al.*, *Int. Ophthalmol. Clin.*, 2015, 55(3), 63-78) se caracterizan por la elevación de determinadas citocinas proinflamatorias que señalizan a través de la vía de JAK-STAT. Por consiguiente, el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede ser capaz de aliviar la inflamación ocular asociada y revertir la progresión de la enfermedad o proporcionar alivio de los síntomas.
- En un aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular en un mamífero que comprende administrar el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, al ojo del mamífero. En un aspecto, la enfermedad ocular es uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad del ojo seco, degeneración macular senil o queratoconjuntivitis atópica. En un aspecto, el método comprende administrar el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, por inyección intravítreo.
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también pueden usarse en combinación con uno o más compuestos útiles para enfermedades oculares.
- Otras enfermedades**
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, también puede ser útil para tratar otras enfermedades, tales como otras enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias o cánceres.
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede ser útil para tratar las caries bucales, la mucositis oral y la estomatitis aftosa recurrente.
- El compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede ser útil para tratar una o más de artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, rechazo de trasplante, xeroftalmia, artritis psoriásica, diabetes, diabetes de tipo 1, enfermedad de neuronas motoras, síndrome mielodisplásico, dolor, sarcopenia, caquexia, choque séptico, lupus eritematoso sistémico, leucemia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, espondilitis anquilosante, mielofibrosis, linfoma de linfocitos B, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de mama, mieloma múltiple, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células claras de ovario, tumor de ovario, tumor de páncreas,

policitemia vera, síndrome de Sjögren, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma, esplenomegalia, linfoma de linfocitos T y talasemia mayor.

- 5 La descripción, por tanto, proporciona un método para tratar estas enfermedades en un mamífero que comprende administrar el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéutico al mamífero.
- 10 En los párrafos anteriores, cuando se usan en terapia de combinación, los agentes pueden formularse en una única composición farmacéutica, como se ha descrito anteriormente, o los agentes pueden proporcionarse en composiciones separadas que se administran simultáneamente o en momentos separados, por la misma o por diferentes vías de administración. Cuando se administran por separado, los agentes se administran suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar un efecto terapéutico deseado. Dichas composiciones pueden envasarse por separado o pueden envasarse juntas en forma de un kit. Los dos o más agentes terapéuticos en el kit pueden administrarse por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.
- 15

Ejemplos

- 20 Los siguientes ejemplos de síntesis y biológicos se ofrecen para ilustrar la invención y no han de interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención. En los ejemplos a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. Las abreviaturas que no se definen a continuación tienen los significados generalmente aceptados.

ACN =	acetonitrilo
Bn =	bencilo
Boc =	terc-butiloxicarbonilo
d =	día o días
DIPEA =	N,N-diisopropiletilamina
DMF =	N,N-dimetilformamida
DMSO =	dimetilsulfóxido
EtOAc =	acetato de etilo
EtOH =	alcohol etílico
h =	hora u horas
HATU =	hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio
IPA =	alcohol isopropílico
MeOH =	metanol
min =	minuto o minutos
NMP =	N-metilpirrolidona
TA =	temperatura ambiente
TEA =	triethylamina
THF =	tetrahidrofurano
TFA =	ácido trifluoroacético

- 25 Los reactivos y disolventes se adquirieron de proveedores comerciales (Aldrich, Fluka, Sigma, etc.) y se usaron sin más purificación. El progreso de las mezclas de reacción se controló mediante cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida analítica de alta resolución (HPLC anal.) y/o espectrometría de masas. Las mezclas de reacción se elaboraron como se describe específicamente en cada reacción; habitualmente se purificaron mediante extracción y otros métodos de purificación, tales como la precipitación y la cristalización dependiente de la temperatura y el disolvente. Además, las mezclas de reacción se purificaron como hace habitualmente mediante cromatografía en columna o mediante HPLC preparativa, normalmente usando rellenos de columna C18 o BDS y eluyentes convencionales. Se describen condiciones normales de HPLC preparativa a continuación.
- 30

- 35 La caracterización de los productos de reacción se realizó como habitualmente mediante espectrometría de masas y RMN de ¹H. Para el análisis por RMN, las muestras se disolvieron en disolvente deuterado (tal como CD₃OD, CDCl₃ o d₆-DMSO) y los espectros de RMN de ¹H se obtuvieron con un instrumento Varian Gemini 2000 (400 MHz) en condiciones de observación convencionales. La identificación espectrométrica de masas de los compuestos se realizó mediante un método de ionización por electronebulización (EMEN) con un instrumento modelo API 150 EX de Applied Biosystems (Foster City, CA) o un instrumento 3100 de Waters (Milford, MA), acoplado a sistemas de autopurificación.

- 40 A menos que se indique lo contrario, se usaron las siguientes condiciones para purificaciones mediante HPLC preparativa.

ES 2 932 526 T3

Columna:	C18, 5 µm 21,2 x 150 mm o C18, 5 µm 21 x 250 mm o C14, 5 µm 21 x 150 mm
Temperatura de la columna:	Temperatura ambiente
Caudal:	20,0 ml/min
Fases móviles:	A = Agua + TFA al 0,05 % B = ACN + TFA al 0,05 %
Volumen de inyección:	(100-1500 µl)
Longitud de onda del detector:	214 nm

- Los compuestos en bruto se disolvieron en agua:ácido acético 1:1 a aproximadamente 50 mg/ml. Se realizó una ejecución de prueba de escala analítica de 4 minutos usando una columna C18 de 2,1 x 50 mm, seguida de una ejecución a escala preparativa de 15 o 20 minutos usando una inyección de 100 µl con el gradiente basado en el porcentaje de retención de B de la ejecución de prueba a escala analítica. Los gradientes exactos fueron dependientes de la muestra. Las muestras con impurezas cercanas en la tanda analítica se comprobaron con una columna C18 de 21 x 250 mm y/o una columna C14 de 21 x 150 mm para una mejor separación. Las fracciones que contenían el producto deseado se identificaron mediante análisis espectrométrico de masas.
- 5

10 Condiciones analíticas de HPLC

Método A

Columna:	LUNA C18 (2), 150 x 4,60 mm, 3 µm
Temperatura de la columna:	37 °C
Caudal:	1,0 ml/min
Volumen de inyección:	5 µl
Preparación de muestras:	Disolver en ACN:agua 1:1
Fases móviles:	A = Agua:ACN:TFA (98:2:0,05) B = Agua:ACN:TFA (2:98:0,05)
Longitud de onda del detector:	250 nm
Gradiente:	32 min en total (tiempo (min)/% de B): 0/2, 10/20, 24/90, 29/90, 30/2, 32/2

15 Método B

Columna:	LUNA C18 (2), 150 × 4,60 mm, 3 µm
Temperatura de la columna:	37 °C
Caudal:	1,0 ml/min
Volumen de inyección:	10 µl
Preparación de muestras:	Disolver en ACN:agua 1:1
Fases móviles:	A = Agua:ACN:TFA (98:2:0,05) B = Agua:ACN:TFA (10:90:0,05)
Longitud de onda del detector:	254 nm
Gradiente:	35 min en total (tiempo (min)/% de B): 0/2, 20/25, 23/90, 26/90, 27/2, 35/2

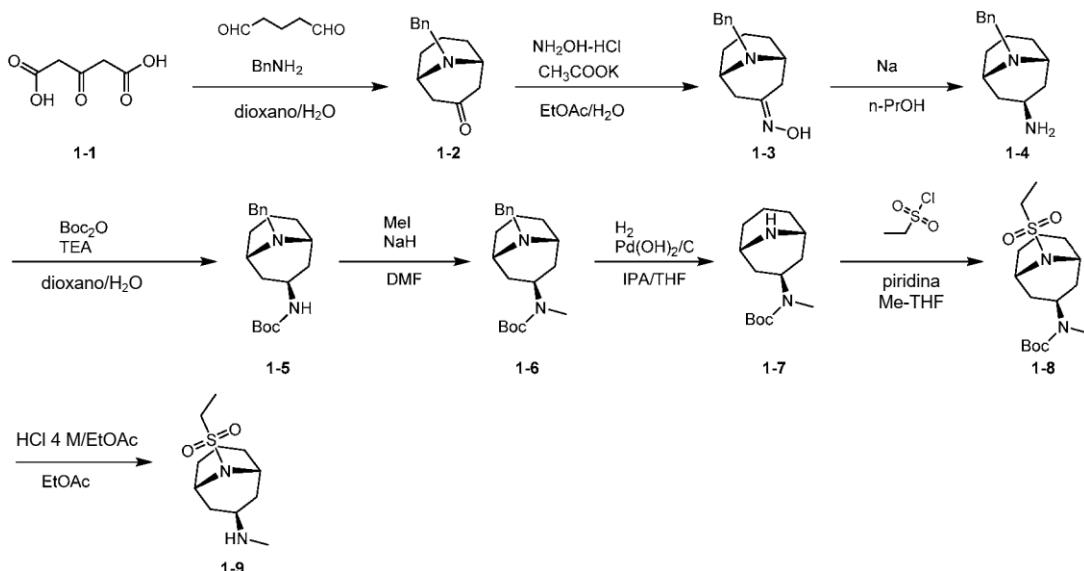
Método C

Columna:	Poroshell 120 SB-Aq, 150 mm por 4,6 mm, Parte de 2,7 micrómetros
n.º 683975-914	
Temperatura de la columna:	35 °C
Caudal:	1,0 ml/min
Volumen de inyección:	5 µl
Preparación de muestras:	Disolver en 50:MPB:50MPA
Fases móviles:	A = Acetonitrilo:agua:ácido trifluoroacético (1:99:0,20) B = Acetonitrilo:agua:ácido trifluoroacético (90:10:0,20)

20

Gradiente:

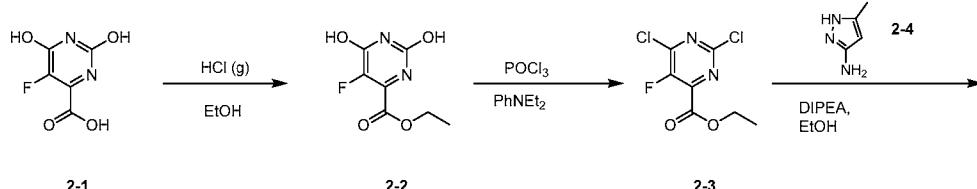
Tiempo, min	% de A	% de B
0,0	98,0	2,0
16,0	40,0	60,0
22,0	0,0	100,0
25,0	0,0	100,0
25,1	98,0	2,0
30,0	98,0	2,0

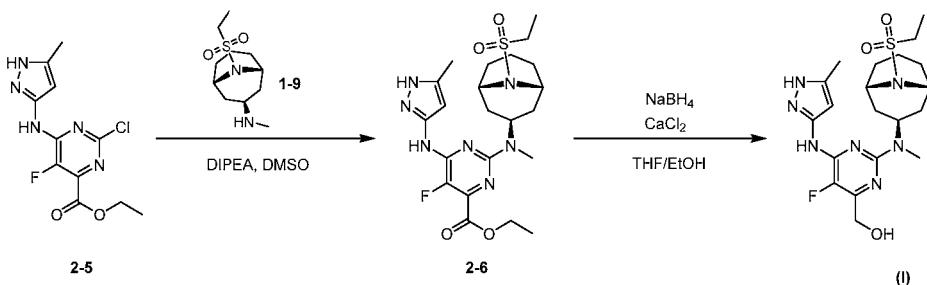
Preparación 1: ((1R,3s,5S)-9-(Etilsulfonil)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)carbamato de *terc*-butilo

- 5 **Etapa 1:** Se realizaron cinco reacciones en paralelo. A una solución del compuesto 1-1 (2,00 kg, 13,7 mol, 1,00 equiv.) en dioxano (5,00 l) y agua (20,0 l) se le añadió glutaraldehído (2,06 kg, 20,5 mol, 1,5 equiv.) y fenilmelanamina (1,54 kg, 14,4 mol, 1,05 equiv.) gota a gota a 10 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 16 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 5:1, R_f del producto = 0,40) y una LCMS indicó que la reacción se había completado. El valor de pH de la mezcla de reacción se ajustó a 2 con HCl concentrado (12 N) a 20 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se calentó hasta 60 °C y se agitó durante 1 h. Después de enfriar hasta 10 °C, se añadió acetato de etilo (10,0 l) a la mezcla. Luego, el valor de pH de la mezcla se ajustó a 10 mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio (12 N) a 10 °C. La mezcla se agitó durante 10 min. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3,00 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (4,00 l), se secaron sobre sulfato sódico y se filtraron. La capa orgánica de las cinco reacciones paralelas se reunió y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , éter de petróleo:acetato de etilo = 30:1-2:1) para obtener el compuesto 1-2 (10,0 kg, 51,5 % de rendimiento, 97 % de pureza). (m/z): [M+H]⁺ calculado para $C_{15}H_{19}NO$, 230,15; encontrado, 230,0. RMN de ¹H: 400 MHz, DMSO-d₆, δ 7,24-7,41 (m, 5H), 3,88 (s, 2H), 3,20-3,21 (m, 2H), 2,73-2,79 (m, 2H), 2,07 (d, J = 16,4 Hz, 2H), 1,75-1,84 (m, 2H), 1,45-1,50 (m, 3H), 1,24-1,36 (m, 1H).
- 10 20 **Etapa 2:** Se realizaron tres reacciones en paralelo. A una solución del compuesto 1-2 (3,00 kg, 13,1 mol, 1,0 equiv.) en acetato de etilo (24,0 l) y agua (9,00 l) se añadió CH_3COOK (2,05 kg, 20,9 mol, 1,6 equiv.) y $NH_2OH\text{-HCl}$ (1,82 kg, 26,2 mol, 2,0 equiv.) a 20 °C. La suspensión se calentó hasta 45 °C y se agitó durante 16 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 2:1, R_f del producto = 0,30) y una LCMS indicaron que la reacción se había completado. El valor del pH de la solución se ajustó a 8 con una solución saturada de bicarbonato de sodio, luego se diluyó con agua (15,0 l) y acetato de etilo (10,0 l). La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (10,0 l x 3). La capa orgánica de las tres reacciones se reunió, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El producto bruto se diluyó con n-heptano (12,0 l) y se agitó durante 12 h. El sólido se recogió por filtración para obtener el compuesto 1-3 (8,00 kg, 83,4 % de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para $C_{15}H_{20}N_2O$, 245,16; encontrado, 245,1. RMN de ¹H: 400 MHz, DMSO-d₆, 10,16 (s, 1H), 7,22-7,38 (m, 5H), 3,83 (s, 2H), 2,97 (s a, 2H), 2,87 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 2,60-2,62 (m, 1H), 2,20-2,25 (m, 1H), 2,09-2,13 (m, 1H), 1,72-1,85 (m, 3H), 1,39-1,49 (m, 3H).
- 25 30 **Etapa 4:** Se llevaron a cabo cuarenta y cinco reacciones en paralelo. A una solución del compuesto 1-3 (160 g, 655 mmol, 1,0 equiv.) en n-PrOH (3,20 l) a 110 °C se añadió Na (181 g, 7,86 mol, 12 equiv.) en porciones durante 3 h. La mezcla se agitó a 110 °C durante 2 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 2:1, R_f de EM = 0,40) indicó que la reacción se había completado. La mezcla se enfrió hasta 70 °C, se vertió en agua helada (4,00 l). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (1,00 l x 2). La capa orgánica reunida de las cuarenta y cinco reacciones se lavó con salmuera (20,0 l), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo se diluyó con n-hexano (12,0 l), se agitó durante 12 h. La suspensión se filtró para obtener el filtrado. El filtrado se concentró para obtener el compuesto 1-4 (6,00 kg, 88,4 % de rendimiento) como un aceite amarillo. RMN de ¹H, 400 MHz, DMSO-d₆, δ 7,18-7,35 (m, 5H), 3,76 (s, 2H), 3,26-3,35 (m, 1H), 2,76 (s, 2H), 1,86-1,90 (m, 2H), 1,67-1,73 (m, 2H), 1,54-1,59 (m, 5H), 1,41-1,45 (m, 3H).
- 35 40 **Etapa 5:** Se realizaron dos reacciones en paralelo. A una solución del compuesto 1-4 (2,10 kg, 9,12 mol, 1,1 equiv.) en dioxano (12,6 l) y agua (1,26 l) se le añadió Et_3N (1,01 kg, 10,0 mol, 1,1 equiv.) y $(Boc)_2O$ (2,19 kg, 10,0 mol, 1,1 equiv.) gota a gota a 0 °C, con la temperatura por debajo de 20 °C. La mezcla se calentó hasta 40 °C y se agitó durante

10 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 2:1, R_f del producto = 0,40) mostró que la reacción se había completado. La mezcla se enfrió hasta 10 °C, y se filtró para obtener los residuos de filtración. El filtrado se concentró. Los residuos de filtración se lavaron con n-hexano (3,00 l) para obtener el compuesto **1-5** (4,00 kg, 66,4 % de rendimiento) como un sólido blanco. **RMN de ^1H** : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 7,28-7,33 (m, 4H), 7,19-7,22 (m, 1H), 6,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,10-4,17 (m, 1H), 3,77 (s, 2H), 2,77 (s, 2H), 1,88-1,90 (m, 2H), 1,72-1,75 (m, 3H), 1,57-1,61 (m, 3H), 1,43-1,48 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

- 5 **Etapa 6:** Se realizaron cuatro reacciones en paralelo. A una suspensión del compuesto **1-5** (1,50 kg, 4,54 mol, 1,0 equiv.) en DMF (13,5 l) se añadió NaH (272 g, 6,81 mol, 60 % de pureza, 1,5 equiv.) en porciones a 0 °C bajo N₂. La suspensión se calentó de modo natural hasta 25 °C y se agitó durante 30 min. Después de que se enfriara hasta 0 °C, se añadió gota a gota Mel (773 g, 5,45 mol, 1,2 equiv.) a la suspensión. La mezcla de reacción se calentó de modo natural hasta 25 °C y se agitó durante 12 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 5:1, R_f del producto = 0,50) y una LCMS indicaron que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se vertió en agua helada (30,0 l) y se extrajo con acetato de etilo (9,00 l, 3,00 l). La capa orgánica reunida de las cuatro reacciones se lavó con agua helada (20,0 l), salmuera (10,0 l), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener el compuesto **1-6** (6,00 kg, bruto) como un aceite amarillo. El producto bruto se usó para la siguiente etapa. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 7,21-7,37 (m, 5H), 4,87 (s a, 1H), 3,80 (s, 2H), 2,86 (s, 2H), 2,68 (s, 3H), 1,64-1,99 (m, 6H), 1,40-1,49 (m, 13H). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₃₂N₂O₂, 344,25; encontrado 345,2.
- 10 **Etapa 7:** Treinta y nueve reacciones se llevaron a cabo en paralelo. A una solución del compuesto **1-6** (150 g, 435 mmol, 1,0 equiv.) en IPA (500 ml) y THF (500 ml) se le añadió Pd(OH)₂/C (70 g, 40 % de pureza). Después la suspensión se desgasificó al vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla se agitó bajo H₂ (344,738 kPa (50 psi)) a 25 °C durante 16 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 5:1, R_f de EM = 0,50) y una LCMS indicaron que la reacción se había completado. Se reunieron las treinta y nueve reacciones. La mezcla se filtró para obtener el filtrado. Los residuos de filtración se lavaron con IPA/THF (1:1, 25,0 l). El filtrado reunido se concentró para obtener el compuesto **1-7** (3,85 kg, bruto) como un aceite de color amarillo claro. El producto bruto se usó directamente para la siguiente etapa. (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₂₆N₂O₂, 255,20; encontrado 255,1. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 4,88 (s, 1H), 3,08 (s, 2H), 2,60 (s, 3H), 1,73-1,76 (m, 5H), 1,51-1,61 (m, 5H), 1,39 (s, 9H).
- 15 **Etapa 8:** Se realizaron cuatro reacciones en paralelo. A una solución del compuesto **1-7** (750 g, 2,95 mol, 1,0 equiv.) en 2-metiltetrahidrofurano (3,00 l) se le añadió piridina (466 g, 5,90 mol, 2,0 equiv.) y cloruro de etanosulfonilo (398 g, 3,10 mol, 1,05 equiv.) gota a gota a 0 °C bajo N₂. La mezcla se calentó hasta 25 °C y se agitó durante 3 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 2:1, R_f del producto = 0,50) indicó que la reacción se había completado. Las cuatro reacciones se reunieron. La mezcla se inactivó con agua helada (10,0 l). La capa orgánica se separó, y se lavó con HCl 0,5 N (3,00 l x 2). La capa acuosa combinada se extrajo con acetato de etilo (3,00 l), la capa orgánica se lavó de nuevo con HCl 0,5 N (500 ml). La capa orgánica reunida se lavó con salmuera (5,00 l), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener el compuesto **1-8** (2,20 kg, bruto) como un aceite amarillo. El producto bruto se usó en la siguiente etapa. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 4,94 (s, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,10 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (s, 3H), 1,83-1,91 (m, 5H), 1,56-1,71 (m, 5H), 1,40 (s, 9H), 1,19 (t, J = 7,2 Hz, 3H).
- 20 **Etapa 9:** Se realizaron cuatro reacciones en paralelo. A una solución del compuesto **1-8** (550 g, 1,59 mol, 1,0 equiv.) en EtOAc (2,75 l) se le añadió HCl/EtOAc (4 M, 3,0 equiv.) gota a gota a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 2:1, R_f del SM = 0,50) mostró que la reacción se había completado. Las cuatro reacciones se reunieron. La mezcla se filtró para obtener los residuos de filtración para obtener el compuesto **1-9** (1,25 kg, bruto, HCl) como un sólido amarillo. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 9,04 (s, 1H), 4,02 (s, 2H), 3,88-3,94 (m, 1H), 3,09 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,09-2,14 (m, 2H), 1,61-1,84 (m, 8H), 1,19 (t, J = 7,2 Hz, 3H).
- 25 **Preparación 2:** (2-(((1R,3s,5S)-9-(Etilsulfonil)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil - 1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol (**I**)
- 30 **Chemical Reaction Scheme:**
- 35 The scheme shows the synthesis of compound **I** from compound **2-1**. Compound **2-1** (2-(5-fluoro-2-hydroxy-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazine-1,5-dione)methanol) reacts with HCl (g) in EtOH to form compound **2-2** (2-(5-fluoro-2-hydroxy-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazine-1,5-dione)ethyl ether). Compound **2-2** then reacts with POCl₃ and PhNEt₂ to form compound **2-3** (2-(5-chloro-2-fluoro-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazine-1,5-dione)ethyl ether). Finally, compound **2-3** reacts with compound **2-4** (5-(dimethylamino)-2-(methylamino)-2H-pyrazole) and DIPEA in EtOH to yield compound **I**.
- 40 **Chemical Structures:**
- 45 Structure **2-1**: 2-(5-fluoro-2-hydroxy-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazine-1,5-dione)methanol.
- 50 Structure **2-2**: 2-(5-fluoro-2-hydroxy-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazine-1,5-dione)ethyl ether.
- 55 Structure **2-3**: 2-(5-chloro-2-fluoro-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazine-1,5-dione)ethyl ether.
- 60 Structure **2-4**: 5-(dimethylamino)-2-(methylamino)-2H-pyrazole.





Etapa 1: Una solución del compuesto 2-1 (1,00 kg, 5,74 mol, 1,0 equiv.) en etanol (15,0 l) con HCl saturado (1,40 kg, 38,4 mol) se agitó a 90 °C durante 60 h. La HPLC mostró que se detectó un pico principal. La mezcla de reacción se filtró. Los residuos de filtración se recogieron para obtener el compuesto 2-2 (1,00 kg, 81,8 % de rendimiento, 98,8 % de pureza) en forma de un sólido blanco. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 11,82 (s a, 1H), 10,82 (s a, 1H), 4,31(q, J = 7,2Hz, 2H), 1,27 (t, J = 6,8 Hz, 3H).

5 Etapa 2: Se realizaron cinco reacciones en paralelo. A una solución del compuesto 2-2 (560 g, 2,77 mol, 1,0 equiv.) en POCl₃ (1,68 l) se le añadió N,N-diethylanilina (289 g, 1,94 mol, 0,7 equiv.). La mezcla se agitó a 140 °C durante 12 h. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 10:1, R_f del producto = 0,50) indicó que el compuesto 2-2 se había consumido por completo. Las cinco reacciones se reunieron. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, dando un residuo. El residuo se diluyó con acetato de etilo (25,0 l). La solución se vertió en hielo triturado (25,0 l). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (25,0 l). Las capas orgánicas reunidas se lavaron con solución saturada de carbonato de sodio (10,0 l x 2), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo:acetato de etilo = 1:0-50:1) para obtener el compuesto 2-3 (2,00 kg) como un líquido marrón. RMN de ^1H : 400 MHz, CDCl₃, δ 4,51 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 1,44 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

10 Etapa 3: Se realizaron cuatro reacciones en paralelo. Una mezcla del compuesto 2-3 (480 g, 2,01 mol, 1,0 equiv.), compuesto 2-4 (224 g, 2,31 mol, 1,15 equiv.), DIPEA (519 g, 4,02 mol, 2,0 equiv.) en etanol (2,60 l) se desgasificó y se purgó con N₂ por 3 veces, y luego la mezcla se agitó a 25 °C durante 4 h bajo atmósfera de N₂. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 10:1) indicó que el compuesto 2-3 se había consumido por completo. Una TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:1, R_f del producto = 0,40) indicó que se formó una nueva mancha. Las cuatro reacciones se reunieron. La mezcla de reacción se filtró y se recogieron los residuos de filtración. El filtrado se concentró a presión reducida, dando un residuo. El residuo se trituró con agua (38,0 l) y se filtró. Los residuos de filtración (300 g) se trituraron con etanol (600 ml) y se filtraron. Los dos residuos de filtración se reunieron para obtener el compuesto 2-5 (1,50 kg, 62,2 % de rendimiento) como un sólido amarillo. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 12,31 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 6,38 (s, 1H), 4,35 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,27 (s, 3H), 1,30 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

20 Etapa 4: Se realizaron cuatro reacciones en paralelo. Una solución del compuesto 2-5 (254 g, 848 mmol, 1,0 equiv.), compuesto 1-9 (300 g, 1,06 mol, HCl, 1,25 equiv.) y DIPEA (548 g, 4,24 mol, 5,0 equiv.) en DMSO (600 ml) se agitó a 130 °C durante 16 h. Una TLC (acetato de etilo:éter de petróleo = 2:1, R_f = 0,30) y una LCMS mostraron que quedaba aproximadamente un 9 % del material de partida. La mezcla se enfrió hasta 25 °C. Las cuatro reacciones se reunieron, y se vertieron en agua helada (12,0 l). Se formó un precipitado amarillo. El sólido se recogió por filtración para dar el compuesto 2-6 (1,50 kg, aproximadamente un 76 % de pureza) como un sólido amarillo. (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₃₂FN₇O₄S, 510,22; encontrado 510,2.

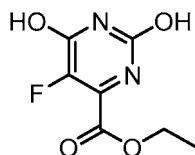
30 Una suspensión del compuesto 2-6 (440 g, 656 mmol, aproximadamente un 76 % de pureza) en etanol (1,10 l) se calentó hasta 95 °C hasta que se disolvió el sólido. La solución se enfrió hasta 25 °C y se agitó durante 12 h. Una HPLC mostró una pureza de aproximadamente un 96,9 %. Las tres reacciones se reunieron. La suspensión se filtró para obtener los residuos de filtración y obtener el compuesto 2-6 (aproximadamente 570 g, 96,9 % de pureza) como un sólido de color amarillo claro. El producto se usó durante la siguiente etapa directamente. RMN de ^1H : 400 MHz, DMSO-d₆, δ 12,12 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,59 (s a, 1H), 4,32 (m, 2H), 4,02 (s, 2H), 3,13 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,64-1,73 (m, 5H), 1,76-1,87 (m, 5H), 1,29 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,21 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

40 Etapa 5: Se realizaron cinco reacciones en paralelo. A una solución del compuesto 2-6 (130 g, 255 mmol, 1,0 equiv.) en tetrahidrofurano (3,25 l) y etanol (3,25 l) se le añadió NaBH₄ (77,2 g, 2,04 mol, 8,0 equiv.) y CaCl₂ (113 g, 1,02 mol, 4,0 equiv.) en porciones a 0 °C. La mezcla se calentó hasta 10 °C y se agitó durante 2 h. Una TLC (acetato de etilo:éter de petróleo = 3:1, R_f del producto = 0,20) mostró que la reacción se había completado. Las cinco reacciones se reunieron. La mezcla se inactivó con solución saturada de carbonato de sodio (6,00 l), se diluyó con acetato de etilo (15,0 l) y se agitó durante 0,5 h. La suspensión se filtró para obtener el filtrado. Se separó la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (5,00 l x 2). La capa orgánica reunida se lavó con salmuera (5,00 l), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar (I) (500 g, brutos) como un sólido de color amarillo claro.

Purificación: Se realizaron cinco reacciones en paralelo. Una suspensión de I (100 g, 210 mmol) en etanol (3,00 l) se calentó hasta 95 °C hasta que se disolvió el sólido. La solución se enfrió hasta 25 °C y se agitó durante 12 horas. Se formó una gran cantidad de precipitado. Una HPLC mostró una pureza del 100 %. Las cinco reacciones se reunieron.

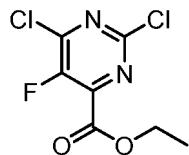
- 5 El sólido se recogió por filtración para obtener un total de 330 g del compuesto I (99,3 % de pureza) como un sólido de color amarillo claro (forma cristalina I). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₃₀FN₇O₃S, 468,21; encontrado 468,3. RMN de ¹H: 400 MHz, DMSO-d₆, δ 12,02 (s, 1H), 9,29 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 5,61 (s a, 1H), 5,02 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 4,33 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 4,02 (s, 2H), 3,12 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,84 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 1,82-2,01 (m, 3H), 1,63-1,74 (m, 5H), 1,21 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

10 **Preparación 3: 5-fluoro-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilato de etilo**



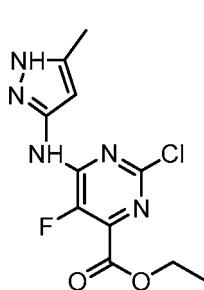
- 15 Una solución de ácido 5-fluoro-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxílico (20,4 g, 120 mmol) en DMF (200 ml) se trató con DBU (18,7 g, 123 mmol) y se agitó durante 0,5 h a 25 °C. Luego se añadió EtI (19,2 g, 123 mmol) y la solución resultante se calentó hasta 60 °C durante 3 horas. Se añadió H₂O (1000 ml) a la mezcla y el precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con H₂O (200 ml), y se secó para dar 5-fluoro-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilato de etilo (19 g, 80 % de rendimiento).

20 **Preparación 4: 2,6-dicloro-5-fluoropirimidin-4-carboxilato de etilo**



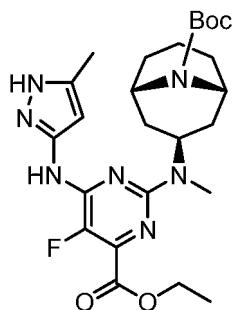
- 25 Una mezcla de 5-fluoro-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilato de etilo (5 g, 24,8 mmol), PhNEt₂ (2,58 g, 17,3 mmol), POCl₃ (130 g, 855,9 mmol) se calentó hasta 100 °C durante 4 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en agua helada (500 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (1000 ml) y la capa orgánica se lavó con solución sat. de NaHCO₃ (200 ml), salmuera (200 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (columna de 80 g; EtOAc al 0-50 % en hexanos) para obtener 2,6-dicloro-5-fluoropirimidin-4-carboxilato de etilo como un aceite amarillo (3,8 g, 65 %).

30 **Preparación 5: 2-cloro-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de etilo**



- 35 Una mezcla de 2,6-dicloro-5-fluoropirimidin-4-carboxilato de etilo (3,8 g, 16 mmol), 5-metil-1H-pirazol-3-amina (1,86 g, 19 mmol) y DIPEA (4 g, 32 mmol) en EtOH (100 ml) se agitó a t.a. durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Luego se añadió agua (500 ml), la mezcla de reacción se filtró y los residuos de filtración se lavaron con 100 ml de H₂O y se secaron al vacío para dar 2-cloro-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de etilo (3,8 g, 80 % de rendimiento).

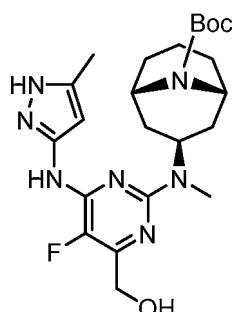
40 **Preparación 6: (1R,3S,5S)-3-((4-(Etoxicarbonil)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de terc-butilo**



Una mezcla de 2-cloro-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de etilo (1,7 g, 5,684 mmol), (1R,3s,5s)-3-(metilamino)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (2,17 g, 8,527 mmol) y DIPEA (1,47 g, 11,368 mmol) en DMSO (50 ml) se calentó hasta 110 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (200 ml), la mezcla de reacción se filtró y los residuos de filtración se lavaron con 200 ml de H₂O y se secaron al vacío para obtener (1R,3s,5S)-3-((4-(etoxicarbonil)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(methyl)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo bruto (3,5 g, brutos). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₃₇FN₇O₄, 518,29; encontrado 518,2.

10

Preparación 7: (1R,3s,5S)-3-((5-Fluoro-4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(methyl)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo

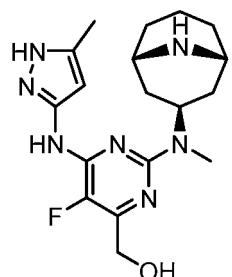


15

Una mezcla de (1R,3s,5S)-3-((4-(etoxicarbonil)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(methyl)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (3,5 g, 7 mmol), NaBH₄ (2,1 g, 56 mmol) y CaCl₂ (3,1 g, 28 mmol) en una mezcla de EtOH (50 ml) y THF (50 ml) se agitó durante la noche a 25 °C. La mezcla de reacción se inactivó con Na₂CO₃ (ac.) (80 ml) y H₂O (80 ml), la capa acuosa se extrajo con EtoAc (100 ml x 3) y las capas orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por HPLC prep. para obtener (1R,3s,5S)-3-((5-fluoro-4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(methyl)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (1,4 g, 44 %). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₅FN₇O₃, 476,28; encontrado 476,3.

20

Preparación 8: (2-(((1R,3s,5S)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(methyl)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol

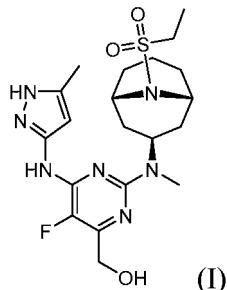


25

Una solución de (1R,3s,5S)-3-((5-fluoro-4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(methyl)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (1,4 g, 2,95 mmol) en HCl/dioxano (50 ml) se agitó a 25 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró y los residuos de filtración se lavaron con 100 ml de EtoAc y se secaron al vacío para obtener (2-(((1R,3s,5S)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(methyl)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol (1,4 g, 100 %). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₇FN₇O, 376,23; encontrado 376,2.

30

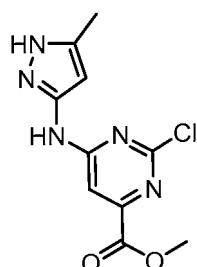
Preparación 9: (2-(((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(methyl)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-

1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol

5 El (2-((1R,3s,5S)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol (95 mg, 0,253 mmol) se disolvió en piridina (4,0 ml) y se trató con cloruro de etanosulfonilo (0,024 ml, 0,253 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas y después se concentró al vacío. El residuo bruto se disolvió en 3 ml de una mezcla 1:1 de ácido acético/agua, se filtró para eliminar las partículas y se purificó mediante HPLC preparativa (Agilent Dynamax 250 x 21,4 mm, 10 µm, 15 ml/min, ACN al 2-50 % + TFA al 0,05 %/ACN) usando un gradiente de 2-50 % de ACN en agua con TFA al 0,05 %. Las fracciones puras se reunieron y se liofilizaron para proporcionar la sal TFA del compuesto del título (12,92 mg, 8,8 % de rendimiento, 99,9 % de pureza). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₃₁FN₇O₃S, 468,22; encontrado 468.

10

15

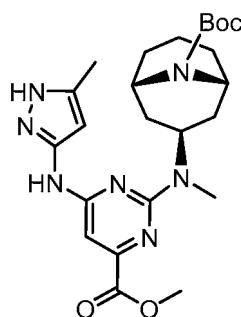
Preparación 10: 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de metilo

Una mezcla de 5-metil-1H-pirazol-3-amina (5,6 g, 58 mmol), 2,6-dicloropirimidin-4-carboxilato de metilo (12,0 g, 58 mmol) y DIPEA (15,0 g, 116 mmol) en DMSO (120 ml) se agitó a 25 °C durante 12 horas. Se añadió H₂O (500 ml) y el sólido precipitado se recogió por filtración para dar el producto intermedio del título (15 g, 97 %) como un sólido amarillo. (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₀H₁₁ClN₅O₂, 268,05; encontrado 268,1.

20

Preparación 11: (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxicarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo

25

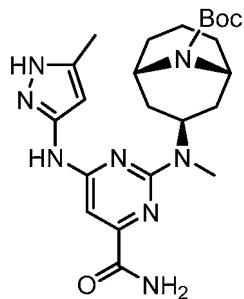


Una mezcla de 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de metilo (12,0 g, 45 mmol), (1R,3s,5S)-3-(metilamino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (13,7 g, 54 mmol) y DIPEA (12,0 g, 90 mmol) en NMP (120 ml) se agitó a 120 °C durante 16 horas. La reacción se vertió en H₂O (2000 ml), el sólido precipitado se recogió por filtración para dar el producto intermedio del título (15 g, 68 %) como un sólido blanco. (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₃₆N₇O₄, 486,28; encontrado 486,3.

30

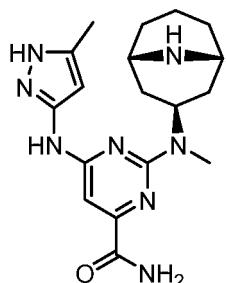
Preparación 12: (1R,3s,5S)-3-((4-carbamoyl-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo

35



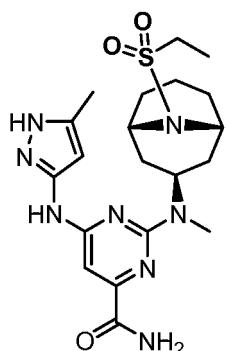
A (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxicarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (3 lotes de 2 g, 4,12 mmol) se le añadió NH₃/MeOH (3 partes alícuotas de 60 ml) en un tubo sellado de 100 ml, y la mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar el producto intermedio del título (3,7 g, 64 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₅N₈O₃, 471,28; encontrado 471,3.

Preparación 13: 2-((1R,3s,5S)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxamida



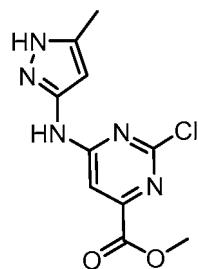
A una mezcla de (1R,3s,5S)-3-((4-carbamoyl-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-9-carboxilato de *terc*-butilo (3,7 g, 7,9 mmol) en dioxano (185 ml) se le añadió HCl/dioxano (37 ml). La reacción se agitó a 25 °C durante 3 horas. Una TLC mostró que no quedaba material de partida alguno. Se eliminó el solvente y el producto bruto se lavó con acetato de etilo/MeOH (100:1) para dar el intermedio del título como la sal HCl (4,0 g, 95 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₇N₈O, 371,23; encontrado, 371,1.

Preparación 14: 2-((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxamida (C-1)



Se disolvieron 2-((1R,3s,5S)-9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxamida (40 mg, 0,108 mmol) y DIPEA (0,057 ml, 0,324 mmol) en DMF (1,50 ml) y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadió cloruro de etanosulfonilo y se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 72 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa (Agilent Dynamax 250 x 21,4 mm, 10 µm, 15 ml/min, ACN al 2-70 % + TFA al 0,1 %/ACN) para proporcionar la sal TFA del compuesto del título (4,5 mg, 9,01 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₃₁N₈O₃S, 463,22; encontrado 463,2.

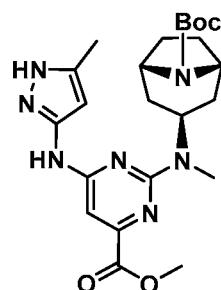
Preparación 15: 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de metilo



Una mezcla de 5-metil-1H-pirazol-3-amina (5,6 g, 58 mmol), 2,6-dicloropirimidin-4-carboxilato de metilo (12,0 g, 58 mmol) y DIPEA (15,0 g, 116 mmol) en DMSO (120 ml) se agitó a 25 °C durante 12 horas. Se añadió H₂O (500 ml) y el sólido precipitado se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (15 g, 97 %). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₀H₁₁ClN₅O₂, 268,05; encontrado 268,1.

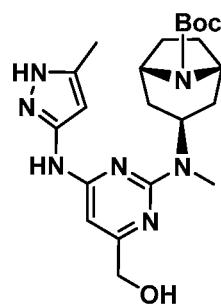
5 **Preparación 16:** (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxicarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabiciclo[3.2.1]octan-8-carboxilato de *terc*-butilo

10



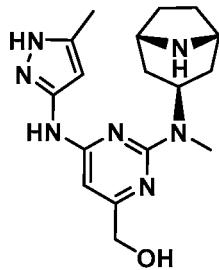
15 Una mezcla de 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilato de metilo (8,3 g, 31,0 mmol), (1R,3s,5S)-3-(metilamino)-8-azabiciclo[3.2.1]octan-8-carboxilato de *terc*-butilo (8,2 g, 34,1 mmol) y DIPEA (10,8 ml, 62,0 mmol) en DMSO (85 ml) se agitó a 120 °C durante 16 horas. La mezcla se vertió en 2 l de agua, se agitó vigorosamente y luego se filtró para producir el compuesto del título (11,1 g, 76 %). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₄N₇O₄, 472,27; encontrado 472,3.

20 **Preparación 17:** (1R,3s,5S)-3-((4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabiciclo[3.2.1]octan-8-carboxilato de *terc*-butilo



25 A una mezcla de NaBH₄ (8 g, 212 mmol) en MeOH (100 ml) se añadió (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxicarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabiciclo[3.2.1]octan-8-carboxilato de *terc*-butilo (10 g, 21,2 mmol) en THF (100 ml) a 0 °C. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a refluro durante 1 hora. La reacción se inactivó con agua (500 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). Las capas orgánicas reunidas se lavaron con salmuera (1 X 100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhídrico y concentrado al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo:acetato de etilo = 4:1) para obtener el compuesto del título (7 g, 68 %). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₃₄N₇O₃, 444,27; encontrado 444,3.

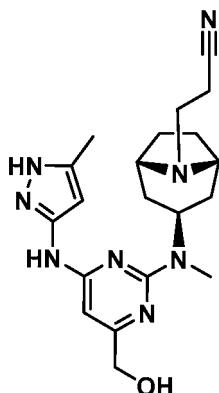
30 **Preparación 18:** (2-(((1R,3s,5S)-8-azabiciclo[3.2.1]octan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol



Una mezcla de (1R,3s,5S)-3-((4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabaciclo[3.2.1]octan-8-carboxilato de *terc*-butilo (6,5 g, 14,7 mmol) en HCl/dioxano (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar la sal HCl del producto intermedio del título (4,8 g, 100 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₂₆N₈O, 344,22; encontrado, 344,1.

Preparación 19: 3-((1R,3s,5S)-3-((4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabaciclo[3.2.1]octan-8-il)propanonitrilo (C-2)

10



El (2-(((1R,3s,5S)-8-azabaciclo[3.2.1]octan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol (50 mg, 0,146 mmol) y DIPEA (0,076 ml, 0,437 mmol) se disolvieron en MeOH (1,50 ml). Se añadió acrilonitrilo (0,014 ml, 0,218 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 min. A continuación, la mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo bruto se purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa (Agilent Dynamax 250 x 21,4 mm, 10 µm, 15 ml/min, ACN al 2-60 % + TFA al 0,1 %/ACN) para proporcionar la sal TFA del compuesto del título (14 mg, 19 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₉N₈O, 397,25; encontrado, 397,1.

20 **Ejemplo 1: Difracción de rayos X de polvos de la forma cristalina I**

Los patrones de difracción de rayos X de polvos de las figuras 1 se obtuvieron con un difractómetro de rayos X Bruker D8-Advance usando radiación Cu-K α ($\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$) con un voltaje de salida de 45 kV y una corriente de 40 mA. El instrumento se hizo funcionar en geometría Bragg-Brentano con ranuras de incidencia, divergencia y dispersión configuradas para maximizar la intensidad en la muestra. Para la medición, se presionó suavemente una pequeña cantidad de polvo (5-25 mg) sobre un soporte de muestras para formar una superficie lisa y se sometió a exposición a rayos X. Las muestras se barrieron en modo 2 θ -2 θ de 2° a 35° en 2 θ con un tamaño de etapa de 0,02° y una velocidad de barrido de 0,30° segundos por etapa. La obtención de datos se controló mediante el software de medición Bruker DiffracSuite y se analizó mediante el software Jade (versión 7.5.1). El instrumento se calibró con un patrón de corindón, dentro de un ángulo de dos theta $\pm 0,02^\circ$. Las posiciones de los picos de PXRD 2 θ observadas y los espacios d se muestran en la tabla 1 para la forma cristalina I.

Tabla 1: Datos de DRXP para la forma cristalina I

2-Theta	d (Å)	Área	% de A
5,91	14,94	10324	6,1
6,28	14,06	25530	15
6,75	13,08	27629	16,2
8,08	10,94	3161	1,9
11,19	7,90	70185	41,3
11,73	7,54	170124	100

(continuación)

2-Theta	d (Å)	Área	% de A
12,48	7,09	9018	5,3
13,52	6,55	12923	7,6
14,25	6,21	31558	18,5
14,64	6,05	30799	18,1
15,02	5,89	5121	3
15,68	5,65	4744	2,8
16,68	5,31	9857	5,8
17,62	5,03	32112	18,9
18,10	4,90	15613	9,2
18,80	4,72	109849	64,6
19,29	4,60	135137	79,4
20,53	4,32	49854	29,3
21,53	4,12	2321	1,4
22,16	4,01	9590	5,6
24,24	3,67	1915	1,1
25,52	3,49	8578	5
28,93	3,08	3263	1,9
29,89	2,99	10836	6,4
30,44	2,93	3804	2,2

Ejemplo 2: Análisis de la forma I

- 5 La calorimetría diferencial de barrido (CDB) se realizó usando un módulo modelo Q-100 de TA Instruments con un controlador Thermal Analyst. Los datos se recogieron y analizaron usando el software Thermal Analysis de TA Instruments. Se pesó con precisión una muestra de la forma cristalina en una bandeja de aluminio cubierta. Después de un período de equilibrio isotérmico de 5 minutos a 5 °C, la muestra se calentó utilizando una rampa de calentamiento lineal de 10 °C/min desde 0 °C hasta 300 °C. En la figura 2 se muestra un termograma de CDB representativo de la forma cristalina I. El termograma muestra una endoterma de fusión con un inicio a aproximadamente 248,5 °C y un pico a aproximadamente 250,9 °C. Se observaron acontecimientos térmicos endotérmicos secundarios previos a la fusión a aproximadamente 40 °C y aproximadamente 190 °C.
- 10 Las mediciones de análisis termogravimétrico (ATG) se realizaron usando un módulo modelo Q-50 de TA Instruments equipado con capacidad de resolución alta. Los datos se recogieron usando el controlador Thermal Analyst de TA Instruments y se analizaron usando el software Universal Analysis de TA Instruments. Una muestra pesada se colocó sobre una bandeja de platino y se escaneó con una velocidad de calentamiento de 10 °C desde la temperatura ambiente hasta 300 °C. Las cámaras de equilibrio y de horno se purgaron con flujo de nitrógeno durante su uso. En la figura 3 se muestra una señal representativa del ATG de la forma cristalina I de la invención. El perfil de ATG muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,70 % entre 22 °C-125 °C, bajo purga de N₂ y la descomposición a una temperatura de inicio de aproximadamente 250 °C.
- 15 La medición de sorción de humedad dinámica (SHD) se realizó usando una microbalanza atmosférica VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se usó una muestra pesada y la humedad fue el valor más bajo posible (cerca a una HR del 0%) al comienzo del análisis. El análisis por SHD consistió en una etapa de secado inicial (HR del 0%) durante 120 minutos, seguida de dos ciclos de sorción y desorción con una velocidad de barrido de una HR del 5%/etapa en el intervalo de humedad de una HR del 5% a una HR del 90%. La ejecución de SHD se realizó de forma isotérmica a 25 °C. En la Figura 4 se muestra una señal representativa de SHD para la forma I. La absorción de humedad total entre el 5 y el 90% de HR fue del 1,96%.
- 20 30 El análisis de Karl Fisher de la forma I mostró que contiene 1,6 % en p/p de agua.

Preparación 20: Preparación de la forma II

- 35 Se suspendieron 28 g del compuesto 2-6 en una mezcla de 70 ml de EtOH y 154 ml de THF, y luego se enfrió hasta 5 °C. A esta suspensión se le añadieron 82 ml de LiBH₄ (2,0 M en THF) durante 1 hora. Después de la adición, la temperatura de reacción se elevó hasta 10 °C y se agitó durante 2 horas, tras de lo cual el material de partida no fue detectado por análisis HPLC. A continuación, la reacción se inactivó con una mezcla de 16,8 g de cloruro de amonio disueltos en 77 ml de agua. Después de calentar hasta 45 °C, se cargaron 467 ml de agua durante 3 horas. Una vez añadidos 370 ml de esta carga de agua, se observó la formación de cristales. Cuando se completó la carga de agua, la suspensión se mantuvo a 45 °C durante 5 horas y luego se aumentó hasta 15 °C durante 3 horas. Después de

mantener la suspensión a 15 °C durante 7,5 horas, el producto se filtró y se enjuagó con 140 ml de EtOH, seguido de dos enjuagues con agua de 140 ml. El sólido se secó al vacío a 45 °C con una purga de nitrógeno durante la noche para obtener 22,6 g de la forma II (87 % de rendimiento, 98,6 % de pureza).

- 5 Se calentaron 21 g de la forma II de grado intermedio del compuesto (I), obtenida en la etapa anterior, en 63 ml de DMSO hasta 90 °C. Se añadieron 420 ml de n-PrOH durante 40 minutos manteniendo la temperatura de la mezcla por encima de 86 °C. Se observaron cristales refringentes muy finos durante el tercio final de la adición de nPrOH. La mezcla se agitó durante 4 horas a 92 °C. La mezcla se enfrió hasta 20 °C durante 8 horas y se agitó a 20 °C durante la noche. El producto se filtró y se lavó con 52,5 ml de nPrOH, seguido de 52,5 ml de etanol dos veces. El sólido se secó al vacío con una purga de nitrógeno a 55 °C para dar 19,24 g de la forma II (92 % de rendimiento, 99,6 % de pureza).
- 10

Ejemplo 3: Difracción de rayos X de polvos de la forma cristalina II

- 15 Los patrones de difracción de rayos X de polvo de la figura 5 se obtuvieron en las mismas condiciones que para la forma I. Las posiciones de los picos PXRD 2θ y los espacios d observados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla: Datos de DRXP para la forma cristalina II

2-Theta	d (Å)	Área	% de A
8,9	10,0	35511	9,8
9,5	9,3	63058	17,4
10,2	8,7	91113	25,2
11,4	7,7	3617111	100
14,4	6,1	29371	8,1
16,2	5,5	160020	44,2
16,6	5,3	173568	48
17,7	5,0	153041	42,3
19,0	4,7	112788	31,2
19,2	4,6	93782	25,9
19,8	4,5	54560	15,1
20,1	4,4	93452	25,8
20,4	4,3	111287	30,8
20,6	4,3	49977	13,8
20,8	4,3	58656	16,2
21,3	4,2	27118	7,5
21,9	4,1	289766	80,1
25,9	3,4	35768	9,9
30,1	3,0	26278	7,3
30,5	2,9	23740	6,6
30,9	2,9	51901	14,3
32,6	2,7	22443	6,2
33,8	2,7	23525	6,5

20 **Ejemplo 4: Análisis de la forma II**

La forma II se probó en condiciones similares a la forma I.

- 25 En la figura 6 se muestra un termograma de la CDB representativo de la forma cristalina II de la invención. El termograma muestra un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, que muestra un máximo en el flujo de calor endotérmico a una temperatura de 238,1 °C ± 2 °C.

En la figura 7 se muestra una señal representativa del ATG de la forma cristalina II de la invención. El perfil de ATG muestra una pérdida de peso asociada a la descomposición después de 222 °C.

- 30 35 El análisis por SHD consistió en una etapa de secado inicial (HR del 0 %) durante 120 minutos, seguida de dos ciclos de sorción y desorción con una velocidad de barrido de una HR del 5 %/etapa en el intervalo de humedad de una HR del 5 % a una HR del 90 %. La ejecución de SHD se realizó de forma isotérmica a 25 °C. En la figura 8 se muestra una señal representativa de SHD para la forma II. La absorción de humedad total entre el 5 y el 90 % de HR fue de aproximadamente el 0,02 %.

Ejemplo 5: Difracción de rayos X de monocrystal de la forma II

Los datos se recogieron en una fuente Rigaku Oxford Diffraction Supernova Dual, Cu a cero, difractómetro Atlas CCD equipado con un dispositivo de refrigeración Oxford Cryosystems Cobra. Los datos se recogieron usando radiación Cu K α . La estructura se resolvió y se refinó usando el software cristalográfico del paquete Bruker AXS SHELXTL. Los detalles completos se pueden encontrar en el CIF. A menos que se indique lo contrario, los átomos de hidrógeno unidos al carbono se colocaron geométricamente y se permitió su refinado con un parámetro de desplazamiento isotrópico encabalgado. Los átomos de hidrógeno unidos a los heteroátomos se localizaron en un mapa de diferencias de Fourier y se dejaron refinar libremente con un parámetro de desplazamiento isotrópico.

10

Tabla: Datos del análisis por difracción de rayos X de monocrystal de la forma II

Fórmula empírica	C ₂₀ H ₃₀ FN ₇ O ₃ S
Peso de la fórmula	467,57
Tamaño del cristal	0,10 x 0,10 x 0,02 mm ³
Temperatura de la recogida de datos	19,85 °C (293(2) K)
Longitud de onda usada para la recogida de datos	1,54178 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n
Dimensiones de la célula unitaria	$a = 12,4330(8)$ Å
	$b = 12,2675(9)$ Å
	$c = 14,5337(8)$ Å
	$\alpha = 90^\circ$
	$\beta = 96,996(6)^\circ$
	$\gamma = 90^\circ$
Volumen de la célula unitaria	2200,2(2) Å ³
Z (Número de moléculas en la célula unitaria)	4
Densidad (calculada)	1,412 g/cm ³
Intervalo de theta para la recopilación de datos	de 4,422 a 75,445°
Intervalos de índice	-15 ≤ h ≤ 15 -12 ≤ k ≤ 15 -18 ≤ l ≤ 18
Reflexiones recogidas	21349
Reflexiones independientes	4442 [R(int) = 0,0762]
Índices R finales [$F_2 > 2\sigma(F_2)$]	R1 = 0,0568, wR2 = 0,1294
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1028, wR2 = 0,1599

Ensayos biológicos**15 Ensayo 1: Ensayos bioquímicos de cinasa JAK y Tyk2**

Se llevó a cabo un panel de cuatro ensayos bioquímicos de JAK de LanthaScreen (JAK1, 2, 3 y Tyk2) en un tampón de reacción de cinasa común (HEPES 50 mM, pH 7,5, Brij-35 al 0,01 %, MgCl₂ 10 mM y EGTA 1 mM). Se obtuvieron enzimas JAK marcadas con GST recombinantes y un sustrato peptídico STAT1 marcado con GFP en Life Technologies.

Los compuestos diluidos en serie o por separado se preincubaron con cada una de las cuatro enzimas JAK y el sustrato en microplacas blancas de 384 pocillos (Corning) a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se añadió ATP para iniciar las reacciones de cinasa en un volumen total de 10 µl con DMSO al 1 %. Las concentraciones finales de enzimas para JAK1, 2, 3 y Tyk2 son 4,2 nM, 0,1 nM, 1 nM y 0,25 nM, respectivamente; las concentraciones de ATP Km correspondientes utilizadas son 25 µM, 3 µM, 1,6 µM y 10 µM; mientras que la concentración del sustrato es de 200 nM para los cuatro ensayos. Se permitió que las reacciones de las cinasas continuaran durante 1 hora a

temperatura ambiente antes de que se añadiese una preparación de 10 µl de EDTA (concentración final 10 mM) y anticuerpo Tb-anti-pSTAT1 (pTyr701) (Life Technologies, concentración final 2 nM) en tampón de dilución TR-FRET (Life Technologies). Se dejaron incubar las placas a temperatura ambiente durante 1 h antes de que se leerlas en el lector EnVision (Perkin Elmer). Las señales de proporción de emisión (520 nm/495 nm) se registraron y utilizaron para calcular los valores de porcentaje de inhibición basados en DMSO y controles de fondo.

Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de porcentaje de inhibición frente a las concentraciones de compuesto y se determinaron los valores de IC_{50} a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el software Prism (software GraphPad). Los resultados se expresaron como pIC_{50} (logaritmo negativo de IC_{50}) y posteriormente se convirtieron en pKi (logaritmo negativo de la constante de disociación, K_i) usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

Tabla 2: Valores de pKi del compuesto (I)

	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk2 (pKi)
Compuesto (I)	10,2	10,2	9,1	9,9

15 Ensayo 2: Ensayo celular de potencia de JAK: Inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células BEAS-2B

El ensayo de potencia celular para la inhibición de JAK se llevó a cabo midiendo la fosforilación de STAT6 inducida por interleucina-13 (IL-13, R&D Systems) en células epiteliales de pulmón humano BEAS-2B (ATCC). El anticuerpo anti-STAT6 (Cell Signaling Technologies) se conjugó con esferas acceptoras AlphaScreen (Perkin Elmer), mientras que el anticuerpo anti-pSTAT6 (pTyr641) (Cell Signaling Technologies) se biotiniló usando sulfo-NHS-biotina EZ-Link (Thermo Scientific).

Se cultivaron células BEAS-2B a 37 °C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5 % en medio DMEM al 50 %/F-12 al 50 % (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Hyclone), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies) y GlutaMAX 2 mM (Life Technologies). El día 1 del ensayo, las células se sembraron a una densidad de 7.500 células/pocillo en placas de color blanco de 384 pocillos recubiertos con poli-D-lisina (Corning) con 25 µl de medio y se les permitió adherirse durante la noche en la incubadora. El día 2 del ensayo, el medio se retiró y se reemplazó por 12 µl de tampón de ensayo (solución salina equilibrada de Hank/HBSS, HEPES 25 mM y albúmina sérica bovina 1 mg/ml (BSA) que contenía dosis de respuesta de compuestos de ensayo. El compuesto se diluyó en serie en DMSO y después se diluyó otras 1000 veces en medio para llevar la concentración final de DMSO al 0,1 %. Las células se incubaron con los compuestos de prueba a 37 °C durante 1 h, seguido de la adición de 12 µl de IL-13 precalentada (80 ng/ml en tampón de ensayo) para la estimulación. Despues de incubar a 37 °C durante 30 min, se retiró el tampón de ensayo (que contenía el compuesto e IL-13) y 10 µl de tampón de lisis celular (HEPES 25 mM, SDS al 0,1 %, NP-40 al 1 %, MgCl_2 5 mM, EDTA 1,3 mM, EGTA 1 mM y complementado con inhibidores de proteasa Complete Ultra mini y PhosSTOP de Roche Diagnostics). Las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min antes de la adición de reactivos de detección. En primer lugar, se añadió una mezcla de esferas acceptoras conjugadas con biotina-anti-pSTAT6 y anti-STAT6 y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h, seguido de la adición de esferas donadoras conjugadas con estreptavidina (Perkin Elmer). Despues de un mínimo de 2 h de incubación, las placas de ensayo se leyeron en el lector de placas EnVision. Se registraron señales de luminiscencia de AlphaScreen y se usaron para calcular los valores de porcentaje de inhibición basados en DMSO y los controles de fondo.

Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de porcentaje de inhibición frente a las concentraciones de compuestos y se determinaron los valores de IC_{50} a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el software Prism. Los resultados también pueden expresarse como el logaritmo negativo del valor de IC_{50} , pIC_{50} . El compuesto (I) presentó en este ensayo un valor de pIC_{50} de 8,5.

50 Ensayo 3: Ensayo de citotoxicidad

Se realizó un ensayo de viabilidad/citotoxicidad celular luminiscente CellTiter-Glo en células epiteliales de pulmón humano BEAS-2B (ATCC) en condiciones normales de crecimiento.

Se cultivaron las células a 37 °C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5 % en medio DMEM al 50 %/F-12 al 50 % (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Hyclone), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies) y GlutaMAX 2 mM (Life Technologies). El día 1 del ensayo, se sembraron células a una densidad de 500 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 384 pocillos blancas (Corning) con 25 µl de medio y se les permitió adherirse durante una noche en la incubadora. El día 2 del ensayo, se añadieron 5 µl de medio que contenía dosis de respuesta de los compuestos de prueba y se incubó a 37 °C durante 48 h. Posteriormente se añadieron 30 µl de solución de detección CellTiter-Glo (Promega), se mezclaron en un agitador orbital durante 5 min y se incubaron durante 10 min más antes de la lectura en el lector EnVision. Se registraron señales de luminiscencia y se calcularon los valores de control de DMSO en porcentaje.

Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de control de DMSO en porcentaje frente a las concentraciones de compuesto para obtener curvas de dosis-respuesta por línea que conecta cada punto de datos. La concentración a la que cada curva cruza el umbral de inhibición del 15 % se define como CC₁₅. Los resultados se expresaron como el logaritmo negativo del valor de CC₁₅, pCC₁₅.

Se prevé que los compuestos de ensayo que presentan un valor de pCC₁₅ más bajo en este ensayo tengan menos probabilidad de provocar citotoxicidad. El pCC₁₅ para el compuesto (I) fue de 5,36.

10 **Ensayo 4: Ensayo TARC inducido por TSLP *in vitro* en PBMC humanas**

La unión de TSLP a su receptor induce un cambio conformacional que activa JAK1 y JAK2 para fosforilar diversos factores de transcripción, incluidos STAT3 y STAT5. En las células inmunitarias residentes en la piel, esto desencadena una cascada de acontecimientos ventos intracelulares que provocan la proliferación celular, la antiapoptosis, la migración de células dendríticas y la producción de citocinas y quimiocinas Th2. Durante la fase aguda de la dermatitis atópica, la piel es invadida por linfocitos Th2. En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primarias, TSLP tiene un efecto proinflamatorio al activar las células dendríticas mieloídes para atraer y estimular las células T. Este proceso está mediado por el timo y la quimiocina regulada por activación (TARC/CCL17). TARC ha demostrado ser un biomarcador clínico prometedor para la dermatitis atópica, con niveles séricos elevados que indican una patogénesis acelerada de la inflamación cutánea.

En este ensayo, se demostró que la estimulación de TSLP induce la liberación de TARC de las PBMC, y que esta respuesta se atenúa de manera dependiente de la dosis tras el tratamiento con el compuesto (I). Se descongelaron las PBMC (previamente aisladas de sangre entera y congeladas en partes alícuotas a -80 °C) de 3 donantes, se sembraron y se dejaron en reposo a 37 °C durante 1 hora. Las células se pretrataron durante 1 hora con una serie de diluciones de 3,7X que varían entre 33,3 µM y 0,95 nM del compuesto (I). A continuación, las células se estimularon con TSLP 10 ng/ml o se les proporcionó un volumen equivalente de medio simple como control basal. Después de 48 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares y se midió la TARC usando el kit ELISA Human CCL17/TARC Quantikine.

30 Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de porcentaje de inhibición frente a las concentraciones de compuestos y se determinaron los valores de Cl₅₀ a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el software Prism de GraphPad. Los resultados también pueden expresarse como el logaritmo negativo del valor de Cl₅₀, pCl₅₀. El compuesto (I) presentó en este ensayo un valor de pCl₅₀ de 7,8.

35 **Ensayo 5: Ensayo de farmacocinética en ratas**

El objetivo de esta investigación fue evaluar la farmacocinética del compuesto (I) en plasma después de la administración oral única (p.o, n=3) o intravenosa (i.v., n=2) a ratas macho Sprague Dawley.

40 A tres ratas Sprague Dawley macho se les administró una dosis i.v. única del compuesto (I) (1,0 mg/kg en DMSO al 5 % + tampón de citrato 20 mM, pH 4) a través de un catéter en la vena yugular o una dosis oral única de 5 mg/kg mediante sonda oral (5,0 mg/kg en HPMC al 1 % con Tween80 al 0,1 %). A las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la administración de la dosis, se extrajeron muestras de sangre a través de un catéter en la vena yugular hacia tubos con EDTA y se mantuvieron refrigeradas en hielo antes de la centrifugación (12.000 rpm, 4 min, 4 °C). Se transfirieron partes alícuotas de plasma a tubos de agrupamiento y se almacenaron congeladas (-80 °C) antes del bioanálisis.

50 Las muestras de plasma se agitaron en vórtice antes de transferir una parte alícuota de 50 µl de muestra a una placa de 96 pocillos y se extrajeron con 200 µl de acetonitrilo que contenía un patrón interno. Después de la extracción, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 3700 rpm (2809 x g). El sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos y luego se diluyó en ácido fórmico al 0,2 % en agua (dilución triple). Para todas las muestras, se inyectaron 10 µl en una columna Waters Xbridge (C18 30 x 2,1 mm) con un caudal de 0,80 ml/min. La fase móvil A consistió en ácido fórmico al 0,2 % en agua y la fase móvil B en ácido fórmico al 0,2 % en acetonitrilo. Los niveles en plasma del compuesto (I) se determinaron mediante análisis LC-MS-MS. Los parámetros PK convencionales se determinaron usando Phoenix WinNonlin (Certara Inc.).

Tabla 3: Parámetros farmacocinéticos

	1 mg/kg i.v.	5 mg/kg p.o.
T _{1/2} (h)	1,34	ND
C _{máx} (µg/ml)	0,907	0,077
AUC (0-t) (µg.hr/ml)	0,291	0,112

(continuación)

	1 mg/kg i.v.	5 mg/kg p.o.
CL (L/hr/kg)	3,54	ND
Vdss (L/kg)	1,1	ND
F %	ND	7,7

ND, no determinado.

Ensayo 6: Farmacocinética dérmica en piel de minicerrodo Hanford

- 5 El objetivo de esta investigación era determinar la farmacocinética epidérmica, dérmica y plasmática del compuesto (I) después de una exposición de 24 horas a piel intacta de minicerrodo Hanford. El compuesto (I) se formuló al 0,5 % (en p/p) en crema o pomada como se describe, como formulación A o formulación B, respectivamente, en la tabla 4.

Tabla 4: Formulaciones del compuesto (I)

Formulación A (crema)	Formulación B (pomada)
Compuesto (I)	0,5 %
Ácido esteárico	5 %
Alcohol cetoestearílico	5 %
Palmitato de isopropilo	4 %
Octilhidroxiestearato	2 %
BRIJ S2 (éter estearílico de PEG 2)	1,08 %
BRIJ S20 (éter estearílico de PEG 20)	6,92 %
N-Metilpirrolidina	10 %
PEG400	10 %
Agua OI	55,5 %

- 10 Veinticuatro horas antes de la dosificación, se afeitó el pelo del lomo de minicerdos Hanford de 10-15 kg dejando al descubierto un área de al menos 700 cm² (aproximadamente el 10 % de la superficie corporal). En el tiempo cero, se aplicó el compuesto (I) en el lomo de los minicerdos a una dosis de 25 µl/cm². La piel se cubrió con una cubierta adhesiva para impedir la pérdida de compuesto por contacto con la jaula o la cama. Despues de 24 h de exposición,
- 15 los lomos se lavaron suavemente con agua y jabón para eliminar el fármaco no absorbido y se secaron con golpecitos. Inmediatamente después de este lavado, se extrajo sangre por venopunción de los minicerdos. La piel externa (estrato córneo) se retiró a continuación por abrasión con esparadrapo. Tras la exposición de la epidermis, se tomó una biopsia en sacabocados de 0,5 cm. La epidermis y la dermis se separaron rápidamente, se pesaron y se congelaron instantáneamente. Se tomaron muestras similares a las 94 h y 168 h (7 días) después de la dosificación en minicerdos.
- 20 Las muestras de epidermis y dermis se homogeneizaron en agua 1:10 (en p/v) usando un homogeneizador ultrasónico Covaris. Las muestras se trajeron en 3 volúmenes de acetonitrilo y se cuantificaron contra una curva patrón a través de análisis por CL-EM. Como lo demuestran los parámetros farmacocinéticos (tabla 5), se mostró una exposición significativa del compuesto en las capas de la epidermis y la dermis, mientras que la exposición plasmática estuvo por debajo del límite de cuantificación (0,001 µg/ml), lo que indica una absorción muy limitada del compuesto hacia la circulación sistémica.
- 25

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos obtenidos para ambas formulaciones del compuesto (I)

	Formulación A	Formulación B
Plasma Cmáx (µg/ml)	<0,001	<0,001
Plasma AUCo-t (µg*h/ml)	<0,001	<0,001
Epidermis Cmáx (µg/g)	10,9	35,8
Epidermis AUCo-t (µg*h/g)	395	1320
Dermis Cmáx (µg/g)	0,47	1,52
Dermis AUCo-t (µg*h/g)	17,8	64,8

Ensayo 7: Ensayo farmacodinámico (PD) de JAK ex vivo utilizando piel humana recién extirpada

Se realizó un ensayo de farmacodinámica (PD) de JAK *ex vivo* se realizó utilizando tejido de piel humana aislado. El ensayo de PD utilizó piel humana fresca (dermatoma de 750 µm de espesor) que se montó en células de Franz estáticas con una superficie específica de aproximadamente 0,5 cm². Las cámaras receptoras de las células de Franz se llenaron con medio de cornificación tibio (37 °C) y se colocaron en una incubadora a 37 °C. La piel se dosificó por vía tópica con 10 µl (aproximadamente 18 µl/cm²) del compuesto (I) o vehículo y se dejó en reposo durante la noche (aproximadamente 24 horas). Al día siguiente, sin volver a aplicar el compuesto de prueba o el vehículo, el medio se reemplazó por un cóctel de estimulación sesgado para Th1 que consistía en TNF α , IFN γ e IL-12. La piel se dejó sin tocar durante 16 horas más y luego se recolectó y procesó para la extracción de ARN y qPCR de biomarcadores: CXCL10, CCL2. La GAPDH se utilizó como patrón interno. El compuesto (I) se formuló en una formulación de pomada al 0,5 % de concentración. La composición del vehículo de la pomada se enumera en la tabla 6. Se utilizaron un total de tres donantes de piel (analizados por cuadruplicado/muestra/tratamiento). El efecto del tratamiento se calculó como el porcentaje de aumento o disminución de la estimulación en comparación con el grupo del vehículo.

15 **Tabla 6. Composición del vehículo de la pomada**

Octilhidroxiestearato	5 %
Triglicérido C8-C10	5 %
Vaselina	79,5 %
N-Metilpirrolidona	5 %
Alcohol bencílico	5 %

Resultados del ensayo PD *ex vivo* en piel humana

20 Los datos se resumen en la tabla 7. La expresión del gen CXCL10, que codifica la proteína 10 inducida por interferón-γ (IP-10), fue inhibida por el compuesto (I) en un 90,1 % en comparación con el grupo de control de vehículo/TH1. Con respecto al gen CCL2, que codifica la proteína quimioatractante de monocitos 1 (MCP-1), el compuesto (I) inhibió la respuesta en un 61,3 %. Además, con ambas formulaciones, se detectaron altas concentraciones del compuesto tanto en las capas epidérmicas como dérmicas de la piel.

25 **Tabla 7. Efecto farmacodinámico y depósito epidérmico y dérmico de la formulación de pomada al 0,5 % del compuesto (I) después de aproximadamente 40 horas de exposición continua sobre piel humana recién extirpada**

Compuesto (I)	PD - % de inhibición PD (media ± DE)		PK - Concentración tisular (µM, media ± DE)	
	CXCL10	CCL2	Epidermis	Dermis
Pomada al 0,5 %	90,1 ± 15,1	61,3 ± 39,6	116,5 ± 91,9	6,1 ± 5,3

30 Los datos se presentan como media ± desviación estándar, n = 12 (3 donantes, 4 muestras/donante).

Ensayo 8: Ensayo de permeabilidad de la piel humana

35 El objetivo de este experimento fue evaluar la absorción percutánea de los compuestos de ensayo a través de la piel humana tras la aplicación tópica. El modelo utiliza piel humana extirpada montada en cámaras de difusión especialmente diseñadas (estáticas o de flujo continuo) que permiten que la piel se mantenga a una temperatura y humedad que coincidan con las condiciones reales de uso. La formulación se aplicó a la superficie de la piel y la penetración del fármaco se mide controlando su velocidad de aparición en la solución receptora que fluye por debajo de las muestras de piel. Este sistema *in vitro* permite un control cuidadoso de muchas de las posibles variables implicadas en la aplicación tópica, como los volúmenes de dosificación, la humedad, la temperatura, la estabilidad del fármaco y el grosor de la piel.

40 Este experimento usó un sistema de células de difusión de flujo continuo (MedFlux-HTTM) que utilizó una trayectoria de flujo cuidadosamente diseñada con pequeños volúmenes vacíos para lograr condiciones de sumidero óptimas y se ha demostrado que proporciona el aclaramiento local debajo de la piel cortada con dermátoomo para generar perfiles de flujo más precisos y detallados a través de la recolección automatizada y fluidos optimizados. Este sistema fue desarrollado para minimizar específicamente el área de dosificación durante experimentos *in vitro*, lo que permite más repeticiones de dosificación dentro de la superficie específica limitada de la piel humana *ex vivo*.

45 Las células de difusión se colocaron en soportes de calentamiento de células y se calentaron usando un baño de agua circulante para mantener la temperatura de la superficie de la piel a aproximadamente 32 °C. Las células se conectaron a bombas peristálticas multicanal y se mantuvieron a un caudal de aproximadamente 10 µl/min (600 µl/h) para un flujo continuo de líquido receptor directamente debajo de la piel. Despues de un muestreo continuo durante 24 h, las

muestras se ensayaron para determinar los niveles del compuesto de ensayo mediante LC-MS/MS. El compuesto de prueba se detectó en el fluido receptor de 20 a 28 horas después de la aplicación de la formulación de pomada de prueba ($n = 5$). La pomada usada se describe en el ensayo 7. El fluido receptor fue SBP con Brij al 0,1 %.

5 **Tabla 8. Flujo del compuesto (I) que penetra a través de 1 cm² de piel humana**

		Permeabilidad MedFlux (ng/cm ² /s)	
	N	Media	Desv. est.
Compuesto (I) (pomada al 0,5 %)	5	39,1	10,9

Como se muestra en la tabla 8, el compuesto (I) mostró una permeabilidad adecuada.

10 **Ensayo 9: Ensayo de interacción de la diana de JAK IL-31-pSTAT3 *in vivo* en ratones**

Se usó un modelo *in vivo* de producción inducida por IL-31 del transductor de señal fosforilado y del activador de la transcripción 3 (pSTAT3) en ratones para evaluar la interacción de la diana local en la piel del ratón.

15 La vía de señalización JAK/STAT ("janus kinase/signal transducer and activator of transcription", cinasa Jano/transductor de señal y activador de la transcripción) es un elemento clave en la comunicación entre las células inmunitarias y se activa principalmente a través de los receptores de citoquinas. La unión de la citocina IL-31 conduce a la activación y fosforilación de las tirosina cinasas JAK1/JAK2 que, a su vez, conduce a la fosforilación de STAT3 (pSTAT3). El STAT activado luego se traslada al núcleo y regula directamente la transcripción de genes sensibles a las citocinas. En estos estudios, a los ratones Balb/c se les dosificó una formulación de pomada del compuesto (I). El 20 vehículo de pomada (tabla 9) o el compuesto (I) formulado en el vehículo de pomada se aplicó por vía tópica a la piel afeitada (25 µl/cm²) 30 minutos antes de la inyección intradérmica (50 µl/lugar 1x1 cm²) de IL-31 (1 µg/ml) a un área afeitada de la piel de 1x1 cm² en la parte posterior entre las orejas. Una hora después de IL-31, se recogieron biopsias de piel. Las muestras de tejido se congelaron instantáneamente y se analizaron para pSTAT3 por ELISA y concentración del compuesto. El compuesto (I) inhibió la producción de pSTAT3 en un 80 % y la concentración del 25 compuesto (I) en el tejido de la piel fue de 62 µM.

25 **Tabla 9. Composición del vehículo de la pomada**

Octilhidroxiestearato	5 %
Triglicérido C8-C10	5 %
Vaselina	79,5 %
N-Metilpirrolidona	5 %
Alcohol bencílico	5 %

30 **Ensayo 10: Modelo de dermatitis aguda inducida por TPA *in vivo* en ratones**

El objetivo de este ensayo es evaluar el efecto antiinflamatorio del compuesto (I) en un modelo de dermatitis aguda en estudio para afecciones inflamatorias cutáneas como la dermatitis atópica (Dong *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2013, 344, 436-446).

35 La aplicación cutánea tópica de éster de forbol de TPA en ratones provoca una respuesta inflamatoria que se caracteriza por edema y flujo de entrada de neutrófilos en la fase temprana (2-24 h) y por la proliferación de células epidérmicas en la fase tardía (24-48 h) (Griffiths *et al.*, *Agents and Actions*, 1988, 25, 344-351). En este modelo, a ratones hembra Balb/c se les administró por vía tópica 20 µl/oreja de vehículo o TPA (2,5 µg). Para la formulación de la solución, el vehículo (DMSO:acetona 1:7) o el compuesto de prueba se aplicó por vía tópica 30 min antes y 15 min 40 después de la administración de TPA. Para la formulación de la pomada, se aplicó vehículo o compuesto (I) (concentración del 0,5 %) 30 min antes de TPA. La composición del vehículo de la pomada se enumera en la tabla 10. El grado de inflamación se evaluó como el cambio en el espesor de la oreja 6 horas después de la aplicación de TPA.

45 Los resultados se resumen en las tablas 11 y 12. Cuando se dosifica como una solución, el compuesto (I) (3-1000 µg/oreja) inhibió el aumento del grosor de la oreja inducido por TPA de una manera dependiente de la dosis. La dosis más alta probada inhibió la respuesta de TPA en un 54,8 %. Cuando se formula como una pomada al 0,5 % de concentración, el compuesto (I) inhibió la respuesta de TPA en un 34,9 %.

Tabla 10. Composición del vehículo de la pomada

Octilhidroxiestearato	5 %
Triglicérido C8-C10	5 %
Vaselina	79,5 %
N-Metilpirrolidona	5 %
Alcohol bencílico	5 %

Tabla 11. Efecto de la formulación de solución tópica del compuesto (I) sobre el aumento del grosor de la oreja inducido por TPA en ratones

Dosis del compuesto (I) ($\mu\text{g}/\text{oído}$ dosificado como solución)	Inhibición del aumento del grosor de la oreja inducido por TPA (media del % inh. \pm EEM (n))
30	6,6 % \pm 1,1 % (12)
100	2,4 % \pm 0,7 % (12)
300	35,5 % \pm 3,1 % (12)
1000	54,8 \pm 2,6 % (12)

5

Tabla 12. Efecto de la formulación de pomada de compuesto (I) tópico sobre el aumento del grosor de la oreja inducido por TPA en ratones

Dosis de compuesto (I) (20 $\mu\text{l}/\text{oreja}$)	Inhibición del aumento del grosor de la oreja inducido por TPA (media del % inh. \pm EEM (n))
Pomada al 0,5 %	34,9 % \pm 3,3 % (12)

Ensayo 11: Inhibición de pSTAT5 estimulado por IL-2 en células T Tall-1

10

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT5 estimulada por interleucina-2 (IL-2) se midió en la línea de células T humanas Tall-1 (DSMZ) utilizando AlphaLisa. Debido a que IL-2 transmite señales a través de JAK1/3, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK1/3.

15

La STAT5 fosforilada se midió mediante el kit AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT5 (Tyr694/699) (PerkinElmer).

Las células T humanas de la línea celular Tall-1 se cultivaron a 37 °C, en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % en RPMI (Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 15 % (FBS, Life Technologies), Glutamax 2 mM (Life Technologies), HEPES 25 mM (Life Technologies) y penicilina/estreptomicina IX (Life Technologies).

Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y se dispensaron acústicamente a los pocillos vacíos. Se dispensaron medios de ensayo (DMEM sin rojo fenol (Life Technologies) suplementado con FBS al 10 % (ATCC)) (4 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) y las placas se agitaron a 900 rpm durante 10 minutos. Las células se sembraron a 45 000 células/pocillo en medio de ensayo (4 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 1 hora, seguido de la adición de IL-2 (R&D Systems; concentración final 300 ng/ml) en medio de ensayo precalentado (4 μl) durante 30 minutos.

Después de la estimulación con citocinas, las células se lisaron con 6 μl de 3x tampón de lisis AlphaLisa (PerkinElmer) que contenía 1x comprimidos PhosStop y Complete (Roche). El lisado se agitó a 900 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (ta). El STAT5 fosforilado se midió mediante el kit pSTAT5 AlphaLisa (PerkinElmer). La mezcla de esferas acceptoras recién preparada se dispuso sobre el lisado (5 μl) bajo una luz verde filtrada de <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se dispensaron esferas donantes (5 μl) bajo luz filtrada verde <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se midió con excitación a 689 nm y emisión a 570 nm usando un lector de placas EnVision (PerkinElmer) bajo luz verde filtrada de <100 lux.

Para determinar la potencia inhibidora de los compuestos de ensayo en respuesta a IL-2, la intensidad de emisión promedio de las esferas unidas a pSTAT5 se midió en una línea de células T humanas. Se determinaron valores de Cl₅₀ a partir del análisis de las curvas de inhibición de la intensidad de la señal frente a la concentración de compuesto. Los datos se expresan como valores de pCl₅₀ (logaritmo decimal negativo de Cl₅₀) (media \pm desviación estándar). El compuesto (I) presentó en este ensayo un valor de pCl₅₀ de 8,4.

40

Ensayo 12: Inhibición de la fosforilación de STAT4 inducida por IL-12 en células T CD3+ humanas

Este ensayo de potencia celular para la inhibición de JAK se llevó a cabo midiendo la fosforilación de STAT4 inducida

por interleucina-12 (IL-12, R&D Systems) en células T CD3⁺ humanas. El anticuerpo CD3 (Becton Dickinson (BD) Biosciences) se conjugó con R-ficoeritrina (R-PE). El anticuerpo pSTAT4 (pTyr641, BD Biosciences) se conjugó con Alexa Fluor 647.

- 5 Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica humana a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % en medio RPMI (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Life Technologies), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies), Glutamax 2 mM (Life Technologies), anti-CD3 unido a la placa (5 µg/ml, UCHT1, BD Biosciences) y anti-CD28 soluble (1 µg/ml, CD28.2, BD Biosciences) durante 3 días. Luego, las células se resuspendieron en medio RPMI (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Life Technologies), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies), GlutaMAX 2 mM (Life Technologies) y 10 ng/ml de interleucina-2 (IL-2, R&D Systems) por 3 días más. El día del ensayo, las células se lavaron en tampón de ensayo (RPMI suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1 % (BSA, Sigma), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies) y GlutaMAX 2 mM (Life Technologies)), y se resuspendieron a $1,25 \times 10^6$ células por ml en tampón de ensayo. Las células se sembraron a razón de 250 000 células por 100 µl por pocillo en una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos profundos (Coming) y se dejaron en cultivo durante 1 hora. El medio se retiró y se reemplazó por 50 µl de tampón de ensayo que contenía dosis de respuesta de los compuestos de ensayo. Los compuestos se prepararon como soluciones madre 10 mM en DMSO. Se realizaron diluciones en serie para generar 11 concentraciones de compuesto de prueba a 1000 veces la concentración de prueba de ensayo final en DMSO al 100 %. Estas se diluyeron 25 veces y luego 20 veces en medios de ensayo para generar soluciones madre a 2X sobre la concentración de prueba de ensayo final en DMSO al 0,2 %. Las células se incubaron con compuestos de prueba a 37 °C durante 1 hora, seguido de la adición de 50 µl de tampón de ensayo precalentado que contenía IL-12 (20 ng/ml, R&D Systems). La concentración final de IL-12 es de 10 ng/ml. Después de incubar a 37 °C durante 30 minutos, las células se fijaron con 100 µl de tampón Cytofix precalentado (BD Biosciences) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 322 x g, se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con 500 µl de tampón de tinción (BSA al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS)). A continuación, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 322 x g, el sobrenadante se desechó y las células se incubaron durante 30 minutos en hielo con 500 µl de tampón Perm III preenfriado (BD Biosciences) para permeabilizar las células. A continuación, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 322 x g, se desechó el sobrenadante, se lavó con 1 ml de tampón de tinción, se centrifugó una vez más y el sedimento celular final se resuspendió en 100 µl de tampón de tinción que contenía anti-CD3 R-PE (dilución 1:10) y anti-STAT4 AlexaFluor 647 (dilución 1:50) para teñir la superficie celular y los marcadores intracelulares. Las células se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la tinción con anticuerpos, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 322 x g, se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con 500 µl de tampón de tinción. Las células se lavaron una vez más antes de transferir el contenido de los pocillos de la placa de ensayo de pocillos profundos a una placa de 96 pocillos con fondo en U de polipropileno en 200 µl de tampón de tinción para el análisis de citometría de flujo. Para el análisis de respuesta a la dosis, se representó la media de los valores de intensidad de fluorescencia frente a las concentraciones de compuestos y se determinaron los valores de IC_{50} a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el software Prism. El compuesto (I) presentó en este ensayo un valor de pIC_{50} de 7,2.

40 Ensayo 13: Inhibición de pSTAT6 estimulado por IL-13 en queratinocitos epidérmicos humanos normales

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT6 estimulada por interleucina-13 (IL-13) se midió en queratinocitos epidérmicos humanos normales (ATCC) usando AlphaLisa. El STAT6 fosforilado se midió mediante el kit AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT6 (Tyr641) (PerkinElmer).

50 Los queratinocitos epidérmicos primarios se cultivaron a 37 °C, en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % en medio basal de células dérmicas (ATCC) complementado con un kit de crecimiento de queratinocitos (ATCC) y penicilina/estreptomicina IX (Life Technologies). Las células se sembraron a razón de 20 000 células/pocillo en placas blancas de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Corning) con 50 µl y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche. El día 2 del ensayo, el medio se retiró y se reemplazó por 15 µl de medio que contenía la dosis de respuesta de los compuestos de prueba. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y después se diluyeron otras 1000 veces en medio para llevar la concentración final de DMSO al 0,1 %. Las células se incubaron con compuestos de prueba a 37 °C durante 1 h, y luego se agregó IL-13 (R&D Systems; concentración final 50 ng/ml) en medio de ensayo precalentado (5 µl) durante 30 minutos.

60 Después de la estimulación con citocinas, las células se lisaron con 5 µl de 5x tampón de lisis AlphaLisa (PerkinElmer) que contenía 1x comprimidos PhosStop y Complete (Roche). El lisado se agitó a 900 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (ta). El STAT6 fosforilado se midió mediante el kit pSTAT6 AlphaLisa (PerkinElmer). La mezcla de esferas acceptoras recién preparada se dispuso sobre el lisado (10 µl) bajo una luz verde filtrada de <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se dispensaron esferas donantes (10 µl) bajo luz filtrada verde de <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se midió con excitación a 689 nm y emisión a 570 nm usando un lector de placas EnVision (PerkinElmer) bajo luz verde filtrada de <100 lux.

Se registraron las señales de luminiscencia de AlphaScreen y se usaron para calcular los valores de porcentaje de inhibición basados en DMSO y controles. Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de porcentaje de inhibición frente a las concentraciones de compuestos y se determinaron los valores de Cl_{50} a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el software Prism. La pCl_{50} del compuesto (I) fue de 8,3 en este ensayo.

5

Ensayo 14: Inhibición de pSTAT3 estimulado por IL-22 en queratinocitos epidérmicos humanos normales

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT3 estimulada por interleucina-22 (IL-22) se midió en queratinocitos epidérmicos humanos normales (ATCC) usando AlphaLisa. El STAT3 fosforilado se midió mediante el kit AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT3 (Tyr705) (PerkinElmer).

Los queratinocitos epidérmicos primarios se cultivaron a 37 °C, en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % en medio basal de células dérmicas (ATCC) complementado con un kit de crecimiento de queratinocitos (ATCC) y penicilina/estreptomicina IX (Life Technologies). Las células se sembraron a razón de 20 000 células/pocillo en placas blancas de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Corning) con 50 µl y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche. El día 2 del ensayo, el medio se retiró y se reemplazó por 15 µl de medio que contenía dosis de respuesta de los compuestos de prueba. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y después se diluyeron otras 1000 veces en medio para llevar la concentración final de DMSO al 0,1 %. Las células se incubaron con compuestos de prueba a 37 °C durante 1 h, y luego se agregó IL-22 (R&D Systems; concentración final 50 ng/ml) en medio de ensayo precalentado (5 µl) durante 30 minutos.

Después de la estimulación con citocinas, las células se lisaron con 5 µl de 5x tampón de lisis AlphaLisa (PerkinElmer) que contenía 1x comprimidos PhosStop y Complete (Roche). El lisado se agitó a 900 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (ta). El STAT3 fosforilado se midió mediante el kit pSTAT3 AlphaLisa (PerkinElmer). La mezcla de esferas acceptoras recién preparada se dispensó sobre el lisado (10 µl) bajo una luz verde filtrada de <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se dispensaron esferas donantes (10 µl) bajo luz filtrada verde de <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se midió con excitación a 689 nm y emisión a 570 nm usando un lector de placas EnVision (PerkinElmer) bajo luz verde filtrada de <100 lux.

Se registraron las señales de luminiscencia de AlphaScreen y se usaron para calcular los valores de porcentaje de inhibición basados en DMSO y controles. Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de porcentaje de inhibición frente a las concentraciones de compuestos y se determinaron los valores de Cl_{50} a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el software Prism. La pCl_{50} del compuesto (I) fue de 8,4 en este ensayo.

35

Ensayo 15: Recuperación de filagrina suprimida por IL-22 en queratinocitos epidérmicos humanos normales

Se sabe que la IL-22 inhibe la expresión de genes de diferenciación terminal, como filagrina. El nivel de recuperación del compuesto de ensayo para la expresión de filagrina suprimida por interleucina-22 (IL-22) se midió en los queratinocitos epidérmicos humanos normales (ATCC) usando PCR en tiempo real.

Los queratinocitos epidérmicos primarios se cultivaron a 37 °C, en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % en medio basal de células dérmicas (ATCC) complementado con un kit de crecimiento de queratinocitos (ATCC) y penicilina/estreptomicina IX (Life Technologies). Las células se sembraron a razón de 5.000 células/pocillo en placas BioCoat de 96 pocillos (Corning) con 100 µl y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 3 a 4 días hasta el 100 % de confluencia. Posteriormente, el medio se retiró y se reemplazó por 150 µl de medio que contenía la dosis de respuesta de los compuestos de prueba. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y después se diluyeron otras 1000 veces en medio para llevar la concentración final de DMSO al 0,1 %. El día 1 del ensayo, las células se incubaron con compuestos de prueba a 37 °C durante 1 h, y luego se agregó IL-22 (R&D Systems; concentración final 50 ng/ml) en medio precalentado (50 µl) durante 4 días. El medio con compuestos de ensayo e IL-22 se cambió una vez el día 3. El día 5, las células se lavaron con PBS IX (Gibco) y se lisaron con 50 µl de tampón de lisis que contenía 0,5 µl de ADNase I del kit TaqMan® Gene Expression Cells-to-Ct™ (Life Technologies). Después de la incubación a temperatura ambiente (ta) durante 5 minutos, se añadieron 5 µl de solución de parada del kit y luego se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se mezclaron 11,25 µl de lisado, 12,5 µl de 2X tampón RT y 1,25 µl de 20X mezcla de enzimas RT del kit. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo incubando la mezcla a 37 °C durante 60 minutos y luego a 95 °C durante 5 minutos para generar ADNc. Para formar el cóctel de PCR, cada reacción contenía 10 µl de 2X TaqMan® Gene Expression Mater Mix, 1 µl de 2X TaqMan® Filaggrin Gene Expression Assay (Life Technologies), 1 µl de 2X TaqMan® UBC Gene Expression Assay (Life Technologies), 4 µl de agua sin nucleasas y 4 µl de ADNc. Las reacciones de PCR se realizaron en StepOnePlus™ (Life Technologies) con condiciones de ciclado de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Las señales de fluorescencia se capturaron después de cada ciclo. Se usó el método Ct comparativo para cuantificar la expresión génica con células sin IL-22 y compuestos de prueba como control de referencia.

La recuperación del compuesto (I) para la expresión de filagrina suprimida por interleucina-22 (IL-22) se observó a una concentración < 1 μ M.

5 **Ensayo 16: Ensayo de permeación de Caco-2**

El ensayo de permeación de Caco-2 se utilizó como indicación de la permeabilidad de la piel. El ensayo mide la velocidad a la que los compuestos de prueba en solución penetran en una monocapa celular (diseñada para imitar la unión estrecha de las monocapas del intestino delgado humano).

10 Las placas Transwell de 24 pocillos CacoReady se obtuvieron de ADMEcell (Alameda, CA). Los compuestos se evaluaron a una concentración de 5 μ M a partir de soluciones madre de DMSO 10 mM por duplicado ($n = 2$). La permeabilidad pasiva de los compuestos probados se evaluó utilizando monocapas de células Caco-2 junto con verapamilo (25 μ M) para inhibir las proteínas transportadoras de P-gp en la dirección apical a basolateral (A-B). El experimento se llevó a cabo en una temperatura de 37 °C, en una incubadora con CO₂ al 5 %. Los medios de cultivo de Caco-2 consistieron en DMEM filtrado convencional, FCS al 10 %, L-glutamina al 1 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. La placa de ensayo basal se preparó añadiendo 750 μ l de tampón de transporte a los pocillos A-B. Se preparó una placa CacoReady™ retirando el medio de Caco-2 de los pocillos apicales y reemplazándolo por medio de transporte nuevo (200 μ l repetidos para un total de 3 lavados). A continuación, se reemplazó el medio de blanco (200 μ l) por el compuesto diluido para los pocillos A-B. Para comenzar la incubación, se retiró la placa basal de la incubadora y se añadió sobre ella la sección apical. Se recogieron muestras (40 μ l) de los compartimentos apical y basal durante el tiempo cero (t0). Las muestras se recogieron de nuevo después de 120 minutos (t120) de los compartimentos apical y basal. Todas las muestras fueron diluidas y preparadas para bioanálisis por LC-MS/MS. El coeficiente de permeación (K_p , media de A a B + Paparente de verapamilo) en cm/s se calculó como dQ (flujo)/(dt x área x concentración).

15 25 En este ensayo, un compuesto con un valor de K_p de menos de aproximadamente 5 $\times 10^{-6}$ cm/s se considera de baja permeabilidad. Un compuesto que tiene un valor de K_p de más de aproximadamente 20 $\times 10^{-6}$ cm/s se considera que tiene alta permeabilidad.

30 **Ensayo 17: Ensayo de microsomas de hígado humano**

35 El objetivo de este ensayo fue evaluar la estabilidad metabólica de los compuestos de prueba en una subfracción de hígado humano *in vitro*. Los microsomas de hígado humano obtenidos de Bioreclamation-IVT (Baltimore, MD) se descongelaron en hielo y se diluyeron en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4, para producir concentraciones finales de proteína de incubación de 0,1 mg/ml. Los compuestos de prueba (10 mM) se diluyeron en el cofactor NADPH para producir concentraciones de incubación finales de compuesto de prueba 0,1 μ M y NADPH 1 mM. Las incubaciones se realizaron a una temperatura de 37 °C y se tomaron partes alícuotas de prueba en los momentos de 0, 5, 8, 15, 30 y 45 minutos. Cada parte alícuota se vertió en agua con ácido fórmico al 3 % y patrón interno 1 μ M. Las muestras resultantes se inyectaron en un sistema LC-MS/MS para su análisis.

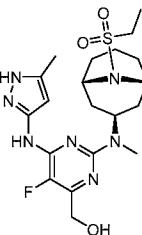
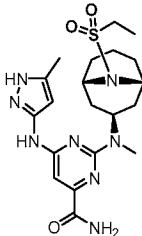
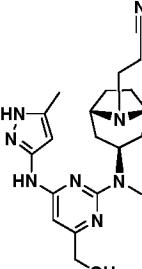
40 45 Para cada incubación, el área de los picos de los analitos en cada parte alícuota t0 se fijó en 100 % y las áreas de los picos de las alícuotas de los momentos posteriores se convirtieron en porcentaje del compuesto original restante en relación con t0. El porcentaje del compuesto original remanente se convirtió a escala logarítmica natural y se representó frente al tiempo en minutos. Se realizó un análisis de regresión lineal para la disminución inicial del perfil de desaparición del compuesto original y se determinó una fórmula para la línea de mejor ajuste. La pendiente de la línea resultante se normalizó a la concentración de proteína en mg/ml de proteína o número de células/ml y se calculó CLint de la siguiente manera para los microsomas hepáticos:

$$CL_{int} (\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{(\text{Pendiente} \times 1000)}{[\text{proteína, mg/ml}]}$$

50 55 Los valores de CLint de 0-8 μ l/min/mg representan un aclaramiento bajo (es decir, < 30 % del flujo sanguíneo hepático en humanos). Los valores de CL_{int} de 9-49 μ l/min/mg representan un aclaramiento moderado (es decir, 30-70 % del flujo sanguíneo hepático en humanos) y los valores > 50 μ l/min/mg representan un aclaramiento hepático alto (es decir, >70 % del flujo sanguíneo hepático en humanos).

Caracterización del compuesto (I) y compuestos de comparación

Tabla 13: Caracterización de compuestos de comparación

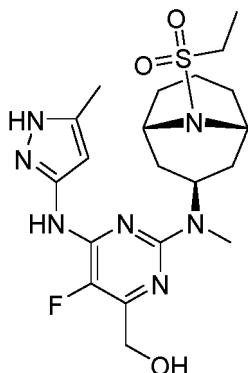
Compuesto n. ^o	Estructura	Caco _{verap} K _p 10 ⁻⁶ cm/s	HLM Cl _{int} (μl/min/mg)
(I)		42,3	136
C-1		3,55	6
C-2		5,5	12

Los compuestos comparativos C-1 y C-2 fueron divulgados por el solicitante en algunas presentaciones realizadas en abril, junio y agosto 2017 en congresos.

- 5 El compuesto (I) se caracteriza por una permeabilidad (valor de Caco_{verap}) y un aclaramiento de microsomas hepáticos humanos (HLM Cl_{int} valor) mucho mayores que C-1 y C-2. Un aclaramiento mayor es beneficioso para estimular un
10 aclaramiento sistémico rápido y prevenir la exposición sistémica que puede estar asociada con efectos secundarios. Una mayor permeabilidad es beneficiosa para las indicaciones cutáneas, ya que parece proporcionar una mejor penetración en la piel.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



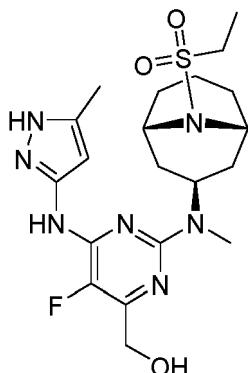
5

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. La forma libre del compuesto de la reivindicación 1.

10

3. Una forma cristalina de un compuesto de fórmula I:



(I)

15 en la que la forma cristalina **se caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores de 2θ de $11,4 \pm 0,2$, $16,2 \pm 0,2$, $16,6 \pm 0,2$, $17,7 \pm 0,2$ y $21,9 \pm 0,2$.

20 4. La forma cristalina de la reivindicación 3, en la que el patrón de difracción de rayos X de polvo además **se caracteriza porque** tiene más picos de difracción a valores de 2θ de $8,9 \pm 0,2$, $9,5 \pm 0,2$ y $10,2 \pm 0,2$.

25 5. La forma cristalina de la reivindicación 4, en la que el patrón de difracción de rayos X de polvo además **se caracteriza porque** tiene dos o más picos de difracción adicionales a valores de 2θ seleccionados de $14,4 \pm 0,2$, $19,0 \pm 0,2$, $19,2 \pm 0,2$, $19,8 \pm 0,2$, $20,1 \pm 0,2$, $20,4 \pm 0,2$, $20,6 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$, $21,3 \pm 0,2$, $25,9 \pm 0,2$, $30,1 \pm 0,2$, $30,5 \pm 0,2$, $30,9 \pm 0,2$, $32,6 \pm 0,2$ y $33,8 \pm 0,2$.

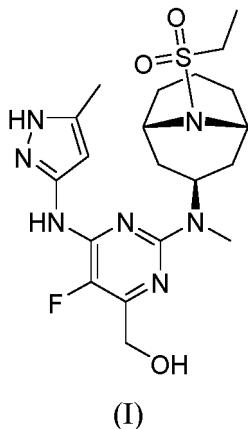
25 6. La forma cristalina de la reivindicación 3, en la que la forma cristalina **se caracteriza por** una señal de calorimetría diferencial de barrido registrada a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto que muestra un máximo en el flujo de calor endotérmico con un pico a $238,1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

30 7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

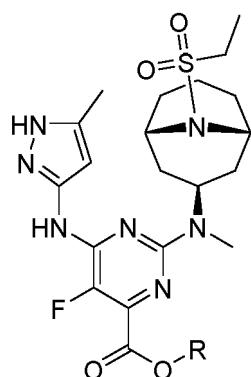
8. Una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 que comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la composición farmacéutica es una pomada o una crema.
- 5 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,1 y 10 % en peso.
- 10 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,25 y 5 % en peso.
- 10 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el compuesto (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, está presente entre 0,05 y 0,5 % en peso.
- 15 14. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria cutánea en un mamífero.
- 15 15. El compuesto de la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria cutánea en un mamífero.
- 20 16. El compuesto de la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de la dermatitis atópica.
- 20 17. El compuesto de la reivindicación 16, en el que la dermatitis atópica es una dermatitis atópica de moderada a grave.
- 25 18. El compuesto de la reivindicación 16, en el que la dermatitis atópica es una dermatitis atópica de leve a moderada.
- 25 19. El compuesto de la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de la alopecia areata.
- 30 20. El compuesto de la reivindicación 14, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria cutánea seleccionada del grupo que consiste en: vitílico, prurigo nodular, liquen plano, dermatitis de contacto, manifestaciones cutáneas de la enfermedad del injerto contra el receptor, penfigoide, lupus discoide, liquen escleroso, liquen plano pilar, psoriasis y foliculitis decalvans.
- 35 21. El compuesto de la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de la psoriasis.
- 35 22. Un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I):



- 40 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, que comprende:
- (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



en la que R es un grupo alquilo C₁₋₁₂, con un agente reductor y

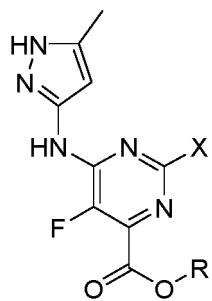
(b) opcionalmente formar una sal farmacéuticamente aceptable para proporcionar un compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5

23. El proceso de la reivindicación 22, en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en LiAlH₄, NaBH₄ y LiBH₄.

10 24. El proceso de la reivindicación 22, en el que R es etilo.

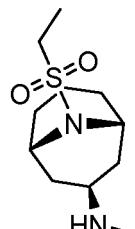
25. El proceso de la reivindicación 22, en el que el compuesto de fórmula (II) se obtiene acoplando un compuesto de fórmula (III):



(III)

15

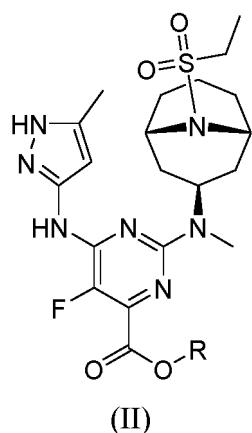
en la que X es un halógeno, con un compuesto de fórmula 1-9:



1-9

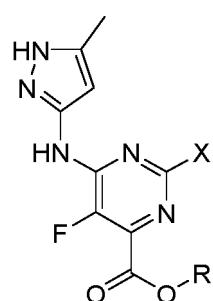
20

26. Un compuesto de fórmula (II):



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,
en la que R es un grupo alquilo C₁₋₁₂.

- 5 27. El compuesto de la reivindicación 26, en el que R es etilo.
 28. Un compuesto de fórmula (III):



- 10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que R es un grupo alquilo C₁₋₁₂ y X es halógeno.
 29. El compuesto de la reivindicación 28, en el que R es etilo y X es cloro.

15

ES 2 932 526 T3

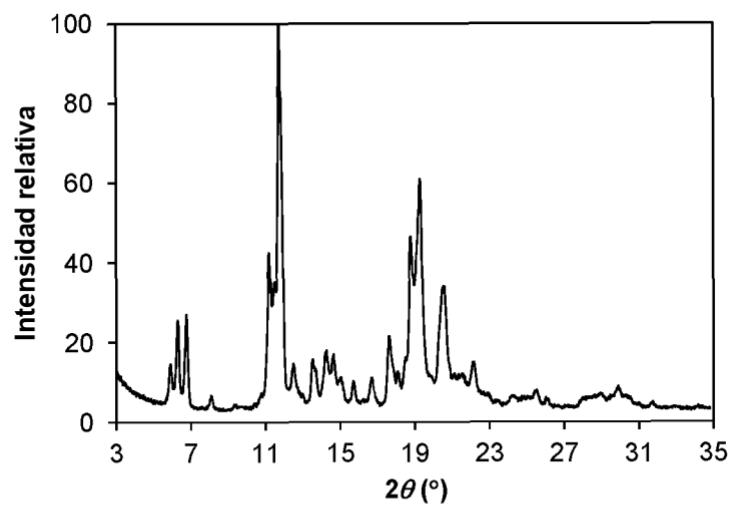


FIG. 1

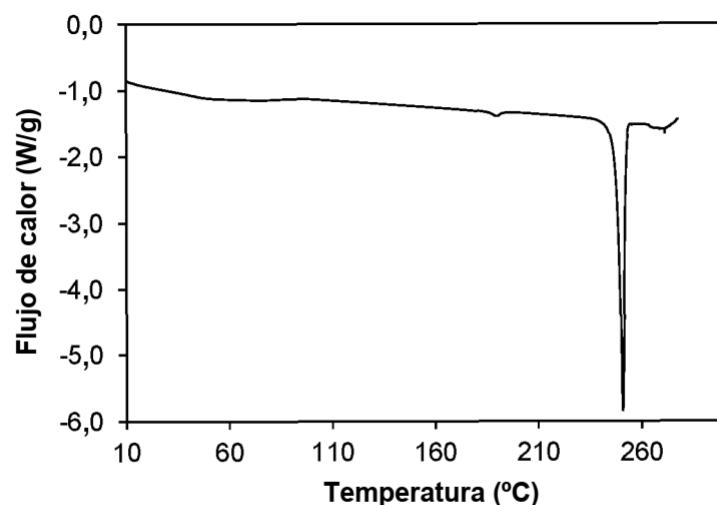


FIG. 2

ES 2 932 526 T3

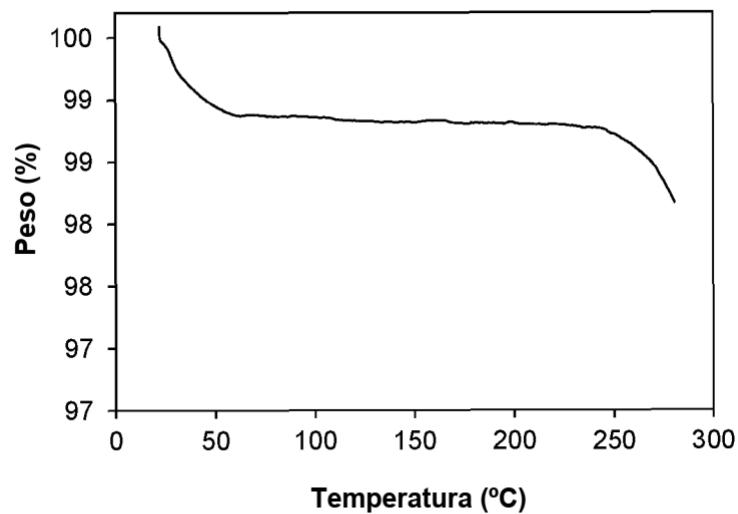


FIG. 3

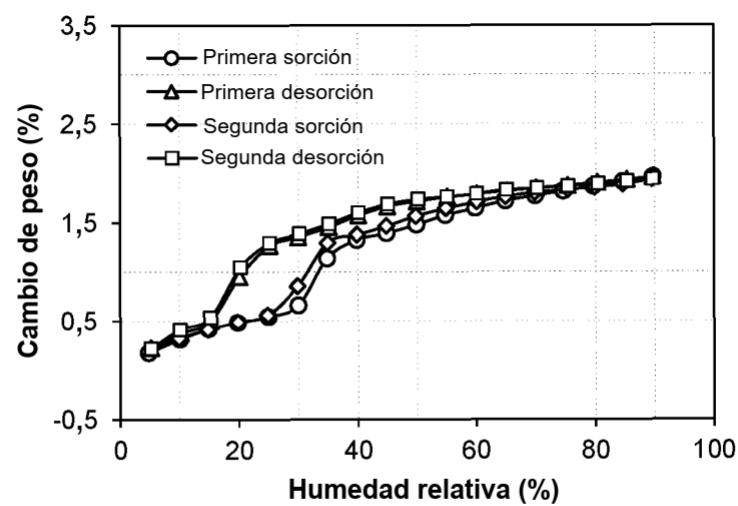


FIG. 4

ES 2 932 526 T3

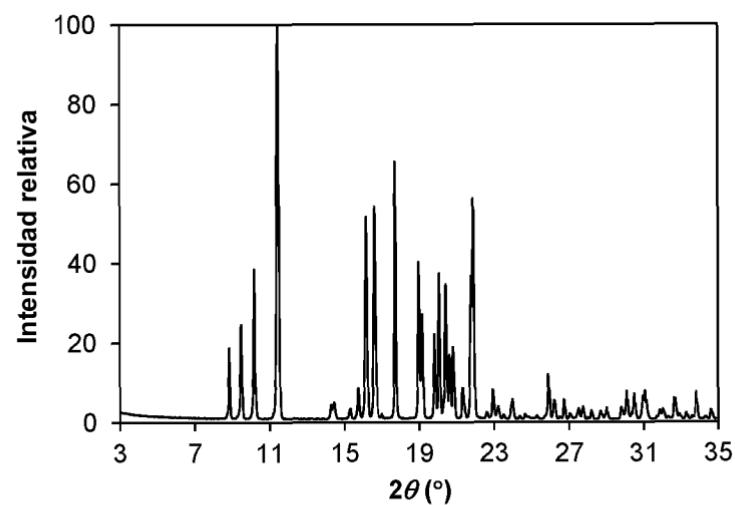


FIG. 5

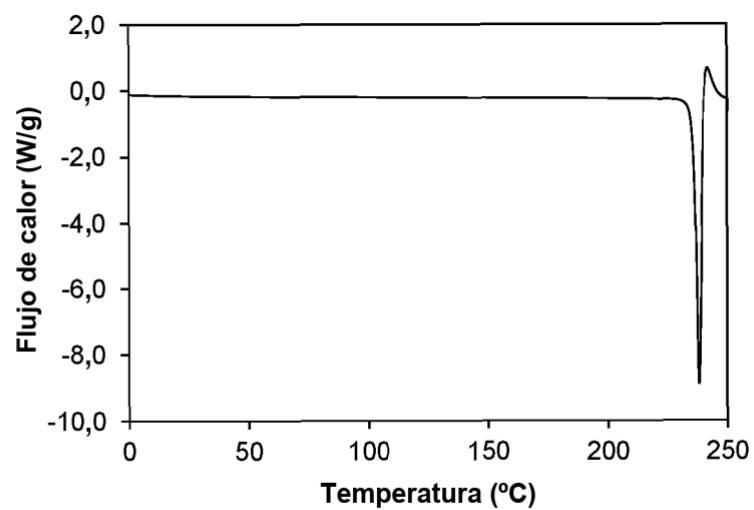


FIG. 6

ES 2 932 526 T3

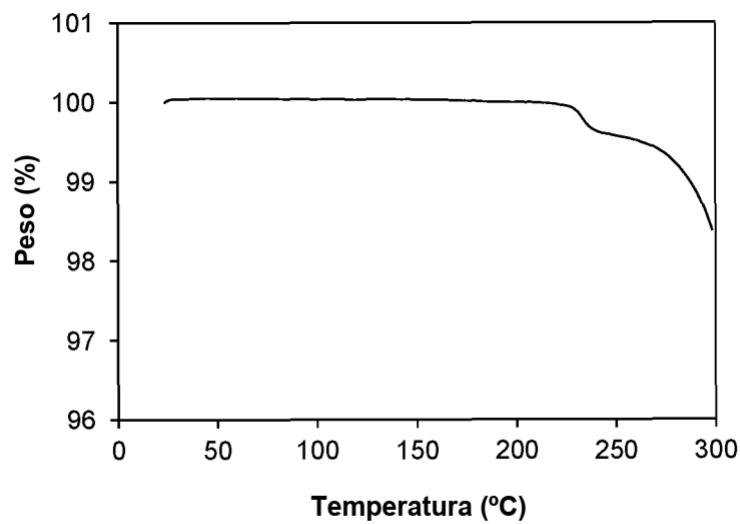


FIG. 7

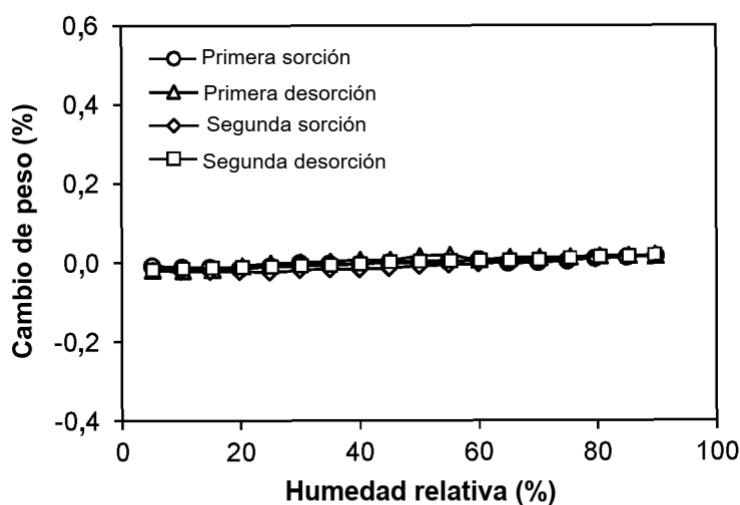


FIG. 8