

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 764**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/501 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2021 PCT/CN2021/079752**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2021 WO21180072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2021 E 21768449 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 4038063**

54 Título: **Compuestos heterocíclicos para inhibir las actividades de TYK2**

30 Prioridad:

11.03.2020 US 202062988317 P

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

10.10.2024

73 Titular/es:

BEIJING INNOCARE PHARMA TECH CO., LTD.
(100.0%)

Bldg. 8, No.8 Life Science Park Rd., Changping District

Beijing 102206, CN

72 Inventor/es:

CHEN, XIANGYANG y
PANG, YUCHENG

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 981 764 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

Compuestos heterocíclicos para inhibir las actividades de TYK2

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos heterocíclicos útiles en la modulación de TYK2 para provocar la inhibición de la transducción de señales. Los compuestos proporcionan propiedades farmacocinéticas mejoradas en animales.

10

Antecedentes de la invención

La tirosina cinasa 2 (TYK2) es una tirosina-proteína cinasa no receptora que pertenece a la familia de las cinasas Janus (JAK) y se ha demostrado que es fundamental para regular la cascada de transducción de señales aguas abajo de los receptores de la IL-12, la IL-23 y los interferones de tipo I.

15

Los dominios de cinasa en tándem son el sello distintivo de las JAK. JH1 es un dominio canónico de la proteína tirosina cinasa, mientras que JH2 se clasifica como un dominio de pseudocinasa. La estructura de la familia JAK se muestra en la Figura 1.

20

Los datos bioquímicos y estructurales recientes sugieren que el dominio de pseudocinasa de TYK2 tiene niveles bajos de actividad catalítica y regula negativamente la actividad del dominio de cinasa.

Cuando los receptores de citocinas se unen a las citocinas, se desencadena la fosforilación de TYK2 y sus otros miembros de la familia JAK1 y/o JAK2 que están unidos a las regiones intracelulares, lo que resulta en la activación de los factores de activación transcripcional y transducción de señales (STAT) por dimerización. Los STAT dimerizados luego migran dentro del núcleo y regulan la expresión y la transcripción de los genes relacionados para completar la transducción de señales de la membrana celular al núcleo. Por tanto, las JAK transducen las señales mediadas por citocinas a través de la vía JAK-STAT y desempeñan un papel importante en muchas funciones celulares, la regulación dependiente de las citocinas de la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la respuesta inmunitaria, etc. Los ratones deficientes en TYK2 son resistentes a los modelos experimentales de colitis, psoriasis y esclerosis múltiple, lo que demuestra la importancia de la señalización mediada por TYK2 en la autoinmunidad y los trastornos relacionados.

25

30

En los seres humanos, las personas que expresan una variante inactiva de TYK2 están protegidas de la esclerosis múltiple y posiblemente de otros trastornos autoinmunitarios. Los estudios de asociación de todo el genoma han demostrado que otras variantes de TYK2 están asociadas con trastornos autoinmunitarios tales como la enfermedad de Crohn, la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide, lo que demuestra aún más la importancia de TYK2 en la autoinmunidad.

35

40

Los ratones con inactivación de TYK2 tienen un recuento normal de glóbulos rojos y pueden sobrevivir. La falta de expresión de TYK2 se manifiesta en la señalización debilitada de diversas citocinas proinflamatorias y en el grave desequilibrio de la diferenciación de las células T colaboradoras. La evidencia de estudios relacionados con la genética respalda que el TYK2 es un gen de enfermedad autoinmunitaria susceptible compartido. Las rutas reguladas por TYK2 se han confirmado mediante la terapia con anticuerpos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, el ustekinumab dirigido a la IL-12/IL-23 para tratar la psoriasis y el anifrolumab dirigido al receptor de interferón de tipo I para tratar el lupus eritematoso sistémico (LES) han demostrado una eficacia significativa en los ensayos clínicos.

45

La TYK2 se asocia con algunos tipos de cáncer por la correlación entre la supervivencia anómala de las células de la leucemia linfocítica aguda (LLA-T) y la activación de la TYK2. Como oncogén de la LLA-T, el 88 % de las líneas celulares de la LLA-T y el 63 % de las células de la LLA-T derivadas de pacientes dependían de la TYK2 mediante experimentos de desactivación genética (Sanda y col., Cancer Disc. 2013, 3, 564-77). El inhibidor selectivo de TYK2, NDI-031301, indujo la apoptosis para inhibir el crecimiento de líneas celulares de la LLA-T humana y mostró una buena seguridad y eficacia en un modelo murino con células tumorales de la LLA-T KOPT-K1 (Akahane y col, British J. Haematol. 2017, 177, 271-82), lo que demuestra la posibilidad de inhibidores selectivos de la TYK2 para tratar la LLA-T. Por tanto, TYK2 es una de las principales dianas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y cáncer (Alicea-Velazquez y col., Curr. Drug Targets 2011, 12, 546-55).

50

55

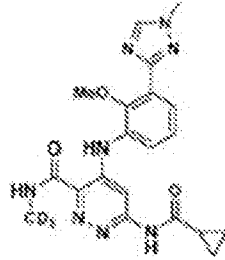
TYK2 y otros miembros de la familia JAK tienen estructuralmente un dominio cinasa JH1 (homología JAK 1) y un dominio pseudocinasa adyacente JH2 (homología JAK 2). JH2 puede unirse al ATP, pero no tiene una función catalítica y, en cambio, regula negativamente la actividad cinasa del JH1 (Staerk y col., J. Biol. Chem. 2015, 280, 41893-99). Debido a la gran similitud de secuencia del dominio cinasa JH1 entre la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2), es un reto desarrollar un inhibidor selectivo hacia JH1 de TYK2 sin inhibir JH1 de JAK1, JAK2 o JAK3. La mayoría de los inhibidores de JAK que se unen al dominio cinasa de JAK, incluidos el tofacitinib, el ruxolitinib, el baricitinib, el upadacitinib, etc., no son muy selectivos entre los miembros de la familia JAK y presentan efectos secundarios dependientes de la dosis clínicamente, tales como la anemia. El desarrollo de inhibidores de TYK2

60

65

altamente selectivos sigue siendo atractivo para las compañías farmacéuticas. Basándose en las diferencias estructurales entre las bolsas de unión al ATP en JH1 y JH2 de TYK2, Bristol-Myers Squibb Company ha desarrollado un aglutinante de JH2 altamente selectivo, el BMS-986165, que sólo inhibe las funciones fisiológicas mediadas por TYK2 sin unirse a los dominios de cinasa (JH1) de las JAK. BMS-986165 se encuentra ahora en los ensayos clínicos de fase III para enfermedades autoinmunitarias (Wroblewski y col., J. Med. Chem. 2019, 62, 8973-95).

La estructura de BMS-986165 se muestra a continuación (documento WO2014/074661):



Sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que se unan selectivamente al dominio de pseudocinasa (JH2) de TYK2, con una unión mínima a los dominios de cinasa de las familias JAK, en particular a JAK2.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura secundaria común de la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2).

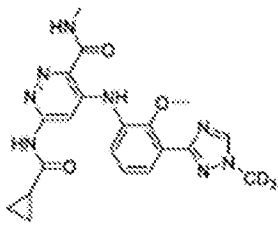
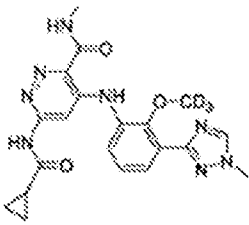
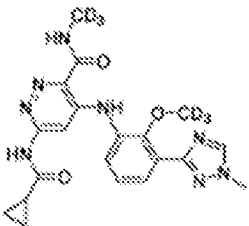
La Figura 2 muestra las eficacias in vivo en un modelo animal de colitis IBD inducida por anticuerpos anti-CD40. Los cambios porcentuales relativos del peso corporal de los animales tratados con el vehículo, un compuesto de referencia y el compuesto 3 en tres dosis diferentes se representan gráficamente frente al número de días después del tratamiento.

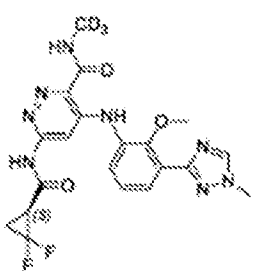
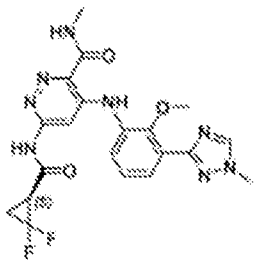
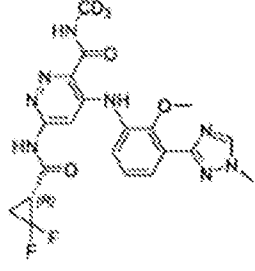
Descripción detallada de la invención

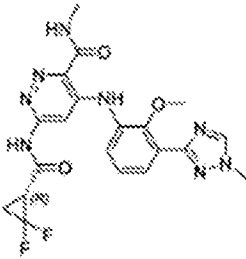
Cualquier referencia a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Los inventores han descubierto inhibidores selectivos de TYK2 que no se dirigen al sitio catalíticamente activo de TYK2, sino que se dirigen al dominio de la pseudocinasa TYK2 (JH2). La presente invención se refiere a los compuestos 2, 3 o 4 y a sus sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos 2, 3 o 4 son aglutinantes selectivos de JH2 de TYK2. Al unirse al dominio de pseudocinasa (JH2), los compuestos 2, 3 o 4 inhiben la actividad catalítica de la cinasa de TYK2, inhiben la fosforilación de las proteínas y muestran efectos inhibidores significativos sobre la función fisiológica de TYK2. Los compuestos 2, 3 o 4 se unen débilmente o no se unen al dominio cinasa (JH1) de TYK2. Los compuestos 2, 3 o 4 inhiben selectivamente la actividad cinasa de TYK2 al unirse a JH2 y tienen una baja actividad inhibitora hacia la actividad cinasa de otros miembros de la familia JAK. La selectividad de los compuestos 2, 3 o 4 para inhibir la TYK2 frente a otros miembros de la familia JAK (JAK1, JAK2 y JAK3) minimiza los efectos secundarios tales como la anemia. Se ha demostrado que los compuestos 2, 3 o 4 tienen excelentes propiedades farmacocinéticas in vivo en animales.

Compuesto n.º	Estructura y nombre
1 (no según la invención)	

	<p>6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d_3)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-<i>N</i>-(metil-d_3)piridazina-3-carboxamida</p>
2	
	<p>6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d_3)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-<i>N</i>-metilpiridazina-3-carboxamida</p>
3	
	<p>6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-d_3)-3-(1-(metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-<i>N</i>-metilpiridazina-3-carboxamida</p>
4	
	<p>6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-d_3)-3-(1-(metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-<i>N</i>-(metil-d_3)piridazina-3-carboxamida</p>

<p>5 (no según la invención)</p>	 <p>(S)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-, 1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil-<i>d</i>₃)piridazina-3-carboxamida</p>
<p>6 (no según la invención)</p>	 <p>(S)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-, 1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-metilpiridazina-3-carboxamida</p>
<p>7 (no según la invención)</p>	 <p>(R)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-, 1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil-<i>d</i>₃)piridazina-3-carboxamida</p>
<p>8 (no según la invención)</p>	

	
	<p>(<i>R</i>)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1<i>H</i>-, 1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-<i>N</i>-metilpiridazina-3-carboxamida</p>

"Sales farmacéuticamente aceptables", tal como se usa en la presente memoria, son sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos no deseados. Las formas de sal farmacéuticamente aceptables incluyen diversos polimorfos cristalinos así como la forma amorfa de las diferentes sales. Las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes compuestos heterocíclicos básicos se pueden formar con ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos.

El compuesto 1 tiene metilo trideuterado en el anillo de triazol y metilamida trideuterada.

El compuesto 2 tiene metilo trideuterado en el anillo de triazol.

El compuesto 3 tiene metoxilo trideuterado en el anillo de benceno.

El compuesto 4 tiene metoxilo trideuterado en el anillo de benceno y metil amida trideuterada.

El compuesto 5 tiene (*S*)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido) y metil amida trideuterada.

El compuesto 6 tiene (*S*)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido) sin ninguna sustitución de deuterio.

El compuesto 7 tiene (*R*)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido) y metil amida trideuterada.

El compuesto 8 tiene (*R*)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido) sin ninguna sustitución de deuterio.

Los compuestos 1-5 y 7 tienen varias sustituciones de deuterio en el metilo para mejorar las propiedades farmacocinéticas (PK). Los compuestos 5-8 tienen difluoro sobre ciclopropano. Los compuestos de la presente invención tienen bajas actividades de unión a los dominios de cinasa de JAK y tienen altas actividades inhibitoras contra las funciones celulares de TYK2, tales como la inhibición de la secreción de interferón gamma e IL-23. Los compuestos de la presente invención proporcionan una buena biodisponibilidad cuando se administran por vía oral. Los compuestos de la presente invención son seguros de usar y son eficaces en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), como se demostró en un modelo de colitis anti-CD40 (EII) en ratones, que no mostró una pérdida de peso corporal significativa después del tratamiento con los compuestos 2 y 3.

Composiciones farmacéuticas (no según la invención)

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y un compuesto activo de los compuestos 1-8, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. El compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable en las composiciones farmacéuticas en general está en una cantidad de aproximadamente el 0,01-20 %, o el 0,05-20 %, o el 0,1-20 %, o el 0,2-15 %, o el 0,5-10 %, o el 1-5 % (p/p) para una formulación tópica; aproximadamente del 0,1-5 % para una formulación inyectable, del 0,1-5 % para una formulación en parche, aproximadamente del 1-90 % para una formulación en comprimidos y del 1-100 % para una formulación en cápsulas.

En una realización, el compuesto activo se incorpora a cualquier portador aceptable, incluyendo cremas, geles, lociones u otros tipos de suspensiones que pueden estabilizar el compuesto activo y administrarlo a la zona afectada mediante aplicaciones tópicas. En otra realización, la composición farmacéutica puede estar en una forma de dosificación tal como comprimidos, cápsulas, gránulos, gránulos finos, polvos, jarabes, supositorios, disoluciones inyectables, parches o similares. La composición farmacéutica anterior se puede preparar por métodos convencionales.

Los portadores farmacéuticamente aceptables, que son componentes inactivos, pueden seleccionarse por los expertos en la técnica usando criterios convencionales. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, disoluciones micelares, geles y pomadas no acuosos. Los portadores farmacéuticamente aceptables también pueden contener componentes que incluyen, pero no se limitan a, solución salina y disoluciones de electrolitos acuosos; agentes osmóticos iónicos y no iónicos tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol y dextrosa; agentes de ajuste del pH y tampones tales como sales de hidróxido, fosfato, citrato, acetato, borato; y trolamina; antioxidantes tales como sales, ácidos y/o bases de bisulfito, sulfito, metabisulfito, tiosulfito, ácido ascórbico, acetilcisteína, cisteína, glutatión, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, tocoferoles y palmitato de ascorbilo; tensioactivos tales como lecitina, fosfolípidos, que incluyen pero no se limitan a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol; poloxámeros y poloxaminas, polisorbatos tales como polisorbato 80, polisorbato 60 y polisorbato 20, poliéteres tales como polietilenglicoles y polipropilenglicoliglicoles; polivinilos tales como poli(alcohol vinílico) y povidona; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa y sus sales; derivados del petróleo tales como aceite mineral y vaselina blanca; grasas tales como lanolina, aceite de cacahuete, aceite de palma, aceite de soja; mono-, di- y triglicéridos; polímeros de ácido acrílico tales como gel de carboximetilpolimetileno, y copolímero de acrilato reticulado modificado hidrófobamente; polisacáridos tales como dextranos y glucosaminoglicanos tales como hialuronato de sodio. Tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden conservarse contra la contaminación bacteriana usando conservantes bien conocidos, estos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, ácido etilendiaminotetraacético y sus sales, cloruro de bencetonio, clorhexidina, clorobutanol, metilparabeno, timerosal y alcohol fenilético, o pueden formularse como una formulación no conservada para un uso individual o múltiple.

Por ejemplo, una formulación en comprimido o una formulación en cápsula del compuesto activo puede contener otros excipientes que no tienen bioactividad ni reacción con el compuesto activo. Los excipientes de un comprimido o una cápsula pueden incluir cargas, aglutinantes, lubricantes y deslizantes, desintegrantes, agentes humectantes y modificadores de la velocidad de liberación. Los aglutinantes promueven la adhesión de partículas de la formulación y son importantes para una formulación de comprimido. Los ejemplos de excipientes de un comprimido o una cápsula incluyen, pero no se limitan a, carboximetilcelulosa, celulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, goma karaya, almidón, goma tragacanto, gelatina, estearato de magnesio, dióxido de titanio, poli(ácido acrílico) y polivinilpirrolidona. Por ejemplo, una formulación de comprimido puede contener ingredientes inactivos tales como dióxido de silicio coloidal, crospovidona, hipromelosa, estearato de magnesio, celulosa microcristalina, polietilenglicol, almidón glicolato de sodio y/o dióxido de titanio. Una formulación en cápsula puede contener ingredientes inactivos tales como gelatina, estearato de magnesio y/o dióxido de titanio.

Por ejemplo, una formulación de parche del compuesto activo puede comprender algunos ingredientes inactivos tales como 1,3-butilenglicol, aminoacetato de dihidroxialuminio, edetato de disodio, D-sorbitol, gelatina, caolín, metilparabeno, polisorbato 80, povidona, propilenglicol, propilparabeno, carboximetilcelulosa de sodio, poli(acrilato de sodio), ácido tartárico, dióxido de titanio y agua purificada. Una formulación de parche también puede contener un potenciador de la permeabilidad de la piel, tal como ésteres de lactato (por ejemplo, lactato de laurilo) o monoetil éter de dietilenglicol.

Las formulaciones tópicas que incluyen el compuesto activo pueden estar en forma de gel, crema, loción, líquido, emulsión, pomada, pulverización, solución y suspensión. Los ingredientes inactivos en las formulaciones tópicas, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, monoetil éter de dietilenglicol (emoliente/potenciador de la permeación), DMSO (potenciador de la solubilidad), elastómero de silicona (modificador de reología/textura), triglicérido caprílico/cáprico (emoliente), octisalato (emoliente/filtro UV), líquido de silicona (emoliente/diluyente), escualeno (emoliente), aceite de girasol (emoliente) y dióxido de silicona (agente espesante).

Método de uso (no según la invención)

El inventor ha demostrado que los presentes compuestos se unen específicamente al dominio de pseudocinasa (JH2) de TYK2 e inhiben significativamente la función fisiológica de TYK2 en las células NK92. Los compuestos también muestran excelentes propiedades farmacocinéticas en ratas.

La presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar enfermedades mediadas por la TYK2, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias (que incluyen inflamación intestinal e inflamación del intestino), cánceres, enfermedades de la piel, diabetes, enfermedades oculares, enfermedades neurodegenerativas, reacciones alérgicas, asma, otras enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y el rechazo de trasplantes, etc. El método es particularmente útil para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis y el lupus eritematoso sistémico (LES). El método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, o un profármaco del mismo, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. "Una cantidad eficaz", como se usa en la presente memoria, es la cantidad eficaz para tratar una enfermedad mediante la mejora de la afección patológica o la reducción de los síntomas de la enfermedad.

La composición farmacéutica de la presente invención puede aplicarse mediante administración local o administración sistémica. La administración local incluye administración tópica. La administración sistémica incluye la administración

oral (incluyendo bucal o sublingual), parenteral (tal como intravenosa, intramuscular, subcutánea o rectal) y otras vías sistémicas de administración. En la administración sistémica, el compuesto activo primero alcanza el plasma y luego se distribuye en los tejidos diana. La administración tópica y la administración oral son las vías de administración preferidas para la presente invención.

La dosificación de la composición puede variar en función del grado de lesión y de la respuesta individual de cada paciente. Para la administración sistémica, las concentraciones plasmáticas del compuesto activo administradas pueden variar, pero generalmente son 1×10^{-10} - 1×10^{-4} moles/litro, y preferiblemente 1×10^{-8} -1 pero generalmente son 1×10^{-10} - 14×10^{-4} moles/litro, y preferiblemente 1×10^{-8} - 14×10^{-5} moles/litro 10^{-5} moles/litro.

En una realización, la composición se aplica tópicamente sobre la zona afectada y se frota sobre ella. La composición se aplica tópicamente al menos 1 o 2 veces al día, o 3 a 4 veces al día, dependiendo del problema médico y siendo la patología de la enfermedad crónica o aguda. En general, la composición tópica comprende aproximadamente 0,01-20 %, o 0,05-20 %, o 0,1-20 %, o 0,2-15 %, 0,5-10 % o 1-5 % (p/p) del compuesto activo. El compuesto activo pasa a través de la piel y se administra al sitio de la molestia.

En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía oral al sujeto. La dosificación para la administración oral es generalmente de al menos 0,1 mg/kg/día y de menos de 1000 mg/kg/día. Por ejemplo, la dosificación para administración oral es de 0,5 mg a 1 g, preferiblemente de 1 mg a 700 mg, o de 5 mg a 300 mg de un compuesto por día.

Los expertos en la técnica reconocerán que una amplia variedad de mecanismos de administración también son adecuados para la presente invención.

La presente invención es útil en el tratamiento de un sujeto mamífero, tal como seres humanos, caballos y perros. La presente invención es particularmente útil en el tratamiento de seres humanos.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplos

Los ejemplos 1-8 ilustran la síntesis de los presentes compuestos. El producto en cada etapa de la reacción se obtiene mediante técnicas de separación conocidas en la materia que incluyen, pero no se limitan a, extracción, filtración, destilación, cristalización y separación cromatográfica. Los materiales de partida y los reactivos químicos necesarios para la síntesis pueden sintetizarse convencionalmente según la bibliografía (disponible de SciFinder) o comprarse.

La estructura de un compuesto se determina mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas (EM). La RMN se midió usando un espectrómetro de RMN Bruker ASCEND-400. Los disolventes fueron dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), cloroformo deuterado (CDCl $_3$) o metanol deuterado (CD $_3$ OD). El patrón interno era tetrametilsilano (TMS). El desplazamiento químico se proporciona en unidades de 10^{-6} (ppm).

La EM se midió usando un espectrómetro de masas Agilent SQD (ESI) (fabricante: Agilent, modelo: 6120).

La HPLC se midió usando una cromatografía de líquidos de alta presión Agilent 1260 DAD (Poroshell120 EC-C18, 50 × 3,0 mm, columna de 2,7 μ m) o cromatografía de líquidos de alta presión Waters Arc (Sunfire C18, 150 × 4,6 mm, columna de 5 μ m).

La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó usando una placa de gel de sílice Qingdao Ocean GF254. La especificación de la CCF para la monitorización de reacciones y la separación/purificación de la producción es de 0,15 ~ 0,2 mm y 0,4 ~ 0,5 mm de grosor, respectivamente.

La cromatografía en columna se llevó a cabo generalmente usando gel de sílice Qingdao Ocean 200-(300 de malla) como soporte.

Los materiales de partida conocidos usados en la presente invención pueden sintetizarse según los métodos conocidos en la técnica, o pueden adquirirse de ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Sigma-Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Beijing Ouhe Chemicals y otras empresas.

En los ejemplos siguientes, a menos que se especifique lo contrario, todas las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de argón o una atmósfera de nitrógeno.

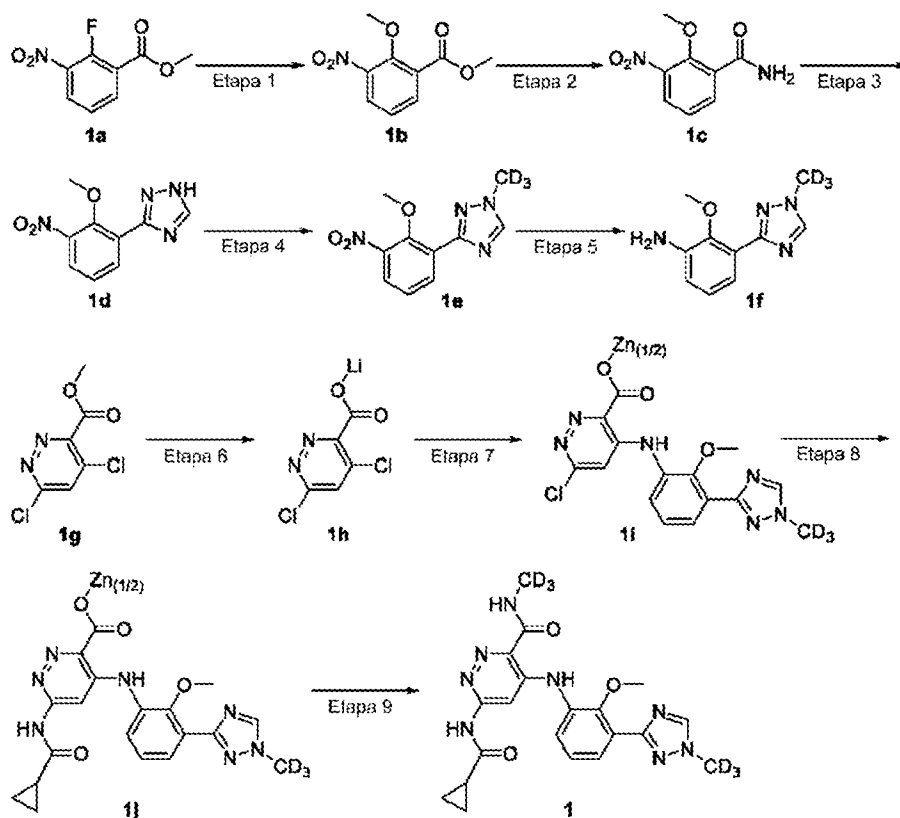
La reacción de hidrogenación se llevó a cabo normalmente en un reactor que se evacuó, se cargó con hidrógeno y se hizo funcionar repetidamente tres veces.

La reacción de microondas se llevó a cabo usando un reactor de microondas CEM Discover-SP.

En los ejemplos siguientes, a menos que se especifique lo contrario, la temperatura de reacción fue la temperatura ambiente de desde 20 °C hasta 30 °C.

- 5 El progreso de la reacción se monitorizó mediante un instrumento Agilent LCMS (1260/6120). También puede monitorizarse mediante CCF. El sistema disolvente para la CCF era A: un sistema de diclorometano y metanol; B: un sistema de éter de petróleo y acetato de etilo; C: un sistema mostrado en los ejemplos. La razón en volumen de los disolventes se ajustó según la polaridad del compuesto.
- 10 El sistema eluyente para la cromatografía en columna y la CCF usado en el proceso de purificación del compuesto incluía A: un sistema de diclorometano y metanol; B: un sistema de éter de petróleo y acetato de etilo; C: un sistema mostrado en los ejemplos. La razón en volumen de los disolventes se ajustó según la polaridad del compuesto, y se pudo añadir una pequeña cantidad de trietilamina y un reactivo ácido o básico para el ajuste.
- 15 La purificación del compuesto también podría llevarse a cabo usando un sistema de preparación automatizado orientado a la espectrometría de masas de Waters (HPLC preparatoria con un detector de masas de SQD2). Dependiendo de la polaridad del compuesto, se usó un perfil de elución apropiado de acetonitrilo/agua (que contenía ácido trifluoroacético o ácido fórmico al 0,1 %) o acetonitrilo/agua (que contenía hidróxido de amonio al 0,05 %) para lavar una columna de alta presión de fase inversa (XBridge-C18, 19 x 150 mm, 5 µm) a una velocidad de flujo de 20 ml/min.
- 20

Ejemplo 1 (no según la invención). 6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d3)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil-d3)piridazina-3-carboxamida (1)



25

Etapa 1

2-metoxi-3-nitrobenzoato de metilo (1b)

30

A una solución de 2-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo **1a** (10 g, 50 mmol) en metanol (50 ml) a temperatura ambiente se añadió metóxido de sodio (12,6 g, 70 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, la solución se diluyó con agua (200 ml) y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 60 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (2 x 100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró hasta sequedad a presión reducida para obtener el compuesto objetivo **1b** (10 g, sólido) con un rendimiento del 98 %.

35

EM m/z (ESI): 212 [M+1]

Etapa 2

5

2-metoxi-3-nitrobenzamida (**1c**)

10 A una solución de 2-metoxi-3-nitrobenzoato de metilo **1b** (10 g, 47 mmol) en metanol (40 ml) a temperatura ambiente se añadió hidróxido de amonio (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 48 horas, el disolvente se retiró a presión reducida para obtener el compuesto objetivo **1c** (bruto, 10 g, sólido). El producto bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

EM m/z (ESI): 197 [M+1]

15 Etapa 3

3-(2-metoxi-3-nitrofenil)-1H-1,2,4-triazol (**1d**)

20 Una solución de 2-metoxi-3-nitrobenzamida **1c** (10 g, 51 mmol) en dimetilacetato de *N,N*-dimetilformamida (50 ml) se calentó hasta 95 °C y se agitó durante 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en etanol (30 ml) para obtener la solución A. Se añadió lentamente hidrato de hidrazina (25 ml) a una mezcla de ácido acético (35 ml) y etanol (150 ml) a 0 °C, seguido de la adición de la solución A. Después de calentar gradualmente a temperatura ambiente y agitar durante 12 horas, el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se dispersó en agua (400 ml) y se filtró. El sólido obtenido se lavó con agua y se secó para dar el compuesto objetivo **1d** (6 g, sólido) con un rendimiento del 55 %.

25

EM m/z (ESI): 221 [M+1]

Etapa 4

30

3-(2-metoxi-3-nitrofenil)-1-(metil-d3)-1H-1,2,4-triazol (**1e**)

35 A una mezcla de 3-(2-metoxi-3-nitrofenil)-1-(metil-d3)-1H-1,2,4-triazol **1d** (1,2 g, 5,3 mmol), carbonato de potasio (2,2 g, 16 mmol) y *N,N*-dimetilformamida (10 ml) se añadió yodometano deuterado (1 g, 6,9 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, la solución resultante se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para obtener el compuesto objetivo **1e** (530 mg, sólido) con un rendimiento del 42 %.

35

EM m/z (ESI): 238 [M+1]

40 Etapa 5

2-metoxi-3-(1-(metil-d3)-1H-1,2,4-triazol-3-il)anilina (**1f**)

45 A una solución de 3-(2-metoxi-3-nitrofenil)-1-(metil-d3)-1H-1,2,4-triazol **1e** (530 mg, 1,61 mmol) en metanol (10 ml) se le añadió paladio al 10 % sobre carbono (50 mg). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 12 horas y después se filtró. El filtrado se concentró hasta sequedad a presión reducida para obtener el producto objetivo **1f** (430 mg, sólido). El producto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

45

EM m/z (ESI): 208 [M+1]

50

Etapa 6

4,6-dicloropiridazin-3-carboxilato de litio (**1h**)

55 A una mezcla de 4,6-dicloropiridazin-3-carboxilato de metilo **1g** (5 g, 24,15 mmol), diisopropiletilamina (9,4 g, 72,5 mmol), acetonitrilo (13,5 ml) y agua (3,25 ml) se le añadió bromuro de litio (6,3 g, 72,5 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y se filtró. El sólido resultante se lavó con acetonitrilo (8 ml) y se secó al vacío para dar el compuesto objetivo **1h** (4,53 g, sólido) con un rendimiento del 90 %.

55

60 EM m/z (ESI): 193 [M+1]

Etapa 7

65 6-cloro-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d3)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazina-3-carboxilato de zinc (**1i**)

65

ES 2 981 764 T3

A una mezcla de 4,6-dicloropiridazin-3-carboxilato de litio **1h** (380 mg, 1,9 mmol), 2-metoxi-3-(1-(metil-d₃)-1H-1,2,4-triazol-3-il)anilina **1f** (471 mg, 2,27 mmol), isopropanol (0,5 ml) y agua (5 ml) se le añadió acetato de zinc (350 mg, 1,9 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó hasta 65 °C y se agitó durante 12 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con agua (30 ml), se agitó durante 30 minutos y se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 30 ml) y tetrahidrofurano (2 x 30 ml) y se secó al vacío para dar el compuesto objetivo **1i** (490 mg, sólido) con un rendimiento del 71 %.

EM m/z (ESI): 364 [M+1]

10 Etapa 8

6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d₃)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de metilo (**1j**)

15 A una mezcla de 6-cloro-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d₃)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de zinc **1i** (490 mg, 1,15 mmol), ciclopropanocarboxamida (300 mg, 3,45 mmol), (2R)-1-[(1R)-1-[bis(1,1-dimetiletil)fosfino]etil]-2-(diciclohexilfosfino)ferroceno (63 mg, 0,115 mmol), acetato de paladio (25 mg, 0,0575 mmol), tolueno (9 ml) y acetonitrilo (5 ml) se añadieron carbonato de potasio (320 mg, 7,8 mmol) y 1,8-diazabicycloundec-7-eno (180 mg, 1,5 mmol) secuencialmente. La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 72 horas bajo nitrógeno. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para dar el compuesto objetivo **1j** (560 mg, sólido) con un rendimiento del 99 %.

EM m/z (ESI): 413 [M+1]

25 Etapa 9

6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d₃)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil-d₃) piridazin-3-carboxamida (**1**)

30 Una mezcla de 6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d₃)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de metilo **1j** (280 mg, 0,68 mmol), clorhidrato de metilamina deuterada (60 mg, 0,81 mmol), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (181 mg, 0,95 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (53 mg, 0,34 mmol), acetonitrilo (3 ml), N-metilpirrolidona y N-metilimidazol (41 mg, 0,5 mmol) se calentó a 65 °C y se agitó durante 1 hora. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para dar el compuesto objetivo **1** (44 mg, sólido) con un rendimiento del 15 %.

EM m/z (ESI): 429 [M+1]

40 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,32 (s, 1H), 10,97 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,65 (dd, J = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,54 - 7,46 (m, 1H), 7,32 - 7,22 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,12 - 2,03 (m, 1H), 0,88 - 0,73 (m, 4H).

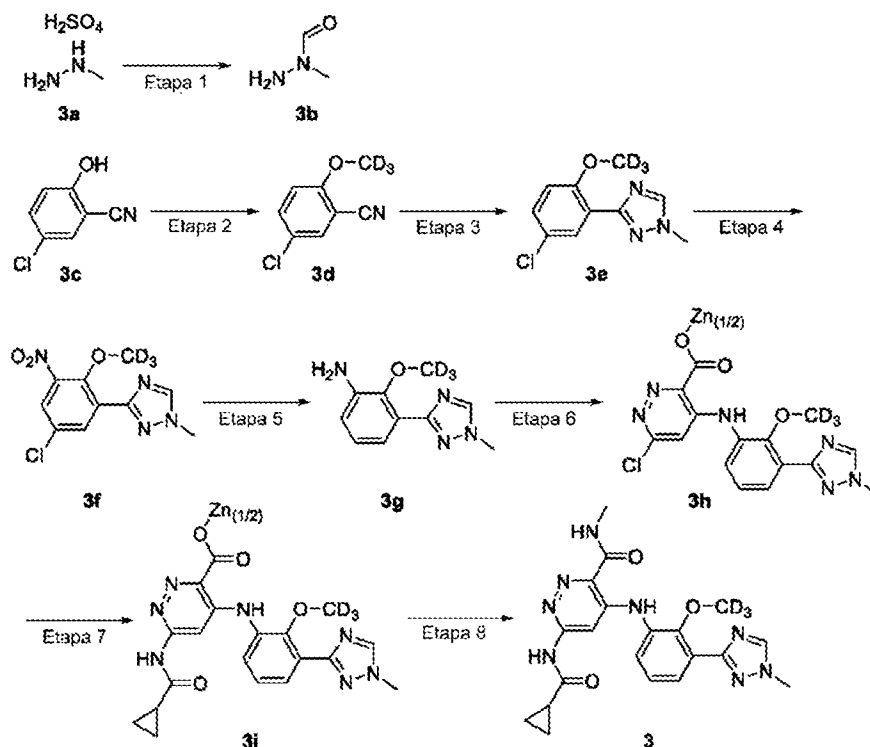
Ejemplo 2. 6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-(metil-d₃)-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-metilpiridazina-3-carboxamida (**2**)

45 El compuesto **2** se sintetizó según los métodos del ejemplo 1, salvo que en la etapa 9 se usó clorhidrato de metilamina (CH₃NH₂·HC) en lugar de clorhidrato de metilamina deuterado (CH₃NH₂·²H₂C).

EM m/z (ESI): 426 [M+1]

50 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,32 (s, 1H), 10,97 (s, 1H), 9,22 - 9,11 (m, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,66 (dd, J = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,51 (dd, J = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,31 - 7,22 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,86 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 2,15 - 2,01 (m, 1H), 0,87 - 0,75 (m, 4H).

55 Ejemplo 3. 6-ciclopropanocarboxamido)-4-((2-(metoxi-*d*₃)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-metilpiridazina-3-carboxamida (**3**)



Etapa 1

5 N-metilformohidrazida

A una solución de sulfato de metilhidrazina **3a** (40 g, 277 mmol) en metanol (250 ml) a temperatura ambiente se le añadió metóxido de sodio (100 g, 554 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 24 horas y se filtró. Después, al filtrado se le añadió formiato de metilo (17 g, 277 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el compuesto objetivo **5b** (22 g, en bruto). El producto bruto se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

EM m/z (ESI): 75 [M+1]

15 Step2

5-cloro-2-(metoxi-d3)benzonitrilo (3d)

A una mezcla de 5-cloro-2-hidroxibenzonitrilo **3c** (4 g, 26 mmol), carbonato de potasio (7,3 g, 53 mmol) y *N,N*-dimetilformamida (30 ml) se le añadió yoduro de metilo deuterado a temperatura ambiente (10 g, 78 mmol). La mezcla resultante se calentó hasta 70 °C y se agitó durante 12 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (2 x 100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad a presión reducida para dar el compuesto objetivo **3d** (4,3 g, sólido) con un rendimiento del 97 %.

EM m/z (ESI): 171 [M+1]

Etapa 3

30 Sulfato de 3-(5-cloro-2-(metoxi-d3)fenil)-1-metil-1H-1,2,4-triazol (3e)

A una solución de terc-butoxido de potasio (11,3 g, 101 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) a 0 °C se añadieron 5-cloro-2-(metoxi-d3) benzonitrilo **3d** (4,3 g, 25,3 mmol) y una solución de *N*-metilformilhidrazida (4,1 g, 58 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) de forma secuencial. Tras agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, a la mezcla se le añadió agua (50 ml), se calentó hasta 40 °C y se agitó durante 40 minutos. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la fase orgánica se separó, se lavó con salmuera saturada (40 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo (40 ml). A la solución resultante se le añadió

lentamente ácido sulfúrico concentrado (5 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. Después, la mezcla se filtró y se secó para dar el compuesto objetivo **3e** (5,6 g, sólido) con un rendimiento del 83 %.

EM m/z (ESI): 227 [M+1]

5

Etapa 4

3-(5-cloro-2-(metoxi-d₃)-3-nitrofenil)-1-metil-1H-1,2,4-triazol (3f)

10 A una solución de sulfato de 3-(5-cloro-2-(metoxi-d₃) fenil)-1-metil-1H-1,2,4-triazol **3e** (5,6 g, 24,7 mmol) en ácido sulfúrico (25 g) se le añadió ácido nítrico (2 g) a 0 °C. La solución resultante se calentó gradualmente a temperatura ambiente, se agitó durante 12 horas y después se enfrió nuevamente a 0 °C. Se añadieron agua (67 ml) y metanol (47 ml) a la solución a 0 °C, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La solución se calentó hasta 40 °C y se añadió hidróxido de amonio (42 ml). La solución se enfrió hasta 20 °C, se agitó durante 2
15 horas y después se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 30 ml) y se secó al vacío para dar el compuesto objetivo **3f** (3,37 g, sólido) con un rendimiento del 50 %.

EM m/z (ESI): 272 [M+1]

20

Etapa 5

2-(metoxi-d₃)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)anilina (3g)

25 A una solución de 3-(5-cloro-2-(metoxi-d₃)-3-nitrofenil)-1-metil-1H-1,2,4-triazol **3f** (3,37 g, 12,25 mmol) en metanol (10 ml) se le añadieron paladio sobre carbono al 10 % (400 mg) y bicarbonato de sodio (1,6 g, 25 mmol). La mezcla resultante se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 12 horas y después se filtró. El filtrado se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (25 ml). La mezcla resultante se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad a presión reducida para dar el compuesto objetivo **3g** (2,35 g, sólido) con un rendimiento del 92 %.

30

EM m/z (ESI): 208 [M+1]

Etapa 6

35 6-cloro-4-((2-(metoxi-d₃)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazina-3-carboxilato de zinc (3h)

40 A una mezcla de 4,6-dicloropiridazina-3-carboxilato de litio 1 h (3 g, 15,1 mmol), 2-(metoxi-d₃)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)anilina **3g** (2,35 g, 11,3 mmol), isopropanol (2,5 ml) y agua (18 ml) a temperatura ambiente se añadió acetato de zinc (2,5 g, 13,6 mmol). La mezcla se calentó hasta 65 °C y se agitó durante 12 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua (30 ml), se agitó durante 20 minutos y se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 30 ml) y tetrahidrofurano (2 x 30 ml) y se secó al vacío para dar el compuesto objetivo durante 3 h (4,3 g, sólido) con un rendimiento del 100 %.

45

EM m/z (ESI): 364 [M+1]

Etapa 7

50 6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-(metoxi-d₃)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de metilo (3i)

Una mezcla de 6-cloro-4-((2-(metoxi-d₃)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazina-3-carboxilato de zinc **3h** (4,3 g, 11 mmol), ciclopropanocarboxamida (2,4 g, 27,56 mmol), (2R)-1-[(1R)-1-[bis(1,1-dimetiletil)fosfino]etil]-2-(diciclohexilfosfino)ferroceno (600 mg, 1,1 mmol), acetato de paladio (125 mg, 0,55 mmol), tolueno (34 ml), acetonitrilo (17 ml), carbonato de potasio (3,1 g, 22 mmol) y 1,8-diazabicycloundec-7-eno (1,7 g, 11 mmol) se calentó hasta 80 °C bajo una atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 12 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, a la mezcla se le añadieron ácido acético acuoso (50 %, 17 ml) y ácido acético glacial (40 ml) de forma secuencial. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla homogénea resultante se lavó con éter de petróleo (2 x 20 ml). Se añadió agua (50 ml) y la mezcla se envejeció a temperatura ambiente durante 4 horas y después se filtró. El sólido se lavó con una solución acuosa de acetonitrilo (50 %, 20 ml) y acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, y después se secó al vacío a 65 °C durante 30 minutos para dar el producto objetivo **3i** (3 g, sólido) con un rendimiento del 66 %.

60

EM m/z (ESI): 413 [M+1]

65

Etapa 8

6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-(metoxi- d_3)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-metilpiridazina-3-carboxamida

5 Una mezcla de 6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-(metoxi- d_3)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de metilo **3i** (1,5 g, 3,38 mmol), clorhidrato de metilamina (280 mg, 4,0 mmol), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (900 mg, 4,73 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (230 mg, 1,7 mmol), acetonitrilo (3 ml), N-metilpirrolidona (3 ml) y N-metilimidazol (200 mg, 2,4 mmol) se calentó hasta 65 °C y se agitó durante 12 horas. Una vez completada la reacción, la reacción se interrumpió con agua (1,5 ml) y acetonitrilo (4,5 ml). La mezcla resultante se envejeció a 65 °C durante 1 hora y a 0 °C durante 3 horas, y después se filtró. El sólido se lavó secuencialmente con una solución acuosa de acetonitrilo (33 %, 4,5 ml) y acetonitrilo (4,5 ml), y se secó al vacío a 65 °C durante 8 horas para dar el producto objetivo **3** (811 mg, sólido) con un rendimiento del 56 %.

EM m/z (ESI): 426 [M+1]

15 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,32 (s, 1H), 10,97 (s, 1H), 9,24 - 9,08 (m, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,66 (dd, $J = 7,8, 1,5$ Hz, 1H), 7,52 (dd, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1H), 7,33 - 7,20 (m, 1 H), 3,96 (s, 3 H), 2,87 (d, $J = 4,8$ Hz, 3 H), 2,14 a 2,01 (m, 1 H), 0,91 a 0,73 (m, 4 H).

El compuesto **3** podría convertirse en una sal de HCl mediante el siguiente procedimiento:

20 A un matraz de reacción se le añadieron **3** (5,00 g, 11,752 mmol) y DMSO (27 ml). La mezcla resultante se calentó hasta 50 ~ 55 °C mientras se agitaba hasta que el sólido se disolvió completamente en una solución homogénea. Después, a la mezcla se le añadió ácido clorhídrico concentrado (36 %-38 %, 1,18 g), seguido de agua (3 ml) y semillas de cristal (25 mg). La mezcla resultante se agitó a 50 ~ 55 °C durante 0,5 h, se enfrió a 35 ~ 40 °C, se le añadió isopropanol (60 ml) gota a gota durante 0,5-1,0 h y se agitó a 35 ~ 40 °C durante 0,5 h. La mezcla se enfrió lentamente a 20 ~ 25 °C durante 1 h, se agitó durante la noche y después se filtró. La torta filtrada se lavó con isopropanol (2 x 15 ml) y se secó a presión reducida a 65 °C durante la noche para dar una sal mono-HCl de **3** (4,5 g, sólida) con un rendimiento del 83 %.

30 EM m/z (ESI): 426 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,72 (s a, 1H), 12,13 (s, 1H), 11,40 (s, 1H), 9,22 (q, $J = 4,5$ Hz, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,78 (dd, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1H), 7,61 (dd, $J = 8,0, 1,4$ Hz, 1H), 7,35 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 2,89 (d, $J = 4,8$ Hz, 3H), 2,14 - 2,00 (m, 1H), 1,00 - 0,84 (m, 4H).

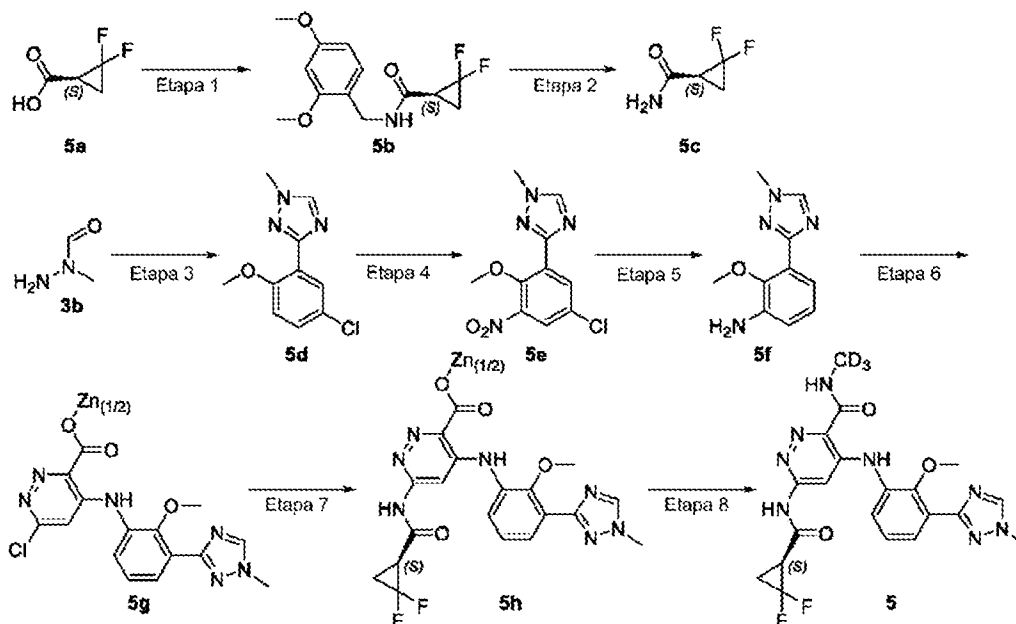
35 Ejemplo 4. 6-(ciclopropanocarboxamido)-4-((2-(metoxi- d_3)-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil- d_3)piridazina-3-carboxamida (**4**)

40 El compuesto **4** se sintetizó según los métodos del ejemplo **3**, salvo que en la etapa 8 se usó clorhidrato de metilamina deuterado ($\text{CD}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$) en lugar de clorhidrato de metilamina ($\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$).

EM m/z (ESI): 429 [M+1]

45 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,32 (s, 1H), 10,98 (s, 1H), 9,14 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,66 (dd, $J = 7,8, 1,6$ Hz, 1H), 7,52 (dd, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1H), 7,32 - 7,21 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 2,14 - 2,03 (m, 1H), 0,89 - 0,75 (m, 4H).

Ejemplo 5 (no según la invención). (S)-6-(2,2-Difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil- d_3)piridazina-3-carboxamida (**5**)



Etapa 1

5 (S)-N-(2,4-dimetoxibenzil)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxamida (5b)

A una mezcla de ácido (S)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxílico **5a** (1,5 g, 12,3 mmol), HATU (5,7 g, 15 mmol), diisopropiletilamina (4,8 g, 37 mmol) y *N,N*-dimetilformamida (15 ml) se le añadió 2,4-dimetoxibencilamina (4,0 g, 24,4 mmol). Tras agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para dar el compuesto objetivo **5b** (4,4 g, sólido).

EM m/z (ESI): 272 [M+1]

Etapa 2

15 (S)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxamida (5c)

Una solución de (S)-N-(2,4-dimetoxibenzil)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxamida **5b** en ácido trifluoroacético (10 ml) se calentó hasta 70 °C y se agitó durante 1 hora. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se concentró hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (diclorometano/metanol de 100/0 a 9/1) para dar el compuesto objetivo **5d** (1,4 g, sólido) con un rendimiento del 93 % en dos etapas.

EM m/z (ESI): 122 [M+1]

Etapa 3

3-(5-cloro-2-metoxifenil)-1-metil-1H-1,2,4-triazol (5d)

A una solución de terc-butóxido de potasio (34 g, 290 mmol) en tetrahidrofurano (200 ml) a 0 °C se le añadieron 5-cloro-2-metoxibenzonitrilo (20 g, 120 mmol) y metilformilhidrazida **3b** (22 g, en bruto) secuencialmente. Tras agitar a temperatura ambiente durante 72 horas, se añadió agua (500 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con salmuera saturada (2 x 300 ml), se secan sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran hasta sequedad a presión reducida para dar el compuesto objetivo **5d** (17,1 g, sólido) con un rendimiento del 88 %.

EM m/z (ESI): 224 [M+1]

Etapa 4

40 3-(5-cloro-2-metoxi-3-nitrofenil)-1-metil-1H-1,2,4-triazol (5e)

A una solución de 3-(5-cloro-2-metoxifenil)-1-metil-1*H*-1,2,4-triazol 5d (16,13 g, 72 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (72 g) se añadió ácido nítrico concentrado (8,5 g, 87 mmol) a 0 °C. Tras agitar durante 2 horas, la solución resultante se añadió a una mezcla de agua (250 g) y metanol (150 g) a 0 °C. La mezcla se ajustó entonces a pH > 7 con hidróxido de amonio y se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 100 ml) y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo de 100/0 a 3/7) para dar el producto objetivo **5e** (17,1 g, sólido) con un rendimiento del 88 %.

EM m/z (ESI): 269 [M+1]

10 Etapa 5

2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)anilina (5f)

15 A una solución de 3-(5-cloro-2-metoxifenil)-1-metil-1*H*-1,2,4-triazol 5e (17 g, 63 mmol) en metanol se le añadieron paladio sobre carbono al 10 % (3 g) y bicarbonato sódico (10,5 g, 126 mmol). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 5 horas y después se filtró. El filtrado se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para dar el compuesto objetivo **5f** (8,8 g, sólido) con un rendimiento del 68 %.

20 EM m/z (ESI): 205 [M+1]

Etapa 6

25 6-cloro-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de zinc (5g)

A una mezcla de 4,6-dicloropiridazina-3-carboxilato de litio 1 h (4,53 g, 22,87 mmol), 2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)anilina **5f** (5,6 g, 27,44 mmol), isopropanol (4,5 ml) y agua (34 ml) se le añadió acetato de zinc (4,2 g, 22,87 mmol). La mezcla resultante se calentó hasta 65 °C y se agitó durante 12 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua (30 ml), se envejeció durante 30 minutos y después se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 30 ml) y tetrahidrofurano (2 x 30 ml) y se secó al vacío para dar el compuesto objetivo **5g** (7,6 g, sólido) con un rendimiento del 93 %.

EM m/z (ESI): 361 [M+1]

35 Etapa 7

(S)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazina-3-carboxilato de zinc (5h)

40 Una mezcla de 6-cloro-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazina-3-carboxilato de zinc **5g** (1,6 g, 3,93 mmol), (S)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxamida **5c** (1,2 g, 9,8 mmol), (2*R*)-1-[(1*R*)-1-bis(1,1-dimetiletil)fosfino]etil]-2-(diciclohexilfosfino)ferroceno (220 mg, 0,393 mmol), acetato de paladio (44 mg, 0,196 mmol), tolueno (18 ml), acetonitrilo (11 ml), carbonato de potasio (1,1 g, 7,8 mmol) y 1,8-diazabicycloundec-7-eno (600 mg, 3,93 mmol) se agitó a 80 °C durante 72 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con ácido acético (27 ml) y agua (9 ml), y la solución resultante se lavó con éter de petróleo (2 x 30 ml). Después se añadió agua (50 ml) y se dejó durante 3 horas. La mezcla se filtró y el sólido se secó al vacío para dar el compuesto objetivo durante **5h** (1,1 g, sólido) con un rendimiento del 62 %.

EM m/z (ESI): 446 [M+1]

50 Etapa 8

(S)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-*N*-(metil-*d*3)piridazina-3-carboxamida

55 A una mezcla de (S)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)piridazin-3-carboxilato de zinc **5h** (1,1 g, 2,46 mmol), clorhidrato de metilamina deuterada (210 mg, 2,95 mmol), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (660 mg, 3,44 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (190 mg, 1,23 mmol), acetonitrilo (6 ml) y *N*-metilpirrolidona (6 ml) se le añadió *N*-metilimidazol (141 mg, 1,72 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 65 °C y se agitó durante 1 hora. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para dar el compuesto objetivo **5** (420 mg, sólido) con un rendimiento del 37 %.

EM m/z (ESI): 462 [M+1]

65

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,52 (s, 1H), 11,01 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,53 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,33 - 7,23 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,13 - 2,97 (m, 1H), 2,10 - 1,95 (m, 2H).

5 Ejemplo 6 (no según la invención). (S)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-metilpiridazina-3-carboxamida (6)

El compuesto 6 se sintetizó según los procedimientos del ejemplo 5, excepto que el clorhidrato de metilamina deuterada (CD₃NH₂·HCl) en la etapa 8 se sustituyó por clorhidrato de metilamina (CH₃NH₂·HCl).

10 EM m/z (ESI): 459 [M+1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,52 (s, 1H), 11,01 (s, 1H), 9,20 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,52 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,33 - 7,23 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,11 - 2,98 (m, 1H), 2,86 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H), 2,10 - 1,94 (m, 2H).

15 **Ejemplo 7 (no según la invención).** (R)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-(metil-*d*₃)piridazina-3-carboxamida (7). El compuesto 7 se sintetizó según los procedimientos del ejemplo 5, excepto que el ácido (S)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxílico (5a) en la etapa 1 se sustituyó por ácido (R)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxílico.

20 EM m/z (ESI): 462 [M+1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,52 (s, 1H), 11,01 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,53 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,28 (m, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,11-2,99 (m, 1H), 2,10 - 1,95 (m, 2H).

25 **Ejemplo 8 (no según la invención).** (R)-6-(2,2-difluorociclopropano-1-carboxamido)-4-((2-metoxi-3-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)amino)-N-metilpiridazina-3-carboxamida (8). El compuesto 8 se sintetizó según los procedimientos del ejemplo 5, excepto que (i) el ácido (S)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxílico (5a) en la etapa 1 se sustituyó por ácido (R)-2,2-difluorociclopropano-1-carboxílico, y (ii) el clorhidrato de metilamina deuterado (CD₃NH₂·HCl) en la etapa 8 se sustituyó por clorhidrato de metilamina (CH₃NH₂·HCl).

30 EM m/z (ESI): 459 [M+1]

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,52 (s, 1H), 11,01 (s, 1H), 9,27 - 9,16 (m, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,52 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,33 - 7,24 (m, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,73 (s, 2H), 3,11 - 2,99 (m, 1H), 2,86 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H), 2,08 - 1,95 (m, 2H).

35 Ejemplo 9. Ensayo de actividad enzimática del dominio de la cinasa JAK2

El efecto de los compuestos de la presente invención sobre la actividad enzimática del dominio de cinasa JAK2 recombinante (JH1) se evalúa detectando el nivel de fosforilación del sustrato en una reacción de cinasa usando el kit de detección del ensayo de cinasa HTRF (Cisbio, n.º de cat. 62TK0PEC) (tabla 1).

40 El método experimental se describe generalmente a continuación:

Un tampón de reacción que contiene los siguientes componentes: un tampón enzimático (1x), MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y Brij35 al 0,01 % del kit; una proteína del dominio de la cinasa JAK2 recombinante humana (Carna Biosciences, n.º de cat. 08-045) diluido hasta una solución de 0,15 ng/μl con el tampón de reacción; una solución de reacción de sustrato que contiene 2,5 μM de ATP y un sustrato de tirosina cinasa biotinilado diluido a 0,25 μM con el tampón de reacción; una solución de detección que contiene 0,1 ng/μl de anticuerpo de jaula marcado con Eu³⁺ (Cisbio, n.º de cat. 61T66KLB) y XI665 marcado con estreptavidina 12,5 nM (Cisbio, n.º de cat. 610SAXLB) en el tampón de reacción.

55 El compuesto de prueba se disuelve hasta 1 mM en DMSO, seguido de una dilución en serie de 4 veces con DMSO hasta una concentración mínima de 61 nM. Cada concentración se diluye adicionalmente 40 veces con el tampón de reacción.

60 A una placa de ensayo de 384 pocillos (Corning, n.º de cat. 3674) se le añaden 4 μl de solución de compuesto y 2 μl de solución de cinasa JAK2. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos y, a continuación, se le añaden 4 ml de la solución de reacción del sustrato. Tras una incubación adicional a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añade a la mezcla de reacción un volumen igual de 10 μl de solución de detección y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se usa un lector de placas Envision (Perkin Elmer) para medir el progreso de la reacción a 620 nm y 665 nm. La razón de absorbancias a 665 nm y 620 nm se correlaciona positivamente con el grado de fosforilación del sustrato, por lo que se detecta la actividad de la cinasa JAK2. En este experimento, el grupo sin la proteína cinasa JAK2 es el grupo de inhibición del 100 %, y el grupo con la proteína cinasa

ES 2 981 764 T3

JAK2 pero no el compuesto de prueba es el grupo de inhibición del 0 %. El porcentaje de inhibición de la actividad de la cinasa JAK2 por el compuesto de ensayo se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - 100 * \frac{(\text{razón}_{\text{compuesto}} - \text{razón}_{100\% \text{ de inhibición}})}{(\text{razón}_{0\% \text{ de inhibición}} - \text{razón}_{100\% \text{ de inhibición}})}$$

El valor de Cl_{50} del compuesto de ensayo se calcula a partir de 8 puntos de concentración usando el software XLfit (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido) mediante la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Abajo} + (\text{Arriba} - \text{Abajo}) / (1 + 10^{((\log Cl_{50} - X) \times \text{factor de pendiente}))}$$

Cuando Y es el porcentaje de inhibición, X es el logaritmo de la concentración del compuesto de ensayo, abajo es el valor de meseta inferior de la curva en forma de S, arriba es el valor de meseta superior de la curva en forma de S y el factor de pendiente es el coeficiente de pendiente de la curva.

Ejemplo 10. Ensayo de actividad enzimática del dominio de la cinasa TYK2

El efecto de los compuestos de la presente invención sobre la actividad enzimática del dominio de cinasa TYK2 recombinante (JH1) se evalúa detectando el nivel de fosforilación del sustrato en una reacción de cinasa usando el kit de detección del ensayo de cinasa HTRF (Cisbio, n.º de cat. 62TK0PEC) (tabla 1).

El método experimental se describe generalmente a continuación:

Un tampón de reacción que contiene los siguientes componentes: un tampón enzimático (1 x), $MgCl_2$ 5 mM, DTT 1 mM, SEB 10 nM (Cisbio, n.º de cat. 61SEBALB), EGTA 0,625 mM y Brij35 al 0,01 % del kit; una proteína del dominio de la cinasa TYK2 recombinante humana (JH1) (Carna Biosciences, n.º de cat. 08-147) diluido hasta una solución de 0,25 ng/ μ l con el tampón de reacción; una solución de reacción de sustrato que contiene 11,25 μ M de ATP y un sustrato de tirosina cinasa biotinilado diluido a 0,5 μ M con el tampón de reacción; una solución de detección que contiene 0,1 ng/ μ l de anticuerpo de jaula marcado con Eu^{3+} (Cisbio, n.º de cat. 61T66KLB) y XI665 marcado con estreptavidina 25 nM (Cisbio, n.º de cat. 610SAXLB) en el tampón de reacción.

El compuesto de prueba se disuelve hasta 1 mM en DMSO, seguido de una dilución en serie de 4 veces con DMSO hasta una concentración mínima de 61 nM. Cada concentración se diluye adicionalmente 40 veces con el tampón de reacción.

A una placa de ensayo de 384 pocillos (Corning, n.º de cat. 3674) se le añaden 4 μ l de solución de compuesto y 2 μ l de solución de cinasa TYK2. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos y, a continuación, se le añaden 4 ml de la solución de reacción del sustrato. Tras una incubación adicional a temperatura ambiente durante 40 minutos, se añade a la mezcla de reacción un volumen igual de 10 μ l de solución de detección y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se usa un lector de placas Envision (Perkin Elmer) para medir el progreso de la reacción a 620 nm y 665 nm. La razón de absorbancias a 665 nm y 620 nm se correlaciona positivamente con el grado de fosforilación del sustrato, por lo que se detecta la actividad de la cinasa TYK2. En este experimento, el grupo sin la proteína cinasa TYK2 es el grupo de inhibición del 100 %, y el grupo con la proteína cinasa TYK2 pero no el compuesto de prueba es el grupo de inhibición del 0 %. El porcentaje de inhibición de la actividad de la cinasa TYK2 por el compuesto de ensayo se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - 100 * \frac{(\text{razón}_{\text{compuesto}} - \text{razón}_{100\% \text{ de inhibición}})}{(\text{razón}_{0\% \text{ de inhibición}} - \text{razón}_{100\% \text{ de inhibición}})}$$

El valor de Cl_{50} del compuesto de ensayo se calcula a partir de 8 puntos de concentración usando el software XLfit (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido) mediante la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Abajo} + (\text{Arriba} - \text{Abajo}) / (1 + 10^{((\log Cl_{50} - X) \times \text{factor de pendiente}))}$$

Cuando Y es el porcentaje de inhibición, X es el logaritmo de la concentración del compuesto de ensayo, abajo es el valor de meseta inferior de la curva en forma de S, arriba es el valor de meseta superior de la curva en forma de S y el factor de pendiente es el coeficiente de pendiente de la curva.

Ejemplo 11. Ensayo de unión al dominio de la pseudocinasa TYK2

La unión de los compuestos de la presente invención al dominio de pseudocinasa TYK2 (JH2) se determina mediante el uso de un ensayo bioquímico de transferencia de energía por fluorescencia de resolución temporal (TR-FRET) mediante competencia con una sonda comercial marcada con fluoresceína (el trazador de cinasas conjugadas con Alexa-Fluor 647 178) (tabla 1).

El método experimental se describe generalmente a continuación:

Un tampón de unión contiene Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, Brij35 al 0,015 %, DTT 2 mM, EGTA 0,625 mM y KF 100 mM. El dominio JH2 de TYK2 (aminoácidos 556-871 dentro de la proteína de longitud completa) se expresa y purifica en la plataforma de purificación e identificación de proteínas de la Universidad de Tsinghua. El compuesto de prueba se disuelve hasta 0,1 mM en DMSO, seguido de una dilución en serie de 4 veces con DMSO hasta una concentración mínima de 61 nM. Cada concentración se diluye adicionalmente 40 veces con el tampón de reacción.

A una placa de ensayo de 384 pocillos (Corning, n.º de cat. 4512) se le añaden 5 µl de solución de compuesto y 5 µl de solución de dominio TYK2 JH2 (160 nM). La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, se le añaden 10 µl de una mezcla de sonda marcada con fluoresceína (ThermoFisher, n.º de cat. PV5593) (20 nM) y un anticuerpo marcado con GST-europio (Eu) (Cisbio, n.º de cat. 61GSTKLA) (40 ng/ml). Tras una incubación adicional a temperatura ambiente durante 30 minutos, la señal HTRF (razón de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 615 nm y 665 nm para el aceptor de fluoresceína y el donante de europio, respectivamente) se mide en un lector de placas Envision (Perkin Elmer). El porcentaje de inhibición se calcula comparando con un control positivo sin el compuesto de prueba y un control negativo sin proteína según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - 100 * (\text{señal}_{\text{compuesto}} - \text{señal}_{\text{control negativo}}) / (\text{señal}_{\text{control positivo}} - \text{señal}_{\text{control negativo}})$$

El valor de CI₅₀ del compuesto de ensayo se calcula a partir de 8 puntos de concentración usando el software XLfit (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido) mediante la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Abajo} + (\text{Arriba} - \text{Abajo}) / (1 + 10^{((\log \text{CI}_{50} - X) \times \text{factor de pendiente}))}$$

Cuando Y es el porcentaje de inhibición, X es el logaritmo de la concentración del compuesto de ensayo, abajo es el valor de meseta inferior de la curva en forma de S, arriba es el valor de meseta superior de la curva en forma de S y el factor de pendiente es el coeficiente de pendiente de la curva.

Tabla 1

Compuesto n.º	IC ₅₀ (µM)		IC ₅₀ (nM)
	Dominio de cinasa JAK2 (JH1)	Dominio de cinasa TYK2 (JH1)	Dominio de pseudocinasa TYK2 (JH2)
1 (no según la invención)	2,3	2,1	
2	2,2	>10	5,6
3	3,0	>10	5,7
4	2,3	>10	
5 (no según la invención)	7,0	6,3	5,4
6 (no según la invención)	7,8	9,5	4,9
7 (no según la invención)	8,5	>10	
8 (no según la invención)	7,5	>10	
Referencia (BMS-986165)	0,84	2,9	5,5

Los compuestos de la presente invención tienen una actividad inhibidora débil o baja hacia los dominios de cinasa de JAK2 o TYK2. La tabla 1 muestra que los compuestos 2, 3 y 4 tenían una CI₅₀ > 10 µM para la inhibición directa de la actividad de la cinasa, mientras que el compuesto de referencia tenía una CI₅₀ inferior de 2,9 µM. Los compuestos de prueba y los compuestos de referencia tenían todos una fuerte unión a TYK2 JH2 (CI₅₀ en el intervalo nM).

Ejemplo 12. Inhibición de la secreción de IFN-gamma inducida por IL-12 en células NK92

El efecto de los compuestos de la presente invención sobre la secreción de IFN-gamma inducida por TYK2 en células NK92 se evalúa mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (tabla 2).

El receptor de IL-12 se expresa principalmente en células T activadas, células NK (NK92 es una línea de células NK), células DC y células B. Cuando se une a la IL-12, activa la ruta de transducción de señales JAK2/TYK2 en las células NK y los linfocitos T, induciendo así la secreción de IFN-γ.

El método experimental se describe generalmente a continuación:

El compuesto de prueba se disuelve hasta 2,5 mM en DMSO, seguido de una dilución en serie de 4 veces con DMSO hasta una concentración mínima de 0,31 µM. Cada concentración se diluye además 50 veces con un medio MEMα sin FBS (Gibco, n.º de cat. 12561-056).

Células NK92 (Nanjing Cobioer, n.º de cat. CBP60980) se cultivan en un medio MEMα completo que contiene FBS al 12,5 % (Ausbian, n.º de cat. VS500T), suero de caballo al 12,5 % (Gibco, n.º de cat. 16050-122), ácido fólico 0,02 mM (Sigma, n.º de cat. F8758), inositol 0,2 mM (Sigma, n.º de cat. 17850), β-mercaptoetanol 0,55 mM (Gibco, n.º de cat. 21985-023), 200 U/ml de IL-2 (R&D Systems, n.º de cat. 202-1L) y 100 U/ml de penicilina (ThermoFisher, n.º de cat. 15140122). Cuando se cubre entre el 80 y el 90 % de la superficie del recipiente de cultivo, las células se dispersan y se colocan en placas en una placa de 96 pocillos (ThermoFisher, n.º de cat. 167425) con 100.000 células por pocillo (80 µl del medio MEMα completo sin IL-2). A continuación, la placa de 96 pocillos se incuba durante toda la noche en un incubador a 37 °C/el 5 % de CO₂.

Después de la incubación durante la noche, 10 µl del compuesto de ensayo y 10 µl de 50 ng/ml de IL-12 (R & D Systems, n.º de cat. 219-1L) se añaden a cada pocillo y se mezclan suavemente, y la placa de 96 pocillos se incuba en el incubador a 37 °C/el 5 % CO₂ durante 24 horas adicionales. La placa se centrifuga a 800 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfieren 50 µl del sobrenadante de cada pocillo a otra placa de 96 pocillos (Sigma, n.º de cat. CLS3695) recubierto con un anticuerpo anti-IFN-gamma. La cantidad de secreción de IFN-γ se detecta siguiendo las instrucciones del kit ELISA DuoSet de IFN-gamma para humanos (R & D Systems, n.º de cat. DY285B). En el experimento, el grupo con IL-12 y el compuesto de prueba que se está reemplazando por el medio MEMα es el grupo de control no estimulado (inhibición del 100 %), y el grupo con IL-12 y DMSO al 0,2 % es el grupo estimulado (inhibición del 0 %). El porcentaje de inhibición de la secreción de IFN-gamma inducida por la IL-12 en las células NK-92 por el compuesto de ensayo se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje \% de inhibición} = 100 - 100 * (\text{señal}_{\text{compuesto}} - \text{señal}_{\text{control no estimulado}}) / (\text{señal}_{\text{control estimulado}} - \text{señal}_{\text{control no estimulado}})$$

El valor de IC₅₀ del compuesto de ensayo se calcula a partir de 8 puntos de concentración usando el software XLfit (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido) mediante la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Abajo} + (\text{Arriba} - \text{Abajo}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) \times \text{factor de pendiente})})$$

Cuando Y es el porcentaje de inhibición, X es el logaritmo de la concentración del compuesto de ensayo, abajo es el valor de meseta inferior de la curva en forma de S, arriba es el valor de meseta superior de la curva en forma de S y el factor de pendiente es el coeficiente de pendiente de la curva.

Tabla 2

Compuesto n.º	IC ₅₀ (NK92_IL12/IFN-γ) (nM)
1 (no según la invención)	16
2	13
3	14
4	11
5 (no según la invención)	52
6 (no según la invención)	47
7 (no según la invención)	74
8 (no según la invención)	75
Referencia (BMS-986165)	17

Los compuestos de la presente invención tuvieron un efecto inhibidor significativo sobre la secreción de IFN-γ inducida por TYK2 en células NK92.

Ejemplo 13. Determinación de la farmacocinética in vivo en ratas

Se evaluó la farmacocinética del compuesto 3 de la presente invención y del compuesto de referencia BMS-986165. El compuesto 3 tiene un OCD₃ en un anillo de benceno, mientras que el compuesto de referencia tiene un CD₃ en un resto de amida. El grupo metilo es normalmente lábil in vivo, sujeto a hidrólisis por amidasa en el caso de la metilamida y a desmetilación oxidativa por CYP en el caso del metoxilo y el metiltriazol. La sustitución del metilo por metilo trideuterado mejora la biodisponibilidad y la exposición in vivo del compuesto y proporciona una mejor eficacia del compuesto en la misma dosis.

El compuesto 3 y el compuesto de referencia en una solución de 0,5 mg/ml que contenía un 5 % de N,N-dimetilacetamida, un 20 % de solutol y un 75 % de solución salina, se administraron por vía oral a tres ratas Sprague

5 Dawley machos a una dosis de 5 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la administración. Las concentraciones del compuesto en el plasma se cuantificaron mediante CL-EM/EM usando un espectrómetro de masas API-4500. El límite de cuantificación (LOQ) del análisis fue de 1 ng/ml. Los parámetros farmacocinéticos (PK) se calcularon mediante el método no compartimental usando WinNonlin y están presentes en la tabla 3. Los resultados muestran que el compuesto 3 de la presente invención tuvo mejores exposiciones in vivo que el compuesto de referencia.

Tabla 3

Compuesto n.º	IV (1 mpk) (n=3)			PO (5 mpk) (n=3)		
	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	T _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	F (%)
3	12	1,1	4,3	971	6560	92
Referencia BMS-986165	14	1,5	3,3	632	2828	46

10 Ejemplo 14. Evaluación de la eficacia in vivo en el modelo animal de colitis inducida por anticuerpos anti-CD40

15 Los ratones hembra CB 17-Scid (8-10 semanas de edad, 18-20 g) del laboratorio Beijing Vital River se dividieron aleatoriamente en 5 grupos (n = 8 por grupo). El día 0, se indujo la colitis en ratones, cada uno con una única inyección intraperitoneal de 100 µg del AcM anti-CD40 FGK4.5 (BioXCell, n.º de cat. EB0016-2) en PBS. A partir del día 0 al 7, a los ratones de los grupos de tratamiento se les administró por vía oral 0, 1,5, 5, 15 mg/kg del compuesto 3 o 5 mg/kg de BMS-986165 en el vehículo de DMSO/solutol/PEG-400 (10:5:30) dos veces al día, mientras que a los ratones del grupo de vehículos se les administró por vía oral el vehículo mencionado anteriormente. Diariamente, los ratones se pesaron y monitorizaron para detectar signos de colitis, incluida la pérdida de peso corporal y las consiguientes deposiciones blandas y diarrea. El día 8, todos los animales fueron sacrificados. Se recogieron los tejidos del bazo y se pesaron. Los resultados muestran que el compuesto 3 a dosis de 1,5 mg/kg, 5 mg/kg y 15 mg/kg y el compuesto de referencia a 5 mg/kg protegieron significativamente a los ratones de la colitis al prevenir la pérdida de peso corporal (Figura 2, tabla 4) y el agrandamiento del bazo (Tabla 4) en comparación con los ratones del grupo de vehículos.

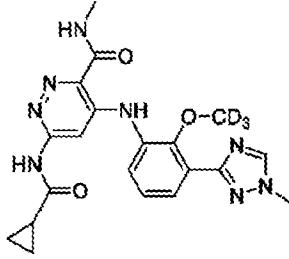
25 Tabla 4

Grupo	Día	Cambio relativo en el peso corporal (%)*										Peso del bazo (g)
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	8	
Vehículo	Media	0,0	-3,1	-10,8	-13,0	-5,2	-0,3	-4,4	-4,7	-3,7	0,153	
	EEM	0,0	0,8	1,1	0,9	1,4	0,9	1,4	1,2	1,1	0,011	
BMS-986165 5 mg/kg	Media	0,0	-0,8	-3,8	0,0	1,6	1,9	0,7	-0,2	-3,1	0,036	
	EEM	0,0	2,8	3,0	3,2	3,3	3,0	2,7	2,8	1,9	0,003	
Cmpd 3 1,5 mg/kg	Media	0,0	-0,9	-4,8	-1,3	1,5	1,5	-0,2	0,0	-3,7	0,060	
	EEM	0,0	0,3	0,5	0,9	1,3	1,6	2,0	2,3	1,3	0,006	
Cmpd 3 5 mg/kg	Media	0,0	-1,8	-4,8	-0,8	0,7	1,3	0,3	-0,6	-4,7	0,037	
	EEM	0,0	0,5	0,6	0,9	1,1	1,2	1,3	1,8	2,2	0,002	
Cmpd 3 15 mg/kg	Media	0,0	0,5	-0,1	0,9	0,9	1,1	0,5	0,6	-1,4	0,025	
	EEM	0,0	0,6	1,0	1,1	1,4	1,3	1,2	1,6	1,3	0,002	

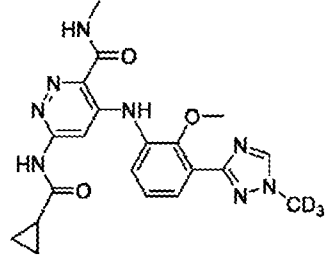
* El cambio relativo en el peso corporal (RCBW) se calcula según la fórmula $RCBW (\%) = (BWx - BW0) / BW0 \times 100 \%$, donde BWx es el peso corporal medio el día x y BW0 es el peso corporal medio el día 0. EEM: error estándar de la media.

REIVINDICACIONES

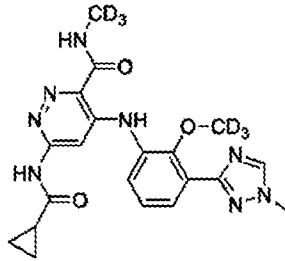
1. Un compuesto del compuesto 2, 3 o 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



Compuesto 3



Compuesto 2



Compuesto 4

- 5
2. El compuesto de la reivindicación 1, que es el compuesto 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 3. El compuesto según la reivindicación 1, que es el compuesto 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El compuesto según la reivindicación 1, que es el compuesto 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

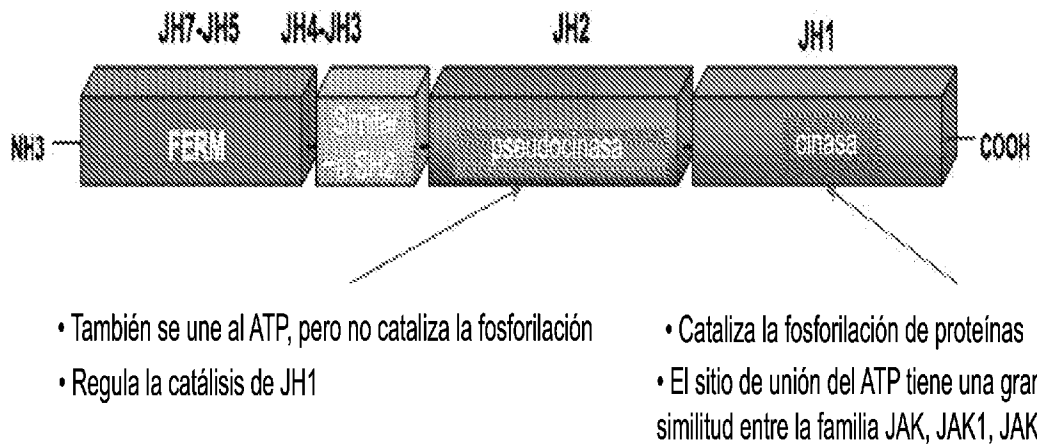
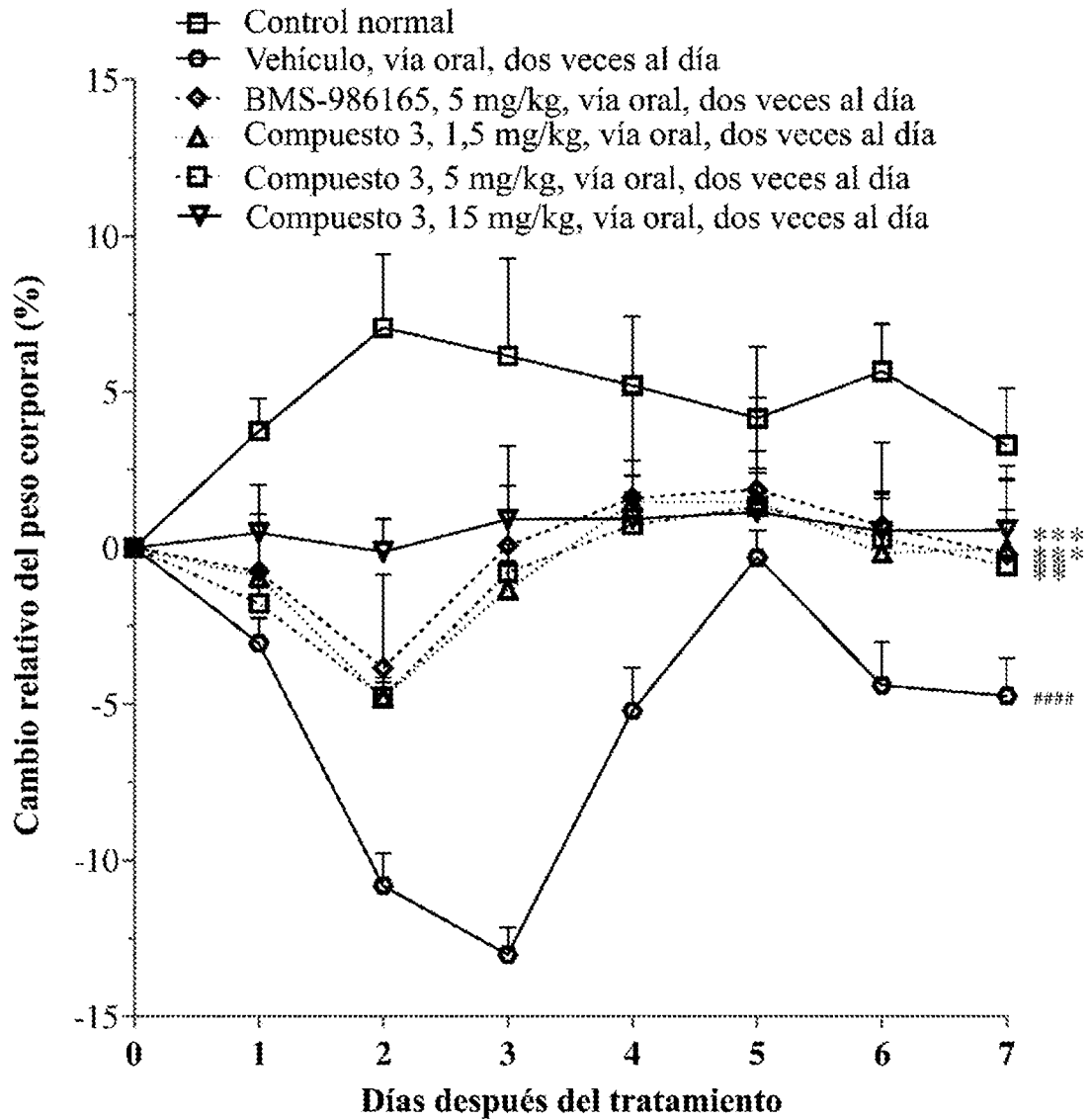


Fig. 1



P < 0,0001, vehículo frente a control normal.
 ** P < 0,01, *** P < 0,001, grupo de tratamiento frente a vehículo.

Fig. 2