

INHIBIDORES DE LA JAK1 PARA EL TRATAMIENTO DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 61/946,124, presentada el 28 de febrero de 2014, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere a inhibidores selectivos de la JAK1 y su uso en el tratamiento de síndromes mielodisplásicos (MDS, por sus siglas en inglés).

ANTECEDENTES

Los síndromes mielodisplásicos (MDS), conocidos anteriormente como síndromes dismielopoyéticos o preleucemia, son trastornos heterogéneos y hematopoyéticos clonales que se caracterizan por hematopoyesis ineficaz en uno o más de los linajes principales de células mieloides. Los síndromes mielodisplásicos se asocian con insuficiencia de la médula ósea, citopenias de la sangre periférica y una propensión a progresar a la leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés). Además, pueden detectarse anomalías citogenéticas clonales en aproximadamente el 50 % de los casos con MDS. En la población general, el MDS se manifiesta en 5 por 100,000 y la incidencia aumenta con la edad, para llegar a aproximadamente 22 a 45 por 100,000 en individuos mayores de 70 años (Greenberg, "The myelodysplastic syndromes" en Hoffman, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice (3.º ed.), Churchill Livingstone; 2000:1106-1129; Liesveld y Lichtman, capítulo 88. "Myelodysplastic Syndromes (Clonal Cytopenias and Oligoblastic Myelogenous Leukemia)", en Prchal et al, eds. Williams Hematology. 8.º ed., Nueva York: McGraw-Hill; 2010). A pesar de los avances científicos en el conocimiento de la fisiopatología de los MDS, hay pocas opciones terapéuticas disponibles y son, principalmente, de tipo paliativo, especialmente cuando los pacientes afectados no son candidatos al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés).

El estándar de tratamiento para los MDS incluye cuidados de apoyo que comprenden observación y seguimiento clínico, apoyo psicosocial e intentos para mejorar la calidad de vida (Cheson, et al, *Blood* 2000;96:3671–3674; Venugopal et al. *Cancer Treat Res* 2001;108:257-265; Greenberg, *Int J Ped Hem-Onc* 1997;4:231-238). Además, se necesitan transfusiones de RBC para la anemia

sintomática y transfusiones de plaquetas para episodios de sangrado derivados de la trombocitopenia. Los pacientes con síndrome mielodisplásico que requieren transfusiones de RBC pueden desarrollar complicaciones, que incluyen el desarrollo de aloanticuerpos que requieren transfusiones cada vez más frecuentes, así como sobrecarga de hierro con daño de órganos objetivo al hígado, corazón y órganos endocrinos, que requieren quelación del hierro para mantener la ferritina sérica en $< 1000 \mu\text{g/L}$ (Venugopal et al 2001 (*supra*), Greenberg 1997 (*supra*)). En los casos con citopenia sintomática refractaria, es necesario el apoyo de citocinas hematopoyéticas, tal como el uso del factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante (G-CSF) o el CSF de granulocitos y monocitos (GM-CSF) para MDS neutropénicos con complicaciones infecciosas, y el agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) para la anemia sintomática (Cheson et al 2000 (*supra*), Jädersten et al, *Blood* 2005;106:803-811; Schiffer, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:205-210). En los primeros estadios de MDS, es decir, IPSS bajo e IPSS intermedio-1, la anemia sintomática es la razón más común que requiere intervención terapéutica. El ESA solo beneficia a una fracción de estos pacientes y la mejor respuesta se observa en pacientes que no son dependientes de transfusiones de RBC o los que tienen un bajo nivel de EPO endógena ($< 500 \text{ IU}$) (Cheson et al 2000 (*supra*), Jädersten et al 2005 (*supra*), Schiffer 2006 (*supra*), Fenaux, et al., *Lancet Oncol* 2009;10:223-232). Con el tiempo, los pacientes dejan de responder a la terapia ESA y requieren apoyo de transfusión de RBC, aunque se prosigue, típicamente, con el ESA, incluso cuando se necesitan transfusiones de RBC y los recuentos de reticulocitos son bajos. La necesidad de transfusión puede variar y puede estar influenciada por cuestiones médicas concomitantes que requieren un mayor nivel de Hgb, tales como angina de pecho, desarrollo de aloanticuerpos a RBC, esplenomegalia y hemorragia gastrointestinal oculta proveniente de la trombocitopenia o disfunción plaquetaria (Venugopal et al 2001 (*supra*), Greenberg 1997 (*supra*), Fenaux et al 2009 (*supra*)).

La terapia de intensidad baja incluye el uso de quimioterapia de intensidad baja o modificadores de respuesta biológica (BRM, por sus siglas en inglés). Los agentes hipometilantes, tales como los inhibidores de la ADN metiltransferasa 5 azacitidina y decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina) han demostrado reducir el riesgo de transformación leucémica en estudios aleatorizados de Fase 3, y mejorar la supervivencia general en una proporción de pacientes (Fenaux et al 2009 (*supra*), Silverman, *J Clin Oncol* 2002;20:2429-2440; Silverman, *J Clin Oncol* 2006;24:3895-3903). De manera similar, la decitabina ha mostrado una mayor tasa de respuesta de la enfermedad, duración de la remisión, tiempo para la progresión a AML y beneficio de supervivencia en pacientes con MDS de riesgo intermedio y

riesgo alto de la enfermedad. Además, la decitabina mostró una mejora significativa en la calidad de vida informada por el paciente (según la European Organisation for Research and Treatment of Cancer [EORTC QLQ C30]) para las dimensiones de fatiga y funcionamiento físico (Kantarjian, et al., *Cancer* 2006;106:1794-1803; Lübbert, et al., *Br J Haematol* 2001;114:349-357; Lübbert, et al., *J Clin Oncol* 2011;29:1987-1996). La 5-azacitidina y decitabina están aprobadas para el tratamiento de MDS y proporcionan, específicamente, beneficios clínicos y están recomendadas por el panel NCCN MDS para pacientes con riesgo intermedio 2 de IPSS y riesgo alto de MDS (National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Myelodysplastic Syndromes Guidelines Version 1. 2012. www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp).

Las moléculas inflamatorias han estado implicadas como señales reguladoras que dirigen la proliferación y muerte apoptótica de células progenitoras hematopoyéticas en los MDS. Se cree que la estimulación inmune crónica, junto con los cambios dependientes de la senescencia en células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPC, por sus siglas en inglés) y el microambiente de BM son críticos para la patogénesis de la enfermedad. La evidencia creciente implica la activación de la señalización inmune innata en la senescencia hematopoyética y la patobiología de los MDS (Chen et al., 2014). Los modificadores inmunes que incluyen inhibidores de células T, tales como globulina antitimocítica (ATG), ciclosporina, y talidomida y su lenalidomida análoga (Molldrem, et al., *Br J Haematol* 1997;99:699-705; Sloand, et al., *J Clin Oncol* 2008;26:2505-2511; Raza, et al., *Blood* 2008;111:86-93; Fenaux, et al., *Blood* 2011;118:3765-3776; List, et al., *N Engl J Med* 2005;352:549-557) se usan como agentes MDS de intensidad baja. La terapia de intensidad alta para los MDS incluye quimioterapia de inducción intensiva, que se usa para el tratamiento de AML y HSCT. Se han probado diferentes regímenes quimioterapéuticos intensivos, ya que tienen el potencial de alterar la historia natural de la enfermedad, y los estudios comparativos no han podido demostrar beneficios; este método se mantiene en fase de investigación y como una posible opción para pacientes con MDS con enfermedad de riesgo alto. La HSCT alogénica, única modalidad de tratamiento curativo para el MDS y, preferentemente, de un donante hermano compatible, es una opción preferida para pacientes con MDS de riesgo alto, pero la falta de un donante adecuado y las comorbilidades relacionadas con la edad avanzada excluyen, frecuentemente, a estos pacientes de someterse a este procedimiento (NCCN 2012 (*supra*); Larson, *Best Pract Res Clin Hematol* 2006;19:293-300; Schiffer, *Best Pract Res Clin Hematol* 2007;20:49-55).

Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos. Esta solicitud aborda esta necesidad y otras.

RESUMEN

La presente solicitud proporciona métodos para tratar un síndrome mielodisplásico (MDS) en un paciente con necesidad de este; el método comprende administrar a ese paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de la JAK1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

La presente solicitud proporciona, además, un inhibidor selectivo de la JAK1 para tratar un síndrome mielodisplásico en un paciente que tiene necesidad de este.

La presente solicitud proporciona, además, el uso de un inhibidor selectivo de la JAK1 para elaborar un medicamento para usar en el tratamiento de un síndrome mielodisplásico en un paciente que tiene necesidad de este.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los métodos descritos en la presente descripción usan inhibidores selectivos de la JAK1. Un inhibidor selectivo de la JAK1 es un compuesto que inhibe la actividad de la JAK1, preferentemente, sobre otras quinasas Janus. La JAK1 desempeña un papel central en una serie de vías de señalización de citocinas y factores de crecimiento que, cuando se desregulan, pueden dar lugar, o contribuir, a estados patológicos. Por ejemplo, los niveles de IL-6 son elevados en la artritis reumatoide, una enfermedad en la que se ha sugerido que tiene efectos perjudiciales (Fonesca, et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). Dado que la IL-6 se señala, al menos en parte, a través de la JAK1, se espera que el hecho de antagonizar directamente o indirectamente la IL-6 por medio de la inhibición de la JAK1 proporcione un beneficio clínico (Guschin, et al *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, et al. *Lancet* 371:987, 2008). Además, en algunos tipos de cáncer la JAK1 está mutada, lo que da lugar al crecimiento y la supervivencia constitutivos indeseables de células tumorales (Mullighan, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:9414-8, 2009; Flex, *J Exp Med.* 205:751-8, 2008). En otras enfermedades autoinmunes y tipos de cáncer, los niveles sistémicos elevados de citocinas inflamatorias que activan la JAK1 pueden contribuir, además, a la enfermedad y/o síntomas asociados. Por lo tanto, los pacientes con esas enfermedades pueden beneficiarse

de la inhibición de la JAK1. Los inhibidores selectivos de la JAK1 pueden ser eficaces y, al mismo tiempo, evitar los efectos innecesarios y potencialmente indeseables de la inhibición de otras quinasas JAK.

Los inhibidores selectivos de la JAK1, con respecto a otras quinasas JAK, pueden tener múltiples ventajas terapéuticas sobre otros inhibidores menos selectivos. Con respecto a la selectividad frente a la JAK2, una serie de citocinas y factores de crecimiento importantes, que incluyen, por ejemplo, la eritropoyetina (Epo) y la trombopoyetina (Tpo), señalizan a través de la JAK2 (Parganas, et al. *Cell*. 93:385-95, 1998). La Epo es un factor de crecimiento clave para la producción de glóbulos rojos; por lo tanto, una escasez de la señalización dependiente de la Epo puede dar lugar a un número reducido de glóbulos rojos y a la anemia (Kaushansky, *NEJM* 354:2034-45, 2006). La Tpo, otro ejemplo de un factor de crecimiento dependiente de la JAK2, desempeña un papel central en el control de la proliferación y maduración de los megacariocitos, las células de las cuales se producen las plaquetas (Kaushansky, *NEJM* 354:2034-45, 2006). La señalización reducida de la Tpo disminuiría el número de megacariocitos (megacariocitopenia) y bajaría los recuentos de plaquetas circulantes (trombocitopenia). Esto puede dar lugar a hemorragia indeseable y/o incontrolable. La inhibición reducida de otras JAK, tales como JAK3 y Tyk2, puede ser, además, deseable, ya que se ha demostrado que los humanos que carecen de la versión funcional de estas quinasas sufren de numerosas enfermedades, tales como inmunodeficiencia combinada grave o síndrome de hiperinmunoglobulina E (Minegishi, et al. *Immunity* 25:745-55, 2006; Macchi, et al. *Nature*, 377:65-8, 1995). Por lo tanto, un inhibidor de la JAK1 con afinidad reducida para otras JAK tendría ventajas significativas sobre un inhibidor menos selectivo con respecto a efectos secundarios reducidos relacionados con supresión inmune, anemia y trombocitopenia.

Las citocinas inflamatorias desempeñan un papel importante en la patogénesis del MDS, lo que da lugar a citopenias y hematopoyesis displásica. Se postula que si se refrena la actividad de estas citocinas inflamatorias, se promoverá la hematopoyesis normal y se aliviará a los precursores medulares de la apoptosis prematura. Las citocinas inflamatorias median los efectos corriente abajo por activación de las JAK, que involucra la yuxtaposición de JAK procedentes de la dimerización de receptores mediada por ligandos y la trans/autofosforilación. Los heterodímeros JAK obtenidos, que comprenden JAK1 y JAK2 o JAK1 y JAK3, transducen señales y median respuestas celulares de estas citocinas. Además, los homodímeros JAK, compuestos de JAK2 solamente, transducen señales de factores de crecimiento de la médula ósea, tales como EPO, que es responsable de estimular la eritropoyesis, y TPO, que es responsable de estimular la trombopoyesis. Por lo tanto, un inhibidor selectivo de la JAK1 daría lugar a la

supresión de la señalización de citocinas inflamatorias, sin inhibir la eritropoyesis y trombopoyesis mediada por JAK2, lo que daría como resultado el restablecimiento de la hematopoyesis normal y el alivio de citopenias mieloides.

A pesar de los avances científicos en el conocimiento de la fisiopatología de los MDS, hay pocas opciones terapéuticas disponibles y son, principalmente, de tipo paliativo, especialmente cuando los pacientes afectados no son candidatos al HSCT. Una serie de estudios han indicado que el MDS es una enfermedad clonal, y mostraron que el clon expandido fue el resultado de la proliferación excesiva de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea. Se investigó la paradoja de un estado hiperproliferativo en la médula ósea que conduce a citopenias periféricas y se reveló que había una cantidad excesiva de muerte celular programada a nivel intramedular o apoptosis de células hematopoyéticas. Esta apoptosis se observó en pacientes con todas las categorías FAB, pero disminuyó en pacientes con mayores recuentos de blastos. Al parecer, una población clonal se convirtió progresivamente en resistente a la apoptosis y ganó una ventaja proliferativa sobre los precursores hematopoyéticos normales que condujo al aumento en el recuento de blastos y la evolución de la AML. Además, se hizo evidente que la apoptosis excesiva fue mediada en gran medida por una serie de citocinas proinflamatorias que se sobreexpresan en las médulas de pacientes con MDS. Las citocinas que han sido implicadas en la patobiología del MDS incluyen: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón-gamma (IFN γ) e IL 1 β . Se ha observado alta concentración plasmática de TNF- α , una citocina proapoptótica clásica, en la sangre periférica y la médula ósea de pacientes con MDS, y se ha observado una mayor expresión de receptores del TNF y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en células mononucleares de médula ósea derivadas de pacientes con MDS. De manera similar, se ha encontrado una mayor cantidad de IFN γ e IL 1 β en células mononucleares de médula ósea y se ha implicado a la IL-1 β en la evolución a la AML derivada del MDS. La IL-1 β tiene efectos reguladores variables en las células hematopoyéticas, ya que estimula la GM-CSF e IL-3, mientras que en mayores concentraciones, como se observa en estados inflamatorios, conduce a la supresión de la hematopoyesis por la inducción del TNF α y la prostaglandina E2, en donde esta última es un potente supresor de la proliferación de células madre mieloides. Además, se han observado niveles altos de IL-6, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de hepatocitos y factor β de crecimiento transformante en células mieloides de pacientes con MDS. Además, las mismas citocinas que inhiben la proliferación y maduración hematopoyéticas normales no pueden ejercer este efecto proapoptótico en el clon anormal en evolución que

origina la proliferación selectiva de estas células anormales. Hay evidencia de que la fuente de estas citocinas proinflamatorias es el microambiente alterado de la médula ósea que nutre, normalmente, las células hematopoyéticas normales para proliferar y diferenciarse y, además, puede ser la razón de la infiltración de células reguladoras inmunes y la angiogénesis que contribuye a la patobiología del MDS (Raza, et al., *Blood* 1995;86:268-276; Raza, et al, *Int J Hematol* 1996a;63:265-278; Raza, et al., *Leuk Res* 1996b;20:881-890; Mundle, et al. *Am J Hematol* 1999;60:36-47; Claessens, et al., *Blood* 2002;99:1594-1601).

El concepto de que el estado proinflamatorio mediado por citocinas es responsable de la etiología del MDS ha conducido al método novedoso de la terapia anticitocina para mejorar las citopenias en el MDS al proteger de la apoptosis prematura a las células hematopoyéticas en diferenciación. Se ha demostrado que los agentes anti-TNF- α como talidomida y su análogo lenalidomida, infliximab y etanercept han sido eficaces en la mejora de citopenias en pacientes con MDS (NCCN 2012 (*supra*), Larson 2006 (*supra*), Schiffer 2007(*supra*)). En un estudio de 14 pacientes con MDS, el etanercept mostró una mejora hematológica eritroide en el 25 % de los pacientes, junto con una mejora en el recuento de plaquetas y ANC en el 12.5 % de los pacientes evaluables. Además, la combinación de etanercept intermitente con ATG dio como resultado una mayor mejora hematológica eritroide, y 5 de los 14 pacientes con MDS que requerían transfusión se convirtieron en independientes de la transfusión de RBC y plaquetas por más de 2 años. En un estudio de investigación de la talidomida en el MDS, de los 83 pacientes incluidos, 51 completaron 12 semanas de tratamiento y 16 pacientes mostraron una mejora hematológica, en donde 10 pacientes previamente dependientes de transfusiones se convirtieron en independientes de transfusiones, y la mayoría de los que respondieron eran de categoría de riesgo bajo o riesgo intermedio 1 de IPSS (NCCN 2012 (*supra*)). Además, los pacientes de la categoría de riesgo alto, especialmente con un alto porcentaje de blastos, tuvieron tendencia a interrumpir tempranamente el tratamiento. Otro método para refrenar los efectos de las citocinas proinflamatorias es inhibir sus respuestas celulares. Una cantidad considerable de receptores de citocinas y factores de crecimiento usan la familia JAK de TYK no receptoras para transmitir la unión a ligandos extracelulares en una respuesta celular por medio de la señalización del factor de transcripción STAT.

Hay 4 miembros de JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Las JAK se asocian constitutivamente con receptores de citocinas y factores de crecimiento, y se han activado como consecuencia inmediata de la dimerización de receptores inducida por ligandos. La activación de las JAK se produce tras la yuxtaposición posterior de las JAK y la trans/autofosforilación de tirosinas conservadas que se

encuentran en el lazo de activación del dominio catalítico de la JAK. Tras la fosforilación de estas tirosinas, las JAK entran en un estado de alta actividad y son capaces de fosforilar residuos tirosina específicos en los receptores de citocinas, que sirven como sitios de acoplamiento molecular para múltiples proteínas, que incluyen las proteínas STAT. Las JAK son la familia principal de quinasas asociadas con la activación de STAT. Las STAT activadas se translocan al núcleo, en donde funcionan como factores de transcripción y dirigen la expresión de múltiples genes importantes para la activación, localización, supervivencia y proliferación celular.

El ruxolitinib, un inhibidor de JAK1 y JAK2 ha demostrado una marcada reducción en el tamaño del bazo en pacientes con mielofibrosis, así como una mejora de los síntomas. Estas mejoras fueron evidentes en sujetos con y sin presencia de la mutación V617F en JAK2 y, probablemente, están relacionadas con la inhibición de citocinas proinflamatorias. Los principales eventos adversos (AE, por sus siglas en inglés) observados con ruxolitinib son la trombocitopenia y la anemia; ambas fueron, con poca frecuencia, la causa de la interrupción de un estudio doble ciego de Fase 3 controlado con placebo, y ambas se deben, al menos en parte, a la mielosupresión mediada por la JAK2. Por lo tanto, se postula que la inhibición selectiva de la JAK1 ejercería el efecto saludable de inhibir citocinas proinflamatorias en pacientes con MDS y corregiría las citopenias derivadas de la apoptosis prematura de los precursores hematopoyéticos. Además, la conservación de la actividad de la JAK2 permitiría la actividad fisiológica de citocinas hematopoyéticas, es decir, EPO y TPO, para permitir la proliferación y diferenciación fisiológica de las células hematopoyéticas normales.

Además, en pacientes con MDS se produce, frecuentemente, una sobrecarga de hierro, y datos recientes sugieren un impacto tanto en la supervivencia general como en el estado libre de leucemia. Se ha postulado que una producción alterada de hepcidina, la hormona clave descubierta recientemente que regula la homeostasis del hierro, puede desempeñar un papel en este sentido y puede ser regulada por citocinas inflamatorias como la IL-6. Recientemente se ha demostrado en el MDS que tanto la hepcidina como la CRP, como marcadores de la inflamación general, son elevadas. Santini, et al., *PLoS One*, 6(8), e23109, págs. 1-8 (2011). Estos datos sugieren que la inhibición de la JAK, que puede reducir los niveles de CRP y hepcidina, puede revertir la inflamación y la sobrecarga de hierro que se produce en el MDS.

En consecuencia, la presente solicitud proporciona, entre otras cosas, un método para tratar un síndrome mielodisplásico en un paciente que tiene necesidad de este; el método comprende administrar a ese paciente una

cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de la JAK1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Como se usa en la presente invención, un síndrome mielodisplásico se refiere a la clasificación de MDS propuesta por la Organización Mundial de la Salud en 2008 (ver, por ejemplo, la Tabla 1). Particularmente, en 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con la Society for Hematopathology (SH) y la European Association of Hematopathology (EAHP) propusieron nuevas clasificaciones para las neoplasias hematopoyéticas (Harris, et al., *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849; Vardiman, et al., *Blood* 2002;100:2292-2302). Para el MDS, la OMS usó no solo los criterios morfológicos de la clasificación francesa-estadounidense-británica (FAB, por sus siglas en inglés), sino, además, incorporó características genéticas, biológicas y clínicas disponibles para definir subconjuntos de MDS ((Bennett, et al., *Br J Haematol* 1982;51:189-199). En 2008, la clasificación de la OMS del MDS (Tabla 1) se perfeccionó para permitir una subclasificación precisa y relevante del pronóstico de displasia unilínaje mediante la incorporación de nueva información clínica y científica (Vardiman, et al., *Blood* 2009;114:937-951; Swerdlow, et al., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4.0 edición. Lyon Francia: IARC Press; 2008:88-103; Bunning y Germing, “Myelodysplastic syndromes/neoplasms” en Capítulo 5, Swerdlow, et al., eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (ed. 4.0 edición): Lyon, Francia: IARC Press;2008:88-103).

Tabla 1 Clasificación de la OMS de 2008 para el síndrome mielodisplásico de novo

Subtipo	Sangre	Médula ósea
Citopenia refractaria con displasia unilínaje (RCUD, por sus siglas en inglés)	Uni o bicitopenia	Displasia en ≥ 10 % de 1 línea celular, < 5 % de blastos
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS, por sus siglas en inglés)	Anemia, sin blastos	≥ 15 % de precursores eritroides c/sideroblastos en anillo, displasia eritroide solamente, < 5 % de blastos
Citopenia refractaria con displasia multilínaje	Citopenia(s), < 1 × 10 ⁹ /L de monocitos	Displasia en ≥ 10 % de células en ≥ 2 linajes hematopoyéticos, ± 15 % de

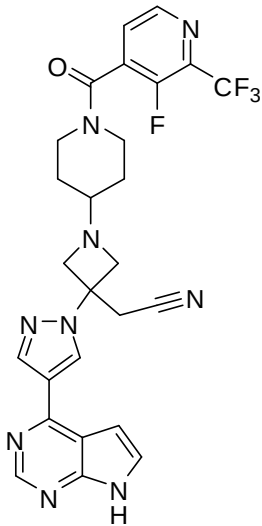
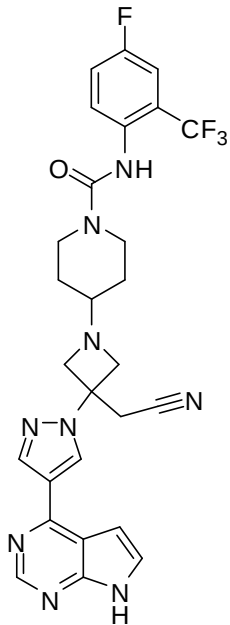
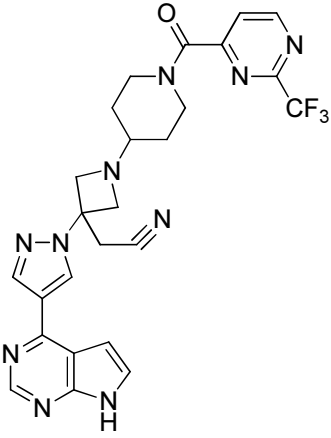
Subtipo	Sangre	Médula ósea
		sideroblastos en anillo, < 5 % de blastos
Anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1, por sus siglas en inglés)	Citopenia(s), ≤ 2 % a 4 % de blastos, < 1 × 10 ⁹ /L de monocitos	Displasia unilinaje o multilinaje, sin bastones de Auer, 5 % a 9 % de blastos
Anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2, por sus siglas en inglés)	Citopenia(s), ≤ 5 % a 19 % de blastos, < 1 × 10 ⁹ /L de monocitos	Displasia unilinaje o multilinaje, ± bastones de Auer, 10 % a 19 % de blastos
Síndrome mielodisplásico, sin clasificar (MDS-U, por sus siglas en inglés)	Citopenias	Displasia unilinaje o nula, pero citogenética característica de MDS, < 5 % de blastos
MDS asociado con del(5q) aislada	Anemia, plaquetas normales o incrementadas	Eritroide unilinaje. del(5q) aislada, < 5 % de blastos

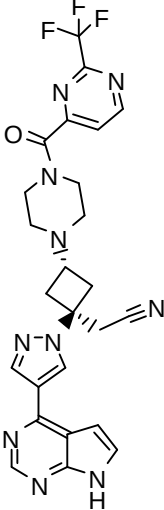
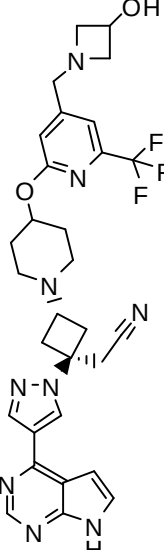
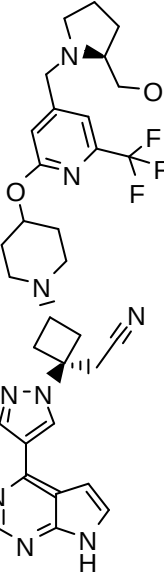
En algunas modalidades, el inhibidor selectivo de la JAK1 es selectivo para JAK1 sobre JAK2, JAK3 y TYK2. Por ejemplo, los compuestos descritos en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, inhiben, preferentemente, la JAK1 sobre una o más de JAK2, JAK3 y TYK2. En algunas modalidades, los compuestos inhiben la JAK1 sobre, preferentemente, JAK2 (por ejemplo, tienen una relación $CI_{50} \text{ JAK1/JAK2} > 1$). En algunas modalidades, los compuestos o sales son aproximadamente 10 veces más selectivos para JAK1 sobre JAK2. En algunas modalidades, los compuestos o sales son aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces o aproximadamente 20 veces más selectivos para JAK1 sobre JAK2, calculado mediante la medición de CI_{50} en 1 mM de ATP (por ejemplo, ver Ejemplo A).

En algunas modalidades, el inhibidor selectivo de la JAK1 es un compuesto de la Tabla 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Tabla 2

Prep. en el Ej. núm.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
1 ^a	3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo		+	>10
2	3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo		+	>10
3	4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo		+	>10
4	4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo		+	>10

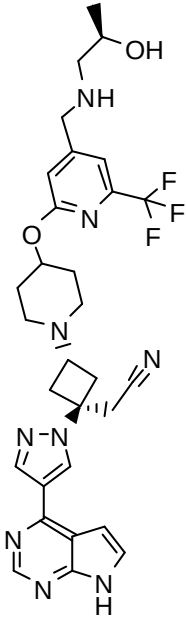
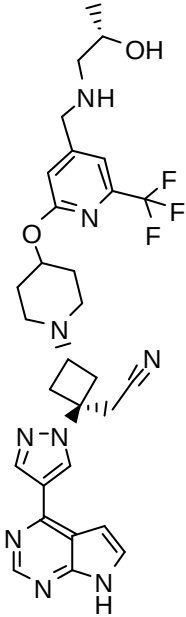
Prep. en el Ej. n�m.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
5	{1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotin oil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonnitrilo		+	>10
6	4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]pipe ridin-1-carboxamida		+	>10
7	[3-[4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]-1-(1-{[2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]carbonil}piperidin-4-il)azetidin-3-il]acetonnitrilo		+	>10

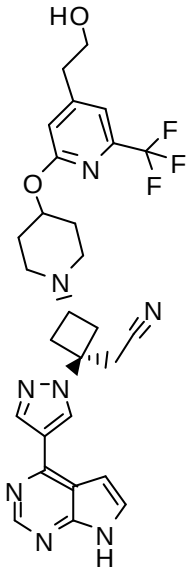
Prep. en el Ej. núm.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
8	[<i>trans</i> -1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]-3-(4-{[2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]carbonil}piperazin-1-il)ciclobutil]acetonitrilo		+	>10
9	{ <i>trans</i> -3-(4-{[4-[(3-hidroxiazetidin-1-il)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10
10	{ <i>trans</i> -3-(4-{[4-[[[(2S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10

Prep. en el Ej. núm.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
11	{ <i>trans</i> -3-(4-{[4-{[(2R)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10
12 ^b	4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo		+	>10
13	5-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carboxamida		+	>10
14	4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida		+	>10

Prep. en el Ej. n��m.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
15	5-{3-(cianometil)-3-[4-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carboxamida		+	>10
16	{1-(cis-4-[[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetitrilo		+	>10
17	{1-(cis-4-[[4-[(etilamino)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetitrilo		+	>10
18	{1-(cis-4-[[4-(1-hidroxil-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetitrilo		+	>10

Prep. en el Ej. núm.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
19	{1-(<i>cis</i> -4-{[4-{[(3R)-3-hidroxi- <i>pirrolidin</i> -1-il]metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo		+	>10
20	{1-(<i>cis</i> -4-{[4-{[(3S)-3-hidroxi- <i>pirrolidin</i> -1-il]metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo		+	>10
21	{ <i>trans</i> -3-(4-{[4-({[(1S)-2-hidroxi-1-metiletil]amino}metil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10

Prep. en el Ej. n�m.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
22	{ <i>trans</i> -3-(4-{[4-({[(2R)-2-hidroxipropil]amino}metil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol[2,3-d]imidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10
23	{ <i>trans</i> -3-(4-{[4-({[(2S)-2-hidroxipropil]amino}metil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol[2,3-d]imidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10

Prep. en el Ej. núm.	Nombre	Estructura	JAK1 Cl ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
24	{trans-3-(4-[[4-(2-hidroxi- etil)-6-(trifluorometil)piridin-2- il]oxi]piperidin-1-il)-1- [4-(7H-pirrolo[2,3- d]pirimidin-4-il)-1H- pirazol-1- il]ciclobutil}acetonitrilo		+	>10

- + significa <10 nM (ver condiciones de ensayo en el Ejemplo A)
- a Datos para el enantiómero 1
- b Datos para el enantiómero 2

En algunas modalidades, el inhibidor selectivo de la JAK1 es la sal de ácido {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetid-3-il}acetonitrilo ad pico.

En algunas modalidades, el inhibidor selectivo de la JAK1 se selecciona de (R)-3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (R)-3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (R)-4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo, (R)-4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo o (R)-4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo; o una sal farmac ticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, el inhibidor selectivo de la JAK1 se selecciona de (S)-3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (S)-3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (S)-4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo o (S)-4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo; o una sal farmac ticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo, (S)-4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo o (S)-4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, el inhibidor selectivo de la JAK1 es GLPG0634 (Galapagos).

En algunas modalidades, los compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante los procedimientos sintéticos descritos en la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2010/0298334, presentada el 21 de mayo de 2010, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2011/0059951, presentada el 31 de agosto de 2010, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2011/0224190, presentada el 9 de marzo de 2011, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681, presentada el 18 de noviembre de 2011, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2012/0149682, presentada el 18 de noviembre de 2011, publicación de patente de los EE. UU. 2013/0018034, presentada el 19 de junio de 2012, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2013/0045963, presentada el 17 de agosto de 2012 y publicación de patente de los EE. UU. núm. 2014/0005166, presentada el 17 de mayo de 2013, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, el inhibidor de la JAK1 se selecciona de los compuestos de la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2010/0298334, presentada el 21 de mayo de 2010, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2011/0059951, presentada el 31 de agosto de 2010, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2011/0224190, presentada el 9 de marzo de 2011, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681, presentada el 18 de noviembre de 2011, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2012/0149682, presentada el 18 de noviembre de 2011, publicación de patente de los EE. UU. 2013/0018034, presentada el 19 de junio de 2012, publicación de patente de los EE. UU. núm. 2013/0045963, presentada el 17 de agosto de 2012 y publicación de patente de los EE. UU. núm. 2014/0005166, presentada el 17 de mayo de 2013, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es citopenia refractaria con displasia unilínaje (RCUD).

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS).

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es citopenia refractaria con displasia multilineaje.

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1).

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2).

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es síndrome mielodisplásico, sin clasificar (MDS-U).

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es síndrome mielodisplásico asociado con del (5q) aislada.

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es refractario a agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA). En algunas modalidades, refractario a los ESA significa sin mejora en la Hgb de al menos 1.5 g/dL después de 8 semanas de al menos 40,000 UI/semana de eritropoyetina (EPO) (o equivalente).

En algunas modalidades, el paciente es dependiente de la transfusión de glóbulos rojos (RBC). En algunas modalidades, dependiente de la transfusión de glóbulos rojos significa que el paciente requiere al menos 4 unidades de RBC empaquetados para una Hgb de < 9 g/dL durante las 8 semanas previas al tratamiento.

En algunas modalidades, el paciente tiene niveles elevados de hepcidina sérica en comparación con un grupo control de individuos sanos. En algunas modalidades, el paciente tiene una concentración sérica elevada de proteína C reactiva (CRP) en comparación con un grupo control de individuos sanos. En algunas modalidades, una concentración sérica elevada de CRP es una que es igual o mayor que aproximadamente 10 µg/mL. En algunas modalidades, los individuos sanos son como se define en Santini, et al., *PLoS One*, 6(8), e23109, págs. 1-8 (2011), que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, el paciente tiene una puntuación pronóstica de Glasgow modificada de 1 o 2. La puntuación pronóstica de Glasgow modificada (GPS, por sus siglas en inglés) se describe en McMillian, *Cancer Treatment Reviews*, 39 (5):534-540 (2013), que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia (y, particularmente, en las puntuaciones que se muestran en la Tabla 1).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en cualquiera de las modalidades en la presente descripción, para usar en un método para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en la presente descripción. En algunas

modalidades, la presente invención proporciona el uso de un compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en cualquiera de las modalidades en la presente descripción, para preparar un medicamento para usar en un método para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en la presente descripción.

Los inhibidores selectivos de la JAK1 incluyen, además, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en donde el compuesto raíz se modifica mediante la conversión de una porción ácida o básica existentes a su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos o minerales de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y lo similar. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas del compuesto raíz formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir del compuesto raíz que contiene una porción básica o ácida mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, esas sales pueden prepararse por reacción de las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido adecuados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol o butanol) o acetonitrilo (ACN). Puede consultarse listas de sales adecuadas en *Pharmaceutical Sciences*, de Remington, 17.ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977), cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente invención incluyen las formas de N-óxido.

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden ser asimétricos (por ejemplo, con uno o más estereocentros). A menos que se indique de cualquier otra manera, se incluyen todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros. Los compuestos descritos en la presente descripción que contienen átomos de carbono sustituidos de manera asimétrica pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Los métodos para preparar formas ópticamente activas a partir de materias primas ópticamente inactivas son conocidos en la materia, tales como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva. En los compuestos descritos en la presente descripción pueden estar presentes, además, muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles C=N y lo similar, y todos estos isómeros estables quedan contemplados en la presente

invención. Se describen isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isómeras separadas.

La resolución de mezclas racémicas de compuestos puede realizarse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la materia. Un método ilustrativo incluye la recrystalización fraccionada con el uso de un ácido de resolución quiral, que es un ácido orgánico ópticamente activo capaz de formar sales. Los agentes de resolución adecuados para los métodos de recrystalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L del ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canforsulfónicos ópticamente activos, tales como el ácido β -canforsulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de cristalización fraccionada incluyen formas estereoisómeras puras de α -metilbencilamina (por ejemplo, las formas S y R, o formas diastereómeras puras), 2-fenilglicinol, norefedrina, efedrina, N-metilefedrina, ciclohexiletilamina, 1,2-diaminociclohexano y lo similar.

La resolución de mezclas racémicas puede realizarse, además, por elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la materia puede determinar la composición adecuada del disolvente de elución.

Los compuestos descritos en la presente descripción incluyen, además, formas tautómeras. Las formas tautómeras provienen del intercambio de un enlace simple con un enlace doble adyacente, junto con la migración concomitante de un protón. Las formas tautómeras incluyen tautómeros prototrópicos, que son estados de protonación isómera que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Los tautómeros prototrópicos ilustrativos incluyen pares cetona – enol, pares amida – ácido imídico, pares lactama – lactima, pares enamina – imina y formas de anillo, en donde un protón puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, por ejemplo, 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H-1,2,4-triazol, 1H- y 2H-isoindol, y 1H- y 2H-pirazol. Las formas tautómeras pueden estar en equilibrio o estéricamente bloqueadas en una forma mediante sustitución apropiada.

Los compuestos de la invención pueden incluir, además, todos los isótopos de átomos que aparecen en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico, pero diferentes números másicos. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio.

El término “compuesto”, como se usa en la presente descripción, incluye todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de

las estructuras representadas. Además, los compuestos de la presente descripción identificados por nombre o estructura como una forma tautómera particular incluyen otras formas tautómeras, a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Todos los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, pueden encontrarse junto con otras sustancias, tales como agua y disolventes (por ejemplo, hidratos y solvatos) o pueden ser aislados.

En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente descripción, o sales de estos, son sustancialmente aislados. Por “sustancialmente aislado” se entiende que el compuesto está al menos parcialmente o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en los compuestos de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % en peso de los compuestos de la invención, o sales de estos. Los métodos para aislar los compuestos y sus sales son rutinarios en la materia.

Como se usa en la presente descripción, los términos “individuo” o “paciente”, que se usan indistintamente, se refieren a cualquier animal, que incluye mamíferos, preferentemente, ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates y, con mayor preferencia, humanos.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal, individuo o humano, que busca un investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico. En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1000 mg o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg. En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz es 4 mg, 6 mg o 10 mg QD.

En la presente descripción, la frase “farmacéuticamente aceptable” se usa para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para usar en contacto con tejidos de seres humanos y animales sin exceso de toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en la presente descripción, el término “tratar” o “tratamiento” se refiere a uno o más de (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, estado o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, estado o trastorno, pero que aún no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, estado o trastorno en un individuo que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad, estado o trastorno (es decir, detener el desarrollo de la patología y/o sintomatología); y (3) corregir la enfermedad; por ejemplo, corregir una enfermedad, estado o trastorno en un individuo que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad, estado o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología), tal como disminuir la gravedad de la enfermedad.

Terapias de combinación

Los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender, además, administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse a un paciente simultáneamente o secuencialmente.

En algunas modalidades, el método comprende, además, administrar un agente terapéutico adicional seleccionado de IMiD, un agente anti-IL-6, un agente anti-TNF- α , un agente hipometilante y un modificador de la respuesta biológica (BRM, por sus siglas en inglés).

Generalmente, un BRM es una sustancia para tratar enfermedades que se prepara a partir de organismos vivos, que pueden ser de origen natural en el cuerpo o pueden prepararse en el laboratorio. Los ejemplos de BRM incluyen IL-2, interferón, diversos tipos de factores estimulantes de colonias (CSF, GM-CSF, G-CSF), anticuerpos monoclonales tales como abciximab, etanercept, infliximab, rituximab, trastuzumab y ascorbato de dosis alta.

En algunas modalidades, el agente anti-TNF- α es infliximab y etanercept.

En algunas modalidades, el agente hipometilante es un inhibidor de la ADN metiltransferasa. En algunas modalidades, el inhibidor de ADN metiltransferasa se selecciona de 5 azacitidina y decitabina.

Generalmente, los IMiD son como agentes inmunomoduladores. En algunas modalidades, los IMiD se seleccionan de talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-11006 y CC-10015.

En algunas modalidades, el método comprende, además, administrar un agente terapéutico adicional seleccionado de globulina antitimocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos, humano y recombinante (G-CSF), CSF de

granulocitos y monocitos (GM-CSF), un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) y ciclosporina.

En algunas modalidades, el método comprende, además, administrar otro inhibidor de la JAK al paciente. En algunas modalidades, el otro inhibidor de la JAK es tofacitinib o ruxolitinib.

Uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden incluir agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, así como Bcr-Abl, Flt-3, inhibidores de quinasas RAF y FAK tales como, por ejemplo, los descritos en la patente núm. WO 2006/056399, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia, o pueden usarse otros agentes en combinación con los compuestos descritos en la presente descripción.

Los quimioterapéuticos ilustrativos incluyen inhibidores de proteosomas (por ejemplo, bortezomib), talidomida, revlimid y agentes de daño al ADN, tales como melfalán, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, etopósido, carmustina y lo similar.

Los esteroides ilustrativos incluyen corticoesteroides, tales como dexametasona o prednisona.

Los inhibidores de Bcr-Abl ilustrativos incluyen los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, de los géneros y especies descritos en la patente de los EE. UU. núm. 5,521,184, la patente núm. WO 04/005281 y la patente de los EE. UU. con núm. de serie 60/578,491, todas las cuales se incorporan en la presente descripción como referencia.

Los inhibidores de Flt-3 adecuados e ilustrativos incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como los que se describen en las patentes núm. WO 03/037347, WO 03/099771 y WO 04/046120, todas las cuales se incorporan en la presente descripción como referencia.

Los inhibidores de RAF adecuados e ilustrativos incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como los que se describen en las patentes núm. WO 00/09495 y WO 05/028444, ambas incorporadas en la presente descripción como referencia.

Los inhibidores de FAK adecuados e ilustrativos incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como los que se describen en las patentes núm. WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 y WO 01/014402, todas las cuales se incorporan en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, puede usarse uno o más de los compuestos de la invención en combinación con uno o más de otros inhibidores

de quinasas, que incluyen imatinib, particularmente para tratar pacientes resistentes a imatinib u otros inhibidores de quinasas.

En algunas modalidades, un agente quimioterapéutico adecuado puede seleccionarse de agentes antimetabolito, inhibidores de la topoisomerasa 1, análogos de platino, taxanos, antraciclinas e inhibidores del EGFR, y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, los agentes antimetabolito incluyen capecitabina, gemcitabina y fluorouracilo (5-FU).

En algunas modalidades, los taxanos incluyen paclitaxel, Abraxane® (partículas de paclitaxel unidas a proteínas para suspensión inyectable) y Taxotere® (docetaxel).

En algunas modalidades, los análogos de platino incluyen oxaliplatino, cisplatino y carboplatino.

En algunas modalidades, los inhibidores de la topoisomerasa 1 incluyen irinotecán y topotecán.

En algunas modalidades, las antraciclinas incluyen doxorrubicina o formulaciones liposomales de doxorrubicina.

En algunas modalidades, el quimioterapéutico es FOLFIRINOX (5-FU, lecovorina, irinotecán y oxaliplatino). En algunas modalidades, el agente quimioterapéutico es gemcitabina y Abraxane® (partículas de paclitaxel unidas a proteínas para suspensión inyectable).

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es melfalán, melfalán más prednisona [MP], doxorrubicina, dexametasona y Velcade (bortezomib). Otros agentes adicionales usados en el tratamiento del mieloma múltiple incluyen los inhibidores de quinasas Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK. Los agentes pueden combinarse con los compuestos de la presente descripción en una forma de dosificación única o continua, o los agentes pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente como formas de dosificación separadas.

En algunas modalidades, se administra a un paciente un corticosteroide tal como dexametasona en combinación con al menos un inhibidor selectivo de la JAK1, en donde la dexametasona se administra de manera intermitente en lugar de continua.

En algunas modalidades adicionales, pueden administrarse combinaciones de uno o más inhibidores selectivos de la JAK1 con otros agentes terapéuticos a un paciente antes de, durante y/o después de un trasplante de médula ósea o trasplante de células madre.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es acetónido de fluocinolona (Retisert®) o rimexolona (AL-2178, Vexol, Alcon).

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es ciclosporina (Restasis®).

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un corticoesteroide. En algunas modalidades, el corticoesteroide es triamcinolona, dexametasona, fluocinolona, cortisona, prednisolona o flumetolona.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se selecciona de Dehydrex™ (Holles Labs), Civamida (Opko), hialuronato de sodio (Vismed, Lantibio/TRB Chemedica), ciclosporina (ST-603, Sirion Therapeutics), ARG101 (T) (testosterona, Argentis), AGR1012 (P) (Argentis), ecabet sódico (Senju-Ista), gefarnato (Santen), ácido 15-(S) -hidroxieicosatetraenoico (15(S)-HETE), cevilemina, doxiciclina (ALTY-0501, Alacrity), minociclina, iDestrin™ (NP50301, Nascent Pharmaceuticals), ciclosporina A (Nova22007, Novagali), oxitetraciclina (Duramicina, MOLI1901, Lantibio), CF101 (2S,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-[6-[(3-iodofenil) metilamin]purin-9-il] -N-metil-2-oxolano-carbamilo, Can-Fite Biopharma), voclosporin (LX212 o LX214, Lux Biosciences), ARG103 (Agentis), RX-10045 (análogo sintético de la resolvina, Resolvix), DYN15 (Dyanmis Therapeutics), rivoglitazona (DE011, Daiichi Sanko), TB4 (RegeneRx), OPH-01 (Opthalmis Monaco), PCS101 (Pericor Science), REV1-31 (Evolutec), Lacritin (Senju), rebamipida (Otsuka-Novartis), OT-551 (Othera), PAI-2 (Universidad de Pennsylvania y Universidad de Temple), pilocarpina, tacrolimus, pimecrolimus (AMS981, Novartis), etabonato de loteprednol, rituximab, diquafosol tetrasódico (INS365, Inspire), KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals), dehidroepiandrosterona, anakinra, efalizumab, micofenolato sódico, etanercept (Embrelex®), hidroxicloroquina, NGX267 (TorreyPines Therapeutics), actemra, gemcitabina, oxaliplatino, L-asparaginasa o talidomida.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente antiangiogénico, agonista colinérgico, modulador del receptor TRP-1, un bloqueador de canales de calcio, un secretagogo de mucina, estimulante de MUC1, un inhibidor de calcineurina, un corticosteroide, un agonista del receptor P2Y2, un agonista del receptor muscarínico, un inhibidor de mTOR, otro inhibidor de la JAK, inhibidor de quinasas Bcr-Abl, inhibidor de quinasas Flt-3, inhibidor de quinasas RAF e inhibidor de quinasas FAK, tales como, por ejemplo, los descritos en la patente núm. WO 2006/056399, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un derivado de tetraciclina (por ejemplo, minociclina o doxiciclina). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se une a FKBP12.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente alquilante o agente de reticulación de ADN; un agente antimetabolito/demetilante

(por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina o azacitidina); una terapia antihormonal (por ejemplo, antagonistas de receptores de hormonas, SERM o inhibidores de aromotasa); un inhibidor de la mitosis (por ejemplo, vincristina o paclitaxel); una inhibidor de la topoisomerasa (I o II) (por ejemplo, mitoxantrona y irinotecán); inductores de la apoptosis (por ejemplo, ABT-737); una terapia de ácidos nucleicos (por ejemplo, no codificante o ARNi); ligandos de receptores nucleares (por ejemplo, agonistas y/o antagonistas: ácido todo trans-retinoico o bexaroteno); agentes marcadores epigenéticos, tales como inhibidores de histona deacetilasa (por ejemplo, vorinostat), agentes hipometilantes (por ejemplo, decitabina); reguladores de la estabilidad de proteínas, tales como inhibidores de Hsp90, ubiquitina y/o ubiquitina como moléculas conjugantes o desconjugantes; o un inhibidor del EGFR (erlotinib).

Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación

Cuando se usan como productos farmacéuticos, los inhibidores selectivos de la JAK1 pueden administrarse en la forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden prepararse de maneras muy conocidas en la materia farmacéutica, y pueden administrarse por una variedad de vías que dependen si se desea un tratamiento local o sistémico, así como del área a tratar. La administración puede ser tópica (que incluye transdérmica, epidérmica, oftálmica y a las membranas mucosas, que incluyen administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen mediante nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular intraperitoneal o inyección o infusión; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una sola dosis de bolo, o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y lo similar.

Esta invención incluye, además, composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, el inhibidor selectivo de la JAK1 descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (excipientes). En algunas modalidades, la composición es adecuada para administración tópica. Al preparar las composiciones, el ingrediente activo se mezcla, típicamente, con un excipiente, se diluye mediante un excipiente o se encierra dentro de ese portador en la forma de, por

ejemplo, una cápsula, sobrecito, papel u otro envase. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, sellos, elíxires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos en envase estéril.

Al preparar una formulación, el compuesto activo puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula adecuado antes de combinarlo con los otros ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, puede molerse hasta un tamaño de partícula menor que 200 mesh. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula puede ajustarse por molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, aproximadamente 40 mesh.

Los inhibidores selectivos de la JAK1 pueden molerse con el uso de procedimientos conocidos de molienda, tales como molienda en húmedo, para obtener un tamaño de partícula adecuado para la formación de comprimidos y para otros tipos de formulación. Pueden obtenerse preparaciones finamente divididas (nanoparticulados) de los inhibidores selectivos de la JAK1 mediante procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, ver la solicitud internacional núm. WO 2002/000196.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir, además: agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes, tales como benzoatos de metilo y propilhidroxilo; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones pueden formularse con el uso de procedimientos conocidos en la materia, de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende celulosa microcristalina silicificada (SMCC, por sus siglas en inglés) y al menos un compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, la celulosa microcristalina silicificada comprende

aproximadamente 98 % de celulosa microcristalina y aproximadamente 2 % p/p de dióxido de silicio.

En algunas modalidades, la composición es una composición de liberación sostenida que comprende al menos un inhibidor selectivo de la JAK1 descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un inhibidor selectivo de la JAK1 descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un componente seleccionado de celulosa microcristalina, lactosa monohidratada, hidroxipropilmetilcelulosa y óxido de polietileno. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un inhibidor selectivo de la JAK1 descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y celulosa microcristalina, lactosa monohidratada e hidroxipropilmetilcelulosa. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un inhibidor selectivo de la JAK1 descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y celulosa microcristalina, lactosa monohidratada y óxido de polietileno. En algunas modalidades, la composición comprende, además, estearato de magnesio o dióxido de silicio. En algunas modalidades, la celulosa microcristalina es Avicel PH102™. En algunas modalidades, la lactosa monohidratada es Fast-flo 316™. En algunas modalidades, la hidroxipropilmetilcelulosa es hidroxipropilmetilcelulosa 2208 K4M (por ejemplo, Methocel K4 M Premier™) y/o hidroxipropilmetilcelulosa 2208 K100LV (por ejemplo, Methocel K00LV™). En algunas modalidades, el óxido de polietileno es óxido de polietileno WSR 1105 (por ejemplo, Polyox WSR 1105™).

En algunas modalidades, para producir la composición se usa un proceso de granulación en húmedo. En algunas modalidades, para producir la composición se usa un proceso de granulación en seco.

Las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria, en donde cada dosis contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg (1 g), más usualmente, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, del ingrediente activo. En algunas modalidades, cada dosis contiene aproximadamente 10 mg del ingrediente activo. En algunas modalidades, cada dosis contiene aproximadamente 50 mg del ingrediente activo. En algunas modalidades, cada dosis contiene aproximadamente 25 mg del ingrediente activo. El término “formas de dosificación unitaria” se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

En algunas modalidades, las composiciones contienen de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg del ingrediente activo. Un experto en la materia apreciará que esto incluye compuestos o composiciones que contienen de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 10 mg, de 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 35 mg, de aproximadamente 35 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 45 mg o de aproximadamente 45 mg a aproximadamente 50 mg del ingrediente activo.

En algunas modalidades, las composiciones contienen de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo. Un experto en la materia apreciará que esto comprende compuestos o composiciones que contienen de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 400 mg o de aproximadamente 450 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo.

En algunas modalidades, las composiciones contienen de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo. Un experto en la materia apreciará que esto comprende compuestos o composiciones que contienen de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 550 mg, de 550 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 600 mg a aproximadamente 650 mg, de aproximadamente 650 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 750 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 850 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 900 mg a aproximadamente 950 mg o de aproximadamente 950 mg a aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo.

El compuesto activo puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosificación y se administra, generalmente, en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entiende, sin embargo, que, en realidad, la cantidad de compuesto administrada está determinada, usualmente, por un médico de acuerdo con las circunstancias correspondientes, que incluyen el estado a tratar, la vía de

administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta de cada paciente, la severidad de los síntomas del paciente, y lo similar.

Para preparar composiciones sólidas, tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida, que contiene una mezcla homogénea de un compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Típicamente, cuando estas composiciones de preformulación se denominan homogéneas, el ingrediente activo está disperso uniformemente en toda la composición, de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas, que son igualmente eficaces. Después, esta preformulación sólida se subdivide en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras pueden estar recubiertos o compuestos de cualquier otra manera para proporcionar una forma de dosificación que confiera la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interno y uno de dosificación externo, en donde este último está en forma de envoltura alrededor del primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que resiste la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que su liberación se retrase. Para esas capas o revestimientos entéricos puede usarse una variedad de materiales, que incluyen una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que los compuestos y composiciones pueden incorporarse para la administración por vía oral o inyectable incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elíxires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, o mezclas de estos, y polvos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como los descritos anteriormente. En algunas modalidades, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para obtener un efecto local o sistémico. Las composiciones pueden nebulizarse mediante el uso de gases

inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización, o el dispositivo de nebulización puede acoplarse a una tienda de máscara facial o respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o en polvo pueden administrarse por vía oral o nasal desde dispositivos que suministren la formulación de manera adecuada.

Las formulaciones tópicas pueden contener uno o más portadores convencionales. En algunas modalidades, las pomadas pueden contener agua y uno o más portadores hidrofóbicos seleccionados de, por ejemplo, parafina líquida, alquiléter de polioxietileno, propilenglicol, vaselina blanca y lo similar. Las composiciones de portadores para cremas pueden basarse en agua en combinación con glicerol y uno o más de otros componentes, por ejemplo, monoestearato de glicerina, PEG-monoestearato de glicerina y alcohol cetilestearílico. Los geles pueden formularse con el uso de alcohol isopropílico y agua, adecuadamente en combinación con otros componentes, tales como, por ejemplo, glicerol, hidroxietilcelulosa y lo similar. En algunas modalidades, las formulaciones tópicas contienen al menos aproximadamente 0.1, al menos aproximadamente 0.25, al menos aproximadamente 0.5, al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2 o al menos aproximadamente 5 % en peso del compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable en este. Las formulaciones tópicas pueden envasarse convenientemente en tubos de, por ejemplo, 100 g, que están asociados, opcionalmente, con instrucciones para el tratamiento de la indicación seleccionada, por ejemplo, psoriasis u otra afección de la piel.

La cantidad de compuesto o composición administradas a un paciente variará de acuerdo con lo que se administra, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la manera de administración y lo similar. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las dosis eficaces dependerán del estado de la enfermedad a tratar, así como del criterio del médico a cargo, según factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y estado general del paciente, y lo similar.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en la forma de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales o pueden someterse a filtración estéril. Las soluciones acuosas

pueden envasarse para el uso tal como están, o pueden liofilizarse, en donde la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones del compuesto será, típicamente, entre 3 y 11, con mayor preferencia, entre 5 y 9 y, con la máxima preferencia, entre 7 y 8. Se entiende que el uso de algunos de los excipientes, portadores o estabilizadores anteriores dará lugar a la formación de sales farmacéuticas.

La dosis terapéutica de un inhibidor selectivo de la JAK1 descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede variar de acuerdo con, por ejemplo, el uso particular para el que se realiza el tratamiento, la manera de administración del compuesto, la salud y el estado del paciente, y el criterio del médico prescriptor. La proporción o concentración de un compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en una composición farmacéutica puede variar de acuerdo con una serie de factores, que incluyen dosificación, características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, el inhibidor de la JAK1 puede proporcionarse en una solución reguladora fisiológica acuosa que contiene de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 % p/v del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas modalidades, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. Es probable que la dosis dependa de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente en particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o modelos animales.

Las composiciones de la invención pueden incluir, además, uno o más agentes farmacéuticos adicionales, tales como un agente quimioterapéutico, esteroide, compuesto antiinflamatorio, o inmunosupresor, cuyos ejemplos se mencionaron anteriormente.

Kits

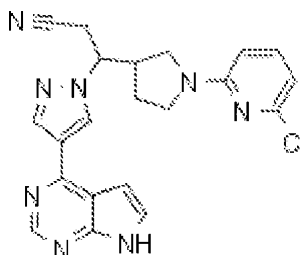
La presente invención incluye, además, kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, para tratar o prevenir un síndrome mielodisplásico; los kits incluyen uno o más envases que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Si se desea, esos kits pueden incluir, además, uno o más de los diversos componentes de kits farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, envases con uno o más

portadores farmacéuticamente aceptables, envases adicionales, etc., como será fácilmente evidente para los expertos en la materia. En el kit pueden incluirse, además, instrucciones, ya sea como insertos o como etiquetas, que indican cantidades de los componentes a administrar, directrices para la administración y/o directrices para mezclar los componentes.

Ejemplos

La invención se describirá en mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los ejemplos siguientes se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de manera alguna. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados. Se ha comprobado que los compuestos de los ejemplos son inhibidores de JAK de acuerdo con al menos un ensayo descrito en la presente descripción.

Ejemplo 1. 3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (se aislaron dos enantiómeros diferentes)



Etapas 1. 3-{2-ciano-1-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]etil}pirrolidina-1-carboxilato de bencilo

El 3-[2-cianovinil]pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (4.3 g, 0.017 mol, mezcla de isómeros *E* y *Z* preparada como se describe en la patente núm. WO 2007/070514 Ej.742) se disolvió en acetonitrilo (270 mL). Se añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (5.02 mL, 0.0336 mol) seguido de 4-(1H-pirazol-4-il)-7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (5.6 g, 0.017 mol, preparada como se describe en la patente núm. WO 2007/070514, Ej. 65). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria y el residuo se volvió a disolver en acetato de etilo. La solución se lavó sucesivamente con HCl 1 N, agua, bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El producto se purificó por

cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice y se eluyó con un gradiente de 0-100 % de acetato de etilo en hexanos para proporcionar el diastereómero 1 (primero en eluir) (3.5 g, 36 %) y el diastereómero 2 (segundo en eluir) (2.5 g, 25 %). LCMS (M+H)⁺: 572.2.

Etapas 2. 3-pirrolidin-3-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo

El 3-{2-ciano-1-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]etil}pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (3.5 g, 6.1 mmol) (diastereómero 1 del Ejemplo 1, Etapa 1) se disolvió en 100 mL de metanol y se añadió una cantidad catalítica de Pd-C al 10 %. La mezcla se agitó bajo 1.0 MPa (50 psi) de hidrógeno durante 24 h. Después, la mezcla se filtró y el disolvente se retiró al vacío. El producto se usó sin purificación adicional. LCMS (M+H)⁺: 438.2.

Etapas 3. 3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo

Una mezcla de 3-pirrolidin-3-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (150 mg, 0.27 mmol) y 2,6-dicloropiridina (48.7 mg, 0.329 mmol) en NMP (1.6 mL) y N,N-diisopropiletilamina (96 microL, 0.55 mmol) se calentó hasta 135 °C durante 20 min en el microondas. La purificación por cromatografía rápida en columna de gel de sílice y eluida con un gradiente de 0-80 % de acetato de etilo en hexanos, proporcionó el producto del título (28 mg, 18 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.85 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.37 (dd, 1H), 6.79 (d, 1H), 6.57 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.45 (dt, 1H), 3.91 (dd, 1H), 3.57-3.46 (m, 3H), 3.39-3.29 (m, 2H), 3.24 (dd, 1H), 3.13-3.01 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.82-1.69 (m, 1H), 0.95-0.88 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 549.1.

Este producto racémico se separó en sus enantiómeros mediante HPLC quiral (Chiral Technologies Chiralcel OJ-H, 5 μ, 30 x 250 mm, 45 % de EtOH/hexanos, 20 mL/min) para dar el enantiómero 1 (primero en eluir, tiempo de retención 40.7 min) y el enantiómero 2 (segundo en eluir, tiempo de retención 51.6 min), que se desprotegieron por separado en las Etapas 4a/4b.

Etapas 4a. 3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (enantiómero 1)

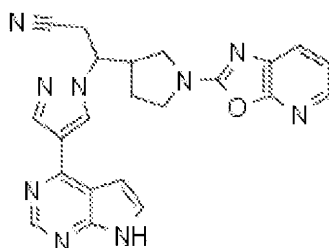
El 3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (enantiómero 1 de la Etapa 3) se agitó durante 2 h en una solución que contenía TFA/DCM 1:1 (2 mL) y después se concentró. El residuo se disolvió en 1 mL de MeOH y se añadió 0.2 mL de EDA. La purificación mediante HPLC/MS preparativa (columna de C18 eluida con un gradiente de ACN/H₂O que contenía NH₄OH al 0.15 %) dio el producto. ¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃): δ 9.44 (br s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 7.39 (dd, 1H), 7.38 (dd, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 4.46 (dt, 1H), 3.92 (dd, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H), 3.13-3.02 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 2.00-1.88 (m, 1H), 1.84-1.71 (m, 1H); LCMS (M+H)⁺: 419.1.

Etapla 4b. 3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (enantiómero 2)

Se procedió como en la Etapa 4a, con el uso del enantiómero 2 de la Etapa 3: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.59 (br s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 7.40 (dd, 1H), 7.38 (dd, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 4.46 (dt, 1H), 3.92 (dd, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H), 3.14-3.02 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 1.99-1.90 (m, 1H), 1.83-1.72 (m, 1H); LCMS (M+H)⁺: 419.1.

Ejemplo 2. 3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (se aisló un enantiómero)



Etapla 1. 3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo

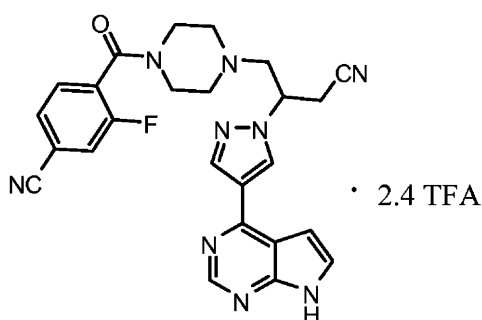
La oxazolo[5,4-b]piridin-2(1H)-iona (1.17 g, 7.68 mmol, preparada como en el Ejemplo 33 de la patente de los EE. UU. núm. 2010/0298334, Etapa 4) y el 3-pirrolidin-3-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (2.80 g, 6.40 mmol del Ejemplo 15, Etapa 3) en 1,4-dioxano (30 mL) se calentaron hasta 70 °C durante 2 h. El disolvente se retiró al vacío. El producto crudo se reconstituyó en etanol (40 mL) y se trató con nitrato de plata (3 g, 15 mmol) e hidróxido de amonio acuoso (6 mL) en porciones durante el transcurso de 20 h. En la reacción se añadió agua, NaOH 1 N y salmuera. El material insoluble se retiró por filtración. Las capas del filtrado se separaron. La porción acuosa se extrajo con tres porciones de acetato de etilo. Los extractos se secaron sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice y se eluyó con 10 % de MeOH/DCM para proporcionar el producto como una espuma de color blanco (2.84 g, 80 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.83 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.57 (dd,

1H), 7.40 (d, 1H), 7.13 (dd, 1H), 6.78 (d, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.52 (dt, 1H), 4.05 (dd, 1H), 3.82 (ddd, 1H), 3.67-3.44 (m, 4H), 3.25 (dd, 1H), 3.24-3.09 (m, 1H), 2.98 (dd, 1H), 2.06-1.74 (m, 2H), 0.97-0.88 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 556.1.

Etapla 2. 3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo

El 3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (5.35 g, 9.63 mmol, preparado mediante el método de la Etapa 1) se agitó en una mezcla 2:1 de DCM y TFA (60 mL) durante 6 h. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria. El residuo crudo se disolvió en metanol (50 mL) que contenía EDA (5.15 mL, 77.0 mmol) y se agitó durante la noche. Después de retirar el disolvente, el producto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice y se eluyó con un gradiente de 0-15 % de MeOH/DCM (3.59 g, 88 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.72 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H), 7.54 (dd, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.12 (dd, 1H), 6.75 (d, 1H), 4.56 (dt, 1H), 4.01 (dd, 1H), 3.80 (ddd, 1H), 3.60 (ddd, 1H), 3.48 (dd, 1H), 3.26 (dd, 1H), 3.21-3.06 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 2.03-1.76 (m, 2H); LCMS (M+H)⁺: 426.1.

Ejemplo 3. Sal trifluoroacetato de 4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo (se aisló un solo isómero)



Etapla 1. 4-{3-ciano-2-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazine-1-carboxilato de (R) y (S)-ter-butilo

A una solución de 4-(3-cianoalil)piperazin-1-carboxilato de (E) y (Z)-ter-butilo (11.1 g, 0.0441 mol, preparado como en el Ejemplo 1 de la patente de los EE. UU. núm. 2011/0059951, Etapas 1-2) y 4-(1H-pirazol-4-il)-7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (11.6 g, 0.0368 mol, preparada como se describe en la patente núm. WO2007/070514, Ejemplo 65) se añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (5.5 mL, 0.037 mol) en acetonitrilo (70 mL). La mezcla

se agitó a 50 °C durante 15 horas. Los solventes se retiraron al vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua (3 veces), salmuera (una vez), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía en columna ultrarrápida, seguida de HPLC-MS preparativa (eluida con un gradiente de MeCN/H₂O que contenía NH₄OH al 0.15 %) dio el producto como una espuma blanca (8.20 g, 39 %).

Para separar la mezcla racémica en enantiómeros individuales se usó HPLC quiral (Phenomenex Lux-Cellulose-2, 21.2 x 250 mm, 5 µm, eluida con 30 % EtOH/70 % hexanos a 20 mL/min). Pico 1 (primero en eluir): 4.0 g y pico 2 (segundo en eluir): 4.0 g. ¹H NMR pico 1 (400 MHz, CDCl₃): δ 8.84 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 6.79 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.70-4.62 (m, 1H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.44-3.35 (br m, 4H), 3.16 (dd, 1H), 3.10 (dd, 1H), 2.99 (dd, 1H), 2.89 (dd, 1H), 2.50-2.40 (br m, 4H), 1.44 (s, 9H), 0.95-0.89 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 567.3. ¹H NMR pico 2 (400 MHz, CDCl₃): δ 8.84 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 6.79 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.70-4.62 (m, 1H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.45-3.34 (br m, 4H), 3.16 (dd, 1H), 3.10 (dd, 1H), 2.99 (dd, 1H), 2.90 (dd, 1H), 2.50-2.40 (br m, 4H), 1.44 (s, 9H), 0.95-0.89 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 567.3.

Etapas 2. Sal clorhidrato de 4-piperazin-1-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo

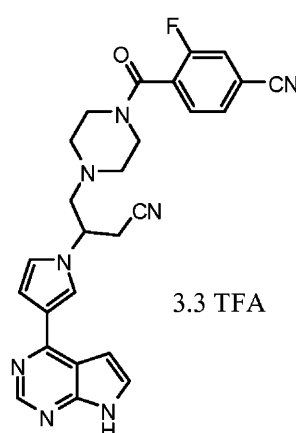
El 4-{3-ciano-2-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-carboxilato de ter-butilo (4.0 g, 7.0 mmol; pico 2 de la Etapa 1) se disolvió en 1,4-dioxano (40 mL) y se añadió HCl 4.0 M en dioxano (25 mL, 100 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 80 min. El disolvente se retiró al vacío para proporcionar el producto como sal clorhidrato. LCMS (M+H)⁺: 467.3.

Etapas 3. Sal trifluoroacetato de 4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo

Una mezcla de ácido 4-ciano-2-fluorobenzoico (138 mg, 0.836 mmol, Alfa Aesar), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (254 mg, 0.669 mmol) y trietilamina (0.466 mL, 3.34 mmol) en THF (10.0 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió clorhidrato de 4-piperazin-1-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo (0.33 g, 0.56 mmol; de la Etapa 2). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaOH 0.1 N y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se disolvió en una mezcla 2:1 de DCM:TFA, se agitó durante 3 horas, se concentró y después se disolvió en una mezcla de 8 mL de

metanol y 0.8 mL de etilendiamina. Después de agitar durante una hora, el producto se purificó por HPLC-MS y se eluyó con un gradiente de MeCN y H₂O que contenía TFA al 0.2 %. El eluyente se congeló y liofilizó para dar un polvo blanco (200 mg, 47 %). ¹H NMR (400 MHz, d₆-dmsó): δ 12.64 (br s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.82-7.76 (m, 2H), 7.61 (t, 1H), 7.15-7.11 (m, 1H), 5.13 (br m, 1H), 3.82-2.37 (br, 12H); ¹⁹F NMR (400 MHz, d₆-dmsó): δ -74.97 (s, 7.2 F), -114.49 (br s, 1F); LCMS (M+H)⁺: 484.2.

Ejemplo 4. Sal trifluoroacetato de 4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo (se aisló un solo enantiómero)



Etapas 1. 4-{3-ciano-2-[3-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-carboxilato de ter-butilo

A una mezcla de 4-(3-cianoalil)piperazin-1-carboxilato de (E) y (Z)-ter-butilo (4.0 g, 0.016 mol; preparado como en el Ejemplo 1 de la patente de los EE. UU. núm. 2011/0059951, Etapas 1-2) y 4-(1H-pirrol-3-il)-7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (4.2 g, 0.013 mol, preparada como en la patente núm. WO2009/114512, Ejemplo 82) en N,N-dimetilformamida (25 mL) se añadió carbonato de potasio (5.540 g, 0.0401 mol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 17 horas. Se añadió más 4-(3-cianoalil)piperazin-1-carboxilato de (E) y (Z)-ter-butilo (4.0 g, 0.016 mol) y la reacción se agitó a 60 °C durante 24 horas. Se añadió otra porción de 4-(3-cianoalil)piperazin-1-carboxilato de (E) y (Z)-ter-butilo (4.0 g, 0.016 mol). Después de 3 noches de calentamiento, la mayor parte del material de partida se había convertido al producto deseado, según se determinó por LCMS. Después, la mezcla se filtró, se diluyó con EtOAc, se lavó con agua (3 veces), salmuera (una vez), se secó sobre sulfato de sodio, se

decantó y se concentró. La purificación mediante HPLC-MS preparativa (eluida con un gradiente de MeCN/H₂O que contenía NH₄OH al 0.15 %) proporcionó una espuma de color marrón (4.20 g, 55 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.81 (s, 1H), 7.66 (t, 1H), 7.34 (d, 1H), 6.97 (dd, 1H), 6.89 (t, 1H), 6.84 (d, 1H), 5.66 (s, 2H), 4.47-4.36 (m, 1H), 3.57-3.50 (m, 2H), 3.45-3.37 (m, 4H), 3.06 (dd, 1H), 3.00-2.90 (m, 2H), 2.83 (dd, 1H), 2.57-2.35 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 0.96-0.86 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 566.3.

Para separar el racemato en enantiómeros individuales se usó HPLC quiral (Chiral Technologies ChiralPAK IA 20x250 mm, 5 μm, fase móvil 30 % de EtOH/70 % de hexanos, caudal 12 mL/min). Pico 1 (primer enantiómero en eluir), 1.8 g; Pico 2 (segundo enantiómero en eluir): 1.9 g.

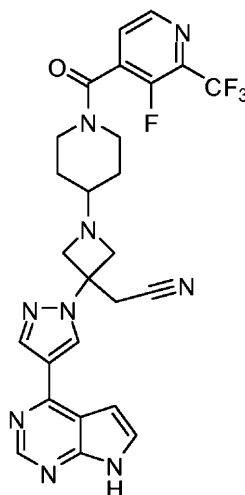
Etapas 2. Sal clorhidrato de 4-piperazin-1-il-3-[3-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]butanonitrilo

A una solución de 4-{3-ciano-2-[3-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-carboxilato de ter-butilo (1.9 g, 0.0034 mol; pico 2 de la Etapa 1) en 1,4-dioxano (20 mL) se añadió 4.0 M de HCl en p-dioxano (12 mL, 48 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 80 minutos. El disolvente se retiró al vacío para proporcionar el producto como un sólido amarillo claro (1.90 g, 100 %). LCMS (M+H)⁺: 466.3.

Etapas 3. Sal trifluoroacetato de 4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo

Una mezcla de ácido 4-ciano-2-fluorobenzoico (44 mg, 0.26 mmol, Alfa Aesar), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (93 mg, 0.24 mmol) y trietilamina (171 mL, 1.22 mmol) en THF (2.4 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió sal clorhidrato de 4-piperazin-1-il-3-[3-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]butanonitrilo (110 mg, 0.20 mmol; de la Etapa 2). La reacción se agitó durante 2 horas. Se añadió acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaOH 1 N y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se disolvió primero en una mezcla 1:1 de DCM:TFA durante 1 hora, se concentró y, después, se agitó durante una hora en metanol (2 mL) que contenía etilendiamina (0.2 mL). La purificación mediante HPLC-MS preparativa (eluida con un gradiente de MeCN/H₂O que contenía TFA al 0.1 %) dio el producto como sal de 3.3xTFA (84 mg, 48 %). ¹H NMR (300 MHz, d₆-dmsO): δ 13.22 (br s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.97-7.93 (m, 1H), 7.80 (dd, 1H), 7.61 (t, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.18-7.13 (m, 1H), 5.00-4.80 (m, 1H), 3.75-3.49 (br m, 2H), 3.35-2.33 (m, 10H); ¹⁹F NMR (300 MHz, d₆-dmsO): δ -74.82 (s, 10F), -114.53 (s, 1F); LCMS (M+H)⁺: 483.2.

Ejemplo 5. {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo



Etapa A: 3-oxoazetidin-1-carboxilato de ter-butilo

A una mezcla de 3-hidroxiazetidin-1-carboxilato de *ter*-butilo (10.0 g, 57.7 mmol), sulfóxido de dimetilo (24.0 mL, 338 mmol), trietilamina (40 mL, 300 mmol) y cloruro de metileno (2.0 mL) se añadió en porciones el complejo trióxido de azufre-piridina (40 g, 200 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 3 horas, se inactivó con salmuera y se extrajo con cloruro de metileno. Los extractos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por columna de gel de sílice (0-6 % de acetato de etilo (EtOAc) en hexanos) para dar 3-oxoazetidin-1-carboxilato de *ter*-butilo (5.1 g, 52 % de rendimiento).

Etapa B: 3-(cianometilen)azetidin-1-carboxilato de ter-butilo

Un matraz de fondo redondo de 1 L y 4 bocas secado al horno y equipado con una barra de agitación, septos, entrada de nitrógeno, 250 mL embudo de adición y termopar, se cargó con hidruro de sodio (5.6 g, 0.14 mol) y tetrahidrofurano (THF) (140 mL) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió hasta 3 °C y después se cargó gota a gota con ciano metilfosfonato de dietilo (22.4 mL, 0.138 mol) mediante una jeringa durante 20 minutos. La solución se volvió una suspensión de color amarillo claro. Después, la reacción se agitó durante 75 minutos mientras se calentaba hasta 18.2 °C. Una solución de 3-oxoazetidin-1-carboxilato de *ter*-butilo (20 g, 0.1 mol) en tetrahidrofurano (280 mL) se preparó en un matraz de fondo redondo secado al horno, se cargó al embudo de adición mediante una cánula y después se añadió gota a gota a la mezcla de reacción durante 25

minutos. La solución de la reacción se volvió de color rojo. La reacción se dejó en agitación durante la noche. Después de 24 horas, la reacción se probó por TLC (70 % hexano/EtOAc) y se comprobó que era completa. La reacción se diluyó con 200 mL de salmuera al 20 % y 250 mL de EtOAc. La solución se particionó y la fase acuosa se extrajo con 250 mL de EtOAc. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (0 % a 20 % EtOAc/hexanos, columna ultrarrápida 150 g) para dar el producto deseado, 3-(cianometilen)azetidín-1-carboxilato de terc-butilo (15 g, 66.1 % de rendimiento).

Etapas C: 4-cloro-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

A una suspensión de hidruro de sodio (36.141 g, 903.62 mmol) en N,N-dimetilacetamida (118 mL) a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (baño de hielo/sal) se añadió lentamente una solución oscura de 4-cloropirrol[2,3-d]pirimidina (119.37 g, 777.30 mmol) en N,N-dimetilacetamida (237 mL). El matraz y el embudo de adición se lavaron con N,N-dimetilacetamida (30 mL). Inmediatamente se desprendió una gran cantidad de gas. La mezcla se volvió una mezcla ligeramente turbia de color naranja. La mezcla se agitó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos para dar una mezcla turbia de color marrón claro. A la mezcla se añadió lentamente cloruro de [2-(trimetilsilil)etoxi]metilo (152.40 g, 914.11 mmol) y la reacción se agitó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. La reacción se inactivó mediante la adición lenta de 12 mL de H_2O . Se añadió más agua (120 mL) seguido de éter metil ter-butílico (MTBE) (120 mL). La mezcla se agitó durante 10 min. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con otra porción de MTBE (120 mL). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera (120 mL $\times$ 2) y se concentraron a presión reducida para dar el producto crudo 4-cloro-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina como un aceite oscuro. Rendimiento: 85.07 g (97 %); LC-MS: 284.1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Se usó sin purificación en la reacción siguiente.

Etapas D: 4-(1H-pirazol-4-il)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

Un matraz de fondo redondo de 1000 mL se cargó con 4-cloro-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (10.00 g, 35.23 mmol), 1-butanol (25.0 mL), 1-(1-etoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (15.66 g, 52.85 mmol), agua (25.0 mL) y carbonato de potasio (12.17 g, 88.08 mmol). Esta solución se desgasificó 4 veces y se llenó con nitrógeno cada vez. A la solución se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (4.071 g, 3.523 mmol). La solución se desgasificó 4 veces y se llenó con nitrógeno cada vez. La mezcla se agitó durante la noche a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se filtró a través de un lecho de celite y el celite se lavó con acetato de etilo (42 mL). El filtrado se combinó y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron al vacío en un baño de 30-

70 °C para dar el compuesto final 4-(1H-pirazol-4-il)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina. Rendimiento: 78 %. LC-MS: 316.2 (M+H)⁺.

Etapa E: 3-(cianometil)-3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-carboxilato de ter-butilo

Un matraz de fondo redondo de 2 L equipado con agitación superior, septos y entrada de nitrógeno se cargó con 3-(cianometil)azetidin-1-carboxilato de *ter*-butilo (9.17 g, 0.0472 mol), 4-(1H-pirazol-4-il)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (14.9 g, 0.0472 mol) y acetonitrilo (300 mL). La solución obtenida fue heterogénea. A la solución se añadió en porciones 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (8.48 mL, 0.0567 mol) mediante una jeringa durante 3 min a temperatura ambiente. Lentamente, la solución se volvió homogénea y de color amarillo. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se completó mediante HPLC y LC/MS y se concentró por evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo (~150 mL). Se añadió EtOAc (100 mL) seguido de 100 mL de salmuera al 20 %. Las dos fases se partitionaron. La fase acuosa se extrajo con 150 mL de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron para dar un aceite de color naranja. La purificación por cromatografía ultrarrápida (150 gramos de sílice, 60 % EtOAc/hexanos, cargado con CH₂Cl₂) dio el compuesto del título, 3-(cianometil)-3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-carboxilato de *ter*-butilo como un aceite amarillo (21.1 g, 88 % de rendimiento). LC-MS: [M+H]⁺ = 510.3.

Etapa F: Diclorhidrato de {3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo.

A una solución de 3-(cianometil)-3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-carboxilato de *ter*-butilo (2 g, 3.9 mmol) en 10 mL de THF se añadió 10 mL de HCl 4 N en dioxano. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentró al vacío para proporcionar 1.9 g (99 %) del compuesto del título como un polvo sólido blanco, que se usó para la reacción siguiente sin purificación. LC-MS: [M+H]⁺ = 410.3.

Etapa G: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}piperidin-1-carboxilato de ter-butilo

En la solución de diclorhidrato de {3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (2.6 g, 6.3 mmol), 4-oxo-1-piperidinacarboxilato de *ter*-butilo (1.3 g, 6.3 mmol) en THF (30 mL) se añadió N,N-diisopropiletilamina (4.4 mL, 25 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (2.2 g, 10 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de añadir 20 mL de salmuera, la solución se extrajo con EtOAc. El extracto se secó

sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El residuo se purificó por columna CombiFlash y se eluyó con 30-80 % de EtOAc en hexanos para dar el producto deseado, 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil) etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}piperidin-1-carboxilato de *ter*-butilo. Rendimiento: 3.2 g (86 %); LC-MS: [M+H]⁺ = 593.3.

Etapas H: Triclorhidrato de {1-piperidin-4-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

A una solución de 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil) etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}piperidin -1-carboxilato de *ter*-butilo (3.2 g, 5.4 mmol) en 10 mL de THF se añadió 10 mL de HCl 4 N en dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La remoción de los disolventes a presión reducida proporcionó 3.25 g (100 %) de triclorhidrato de {1-piperidin-4-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo como un polvo sólido blanco, que se usó directamente en la reacción siguiente. LC-MS: [M+H]⁺ = 493.3. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9.42 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.39 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.96 (d, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.02-3.63 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.53 (t, 2H), 3.49-3.31 (3, 3H), 2.81 (m, 2H), 2.12 (d, 2H), 1.79 (m, 2H), 0.83 (t, 2H), -0.10 (s, 9H).

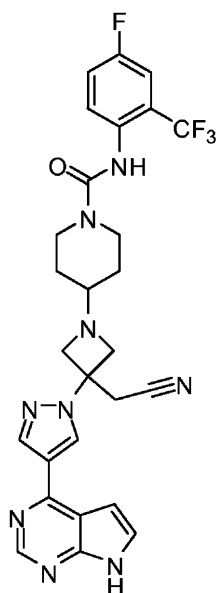
Etapas I: {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

Una mezcla de triclorhidrato de {1-piperidin-4-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (1.22 g, 2.03 mmol), ácido 3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotínico (460 mg, 2.2 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamin)fosfonio (1.07 g, 2.42 mmol) y trietilamina (2.0 mL, 14 mmol) en dimetilformamida (DMF) (20.0 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La LS-MS mostró que la reacción era completa. A la mezcla de reacción se añadió EtOAc (60 mL) y solución acuosa saturada de NaHCO₃ (60 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la fase orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida proporcionó el producto deseado, {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo. LC-MS: 684.3 (M+H)⁺.

Etapas J: {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

En una solución de {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (56 mg, 0.1 mmol) en cloruro de metileno (1.5 mL) se añadió ácido trifluoroacético (1.5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de separar los disolventes al vacío, el residuo se disolvió en una solución de metanol que contenía etilendiamina al 20 %. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución se purificó por HPLC (método B) para dar el compuesto del título. LC-MS: 554.3 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 9.71 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.55 (d, J=4.6 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.52 (t, J=4.6 Hz, 1H), 7.39 (dd, J₁=3.4 Hz, J₂=1.5 Hz, 1H), 6.77 (dd, J₁=3.6 Hz, J₂=0.7 Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.63 (dd, J₁=7.8 Hz, J₂=3.7 Hz, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.11 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.40 (m, 1H).

Ejemplo 6. 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]piperidin-1-carboxamida



Etapas A: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]piperidin-1-carboxamida

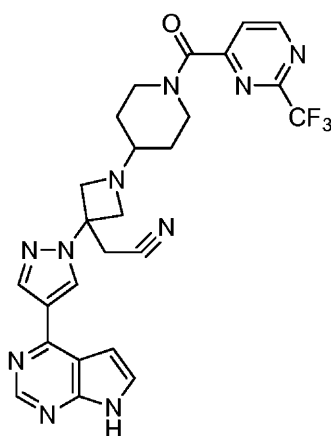
A una solución de triclorhidrato de {1-piperidin-4-il-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-

il}acetonitrilo (500 mg, 1 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL) se añadió trietilamina (0.29 g, 2.8 mmol) y 4-fluoro-1-isocianato-2-(trifluorometil)benceno (190 mg, 0.95 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se retiró a presión reducida. La purificación por combi-flash con el uso de 30-100 % de EtOAc/hexanos dio 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]piperidin -1-carboxamida como un polvo. LC-MS: 698.1 (M+H)⁺.

Etapa B: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]piperidin-1-carboxamida

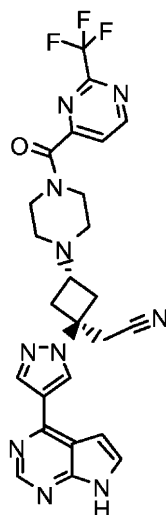
La 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]piperidina-1-carboxamida (210 mg, 0.3 mmol) se disolvió en una solución de ácido trifluoroacético 50 M en cloruro de metileno (20 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante una hora, los disolventes se retiraron a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (20 mL) y etilendiamina (1.0 g, 17 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una hora, la mezcla se purificó por HPLC (método B) para dar 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil]piperidina-1-carboxamida como un polvo blanco. LC-MS: 568.1 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.10 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.55 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.01(d, J=3.6 Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.67 (d, J=8 Hz, 2H), 3.51 (m, 4H), 2.92(m, 2H), 2.38 (m, 1H), 1.62 (m, 2H), 1.09 (m, 2H).

Ejemplo 7. [3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]-1-(1-{[2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]carbonil}piperidin-4-il)azetidin-3-il]acetonitrilo



El compuesto del título se preparó mediante un método análogo al usado para preparar el Ejemplo 5. LC-MS (M+H)⁺: 537.2.

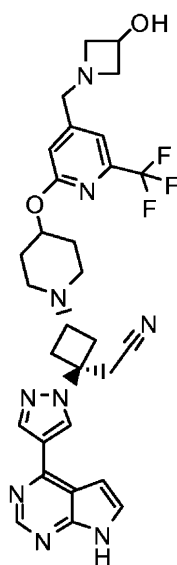
Ejemplo 8. *[trans-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]-3-(4-{[2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]carbonil}piperazin-1-il)ciclobutil]acetonitrilo*



Una mezcla de ácido 2-(trifluorometil)pirimidin-4-carboxílico (0.225 g, 1.17 mmol, preparado por hidrólisis del éster metílico obtenido de Apollo como se describe en la patente núm. WO2006/067445), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (0.29 g, 0.76 mmol, Aldrich) y trietilamina (0.26 mL, 1.9 mmol) en tetrahidrofurano (6 mL) se agitó previamente durante 15 minutos, seguido de la adición de {*trans*-3-piperazin-1-il-1-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo (0.188 g, 0.380 mmol, preparado como en el Ejemplo 1b de la patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681, Etapa 1) en tetrahidrofurano (10 mL). La reacción se agitó durante la noche. El THF se retiró al vacío. El residuo se particionó entre bicarbonato de sodio saturado y acetato de etilo. La porción acuosa se extrajo un total de tres veces. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron. Para purificar el intermedio protegido por SEM se usó cromatografía ultrarrápida eluida con un gradiente de 0-10 % de MeOH en DCM. La desprotección se efectuó primero por agitación con ácido trifluoroacético (10 mL) en cloruro de metileno (10 mL) durante 2 horas, seguido de evaporación del disolvente al vacío, después por agitación durante la noche con metanol (6 mL, 200 mmol) que contenía etilendiamina (0.5 mL, 7 mmol). La mezcla de reacción se particionó entre agua y acetato de etilo, y la porción acuosa se extrajo otras dos veces con acetato de etilo. Los extractos

combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. Para purificar el producto se usó cromatografía ultrarrápida eluida con un gradiente de 0-10 % de MeOH en DCM. El producto se volvió a purificar por HPLC-MS preparativa (C18, eluida con un gradiente de H₂O/MeCN que contenía TFA al 0.1 %). El acetonitrilo se retiró del eluyente que contenía la masa deseada por medio de evaporación rotatoria; después, la solución acuosa restante se neutralizó mediante la adición de bicarbonato de sodio y se extrajo varias veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El producto se volvió a purificar por HPLC-MS preparativa (C18, eluida con un gradiente de H₂O/MeCN que contenía NH₄OH al 0.15 %). El eluyente que contenía la masa deseada se congeló y se liofilizó para dar el producto como la base libre (99 mg, 48 %). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 9.13 (d, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 6.98 (d, 1H), 3.89-3.81 (m, 2H), 3.59-3.52 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.97 (tt, 1H), 2.59-2.42 (m, 6H); ¹⁹F NMR (282 MHz, CD₃OD): δ -72.43 (s, 3F); LCMS (M+H)⁺: 537.0.

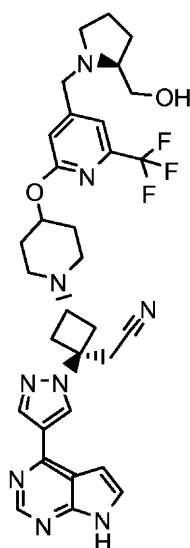
Ejemplo 9. {trans-3-(4-{[4-[(3-hidroxiazetidín-1-il)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo



En la etapa de desplazamiento se siguió el procedimiento del Ejemplo 153 de la patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681 con el uso de N,N-diisopropiletilamina (64 µL, 0.37 mmol) y clorhidrato de azetidín-3-ol (30 mg, 0.3 mmol, Oakwood). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, se añadió metanol (0.20 mL) para dar una solución homogénea, que se agitó

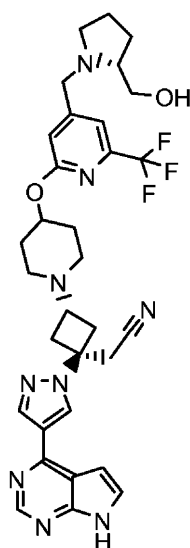
durante otras 2.5 horas a temperatura ambiente y se trató de acuerdo con las condiciones de desprotección y purificación dadas en el Ejemplo 153 de la patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681 para proporcionar el producto como la base libre (9.7 mg, 44 %). ^1H NMR (400 MHz, dmso) δ 12.12 (br s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.34 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.05 – 4.77 (m, 1H), 4.19 (h, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.50 (td, $J = 6.1, 2.0$ Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 3.06 – 2.92 (m, 2H), 2.86 – 2.71 (m, 3H), 2.68 – 2.53 (m, 2H), 2.38 – 2.22 (m, 2H), 2.22-2.07 (br m, 2H), 2.05-1.95 (br m, 2H), 1.75 – 1.48 (m, 2H); ^{19}F NMR (376 MHz, dmso) δ -67.36 (s); LCMS (M+H) $^+$: 608.2.

Ejemplo 10. {trans-3-(4-[[4-[[[(2S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi]piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil]acetonitrilo



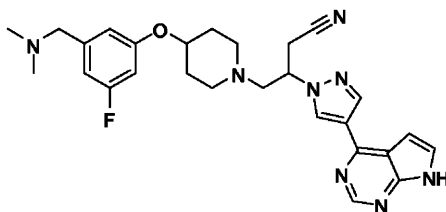
Se siguió el método del Ejemplo 158 de la patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681, excepto que el desplazamiento de mesilato con amina se realizó con el uso de (2S)-pirrolidin-2-ilmetanol (20 μL , 0.2 mmol, Aldrich) a temperatura ambiente durante la noche (8.3 mg, 59 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12.09 (br s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.00 (tt, $J = 8.4, 3.9$ Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.12 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 3.45 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.41 (s, 2H), 3.42-3.25 (m, 2H), 3.06 – 2.97 (m, 2H), 2.87 – 2.77 (m, 2H), 2.69 – 2.62 (m, 2H), 2.59 (dddd, $J = 5.8, 5.8, 5.8, 8.1$ Hz, 1H), 2.41 – 2.31 (m, 2H), 2.22 – 2.09 (m, 3H), 2.08 – 1.95 (m, 2H), 1.83 (dddd, $J = 8.1, 8.1, 8.3, 12.2$ Hz, 1H), 1.75 – 1.46 (m, 5H); ^{19}F NMR (376 MHz, dmso) δ -67.24 (s); LCMS (M+H) $^+$: 636.3.

Ejemplo 11. {trans-3-(4-{[4-{[(2R)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo



Se siguió el método del Ejemplo 158 de la patente de los EE. UU. núm. 2012/0149681, excepto que el desplazamiento de mesilato con amina se realizó con el uso de (2R)-pirrolidin-2-ilmetanol (20 µL, 0.2 mmol, Aldrich) a temperatura ambiente durante la noche (8.3 mg, 59 %). ¹H NMR (400 MHz, dmso) δ 12.14 (br s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.04 – 4.94 (m, 1H), 4.52 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.12 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 3.52 – 3.22 (m, 5H), 3.09 – 2.92 (m, 2H), 2.86 – 2.73 (m, 2H), 2.70 – 2.53 (m, 3H), 2.42 – 2.27 (m, 2H), 2.22 – 2.09 (m, 3H), 2.06 – 1.87 (m, 2H), 1.82 (dddd, J = 8.0, 8.0, 8.4, 11.9 Hz, 1H), 1.77 – 1.37 (m, 5H); ¹⁹F NMR (376 MHz, dmso) δ -67.24 (s); LCMS (M+H)⁺: 636.3.

Ejemplo 12. 4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo (quiral)



Etapas 1. 3-fluoro-5-hidroxibenzaldehído

A una suspensión de 3-fluoro-5-hidroxibenzonitrilo (1.00 g, 7.29 mmol) en tolueno (60.0 mL a -78 °C) se añadió hidruro de diisobutilaluminio 1.0 M en tolueno (18.2 mL, 18.2 mmol). La mezcla obtenida se agitó a -78 °C durante 1 hora y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. Se añadió la mezcla 1:1 de metanol y agua (10 mL) y se agitó durante 35 minutos. El sólido se filtró y se lavó con acetato de etilo. Los filtrados se lavaron con agua y salmuera, después se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó con una columna de gel de sílice (eluida con 10-50 % de acetato de etilo/hexanos) para dar el producto deseado (0.77 g, 75 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.49 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 7.10 (m, 2H), 6.87 (d, 1H).

Etapas 2. 3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenol

A una mezcla de clorhidrato de dimetilamina (160 mg, 1.96 mmol) y 3-fluoro-5-hidroxibenzaldehído (250.0 mg, 1.784 mmol) en cloruro de metileno (9.0 mL) se añadió trietilamina (323 µL, 2.32 mmol) y resina de triacetoxiborohidruro de sodio (1.1 g, 2.7 mmol). La mezcla obtenida se agitó durante la noche y después se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por columna de gel de sílice (eluida con 0-15 % de metanol/DCM) para dar el producto deseado (0.21 g, 70 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 6.55 (m, 2H), 6.42 (d, 1H), 2.15 (s, 6H), 1.89 (s, 2H). LCMS (M+H)⁺: 170.1.

Etapas 3. 4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo

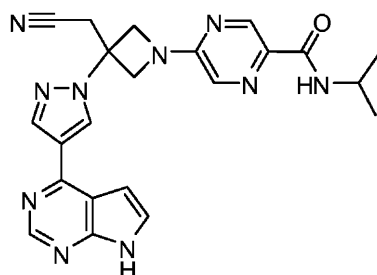
A una mezcla de 3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenol (158 mg, 0.934 mmol) en cloruro de metileno (9 mL) se añadió resina de trifenilfosfina (578 mg, 1.37 mmol) y azodicarboxilato de di-ter-butilo (229 mg, 0.996 mmol). La mezcla se agitó durante 20 minutos antes de añadir una solución de 4-(4-hidroxipiperidin-1-il)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo (300 mg, 0.6 mmol) en cloruro de metileno (2 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió más resina de trifenilfosfina (0.5 g), azodicarboxilato de di-ter-butilo (0.23 g) y DCM (8 mL) y se agitó durante otras 2 horas. El vial y la resina se lavaron con DCM y se filtraron. Los filtrados se lavaron con solución acuosa de NaOH al 10 %. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por columna de gel de sílice (eluida con 0-15 % de metanol/DCM) para dar el producto protegido con SEM. LCMS (M+H)⁺: 633.5. Al producto purificado se añadió cloruro de metileno (1.5 mL) y ácido trifluoroacético (1.5 mL, 19 mmol) y se agitó durante 2 horas. Los disolventes se evaporaron antes de añadir metanol (3.5 mL) y etilendiamina (0.70 mL, 10 mmol). La mezcla obtenida se agitó durante 1 hora y después se concentró. El concentrado

se recolectó en DCM y se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar el producto crudo que se purificó por HPLC preparativa quiral (columna Chiralcel OJ-H, 4.6 x 250 mm, 5 µ, 60 % etanol/Hex, 0.5 mL/min) para dar 2 enantiómeros.

Enantiómero 1 (primero en eluir): LCMS (M+H)⁺: 503.3.

Enantiómero 2 (segundo en eluir): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8.78 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 6.96 (d, 1H), 6.64 (t, 3H), 4.94 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.39 (m, 2H), 3.19 (d, 3H), 2.77 (m, 3H), 2.60 (m, 1H), 2.32 (m, 2H), 2.10 (s, 6H), 1.83 (m, 2H), 1.54 (m, 2H). LCMS (M+H)⁺: 503.3.

Ejemplo 13. 5-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carboxamida



Etapas 1: 5-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxilato de metilo

Se añadió (R)-(+)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo (0.065 g, 0.10 mmol) a una mezcla de diclorhidrato de {3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (0.50 g, 1.0 mmol), 5-cloropirazin-2-carboxilato de metilo (0.18 g, 1.0 mmol) (Ark Pharm, Inc., núm. cat. AK-23920) y carbonato de cesio (1.0 g, 3.1 mmol) en tolueno (15.0 mL) en nitrógeno, seguido de acetato de paladio (0.023 g, 0.10 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice con acetato de etilo en diclorometano (0-70 %) para proporcionar el producto deseado (0.31 g, 55 %). LCMS (M+H)⁺: m/z = 546.3.

Etapas 2: Ácido 5-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxílico

Una mezcla de 5-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxilato de

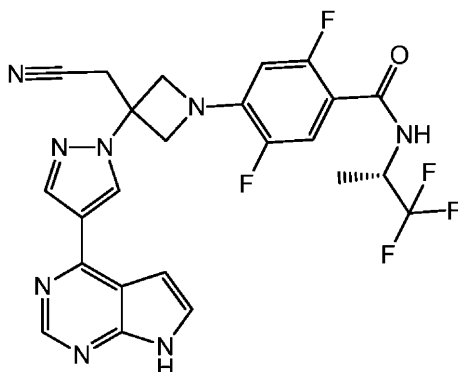
metilo (0.31 g, 0.57 mmol), hidróxido de litio monohidratado (0.060 g, 1.4 mmol) en etanol (6.0 ml) y agua (2.5 ml) se agitó a 30 °C durante la noche. La mezcla se ajustó a pH = 4 con HCl acuoso y se concentró a presión reducida para retirar el MeOH. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua y éter, y después se secó al vacío para proporcionar el producto deseado (0.25 g, 83 %). LCMS (M+H)⁺: m/z = 532.3

Etapas 3: 5-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carboxamida

Se añadió trietilamina (15 µL, 0.11 mmol) a una mezcla de ácido 5-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-1-il}pirazin-2-carboxílico (19.4 mg, 0.0365 mmol) y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (19 mg, 0.044 mmol) y 2-propanamina (3.2 mg, 0.055 mmol) en cloruro de metileno (1.3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se trató con NaHCO₃ acuoso y se extrajo con cloruro de metileno (2 x 2 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1 mL) y se concentraron a presión reducida. El residuo se usó sin purificación adicional para la etapa siguiente. LCMS (M+H)⁺: m/z = 573.3.

Al intermedio anterior se añadió cloruro de metileno (1.3 mL) y ácido trifluoroacético (0.6 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (1.3 mL). A la solución se añadió etilendiamina (0.086 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se purificó mediante RP-HPLC (pH = 10) para proporcionar el producto deseado. LCMS (M+H)⁺: m/z = 443.2. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.15 (br, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.63 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 3.3, 2.4 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 3.4, 1.7 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 9.8 Hz, 2H), 4.53 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 4.13-4.02 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

Ejemplo 14. 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida



Etapa 1: 4-cloro-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida

Se añadió cloruro de 4-cloro-2,5-difluorobenzoilo (29.6 mg, 0.140 mmol) (Oakwood, núm. cat. 001628) a una mezcla de clorhidrato de (2S)-1,1,1-trifluoropropan-2-amina (20.0 mg, 0.134 mmol) (SynQuest Lab, núm. cat. 3130-7-S1) y diisopropiletilamina (58 μ L, 0.33 mmol) en diclorometileno (4.0 mL) a 0 $^{\circ}$ C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, se trató con NaHCO_3 acuoso saturado y se extrajo con diclorometileno (3x10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto deseado que se usó directamente y sin purificación adicional en la etapa de reacción siguiente. LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$): m/z = 288.0/290.0.

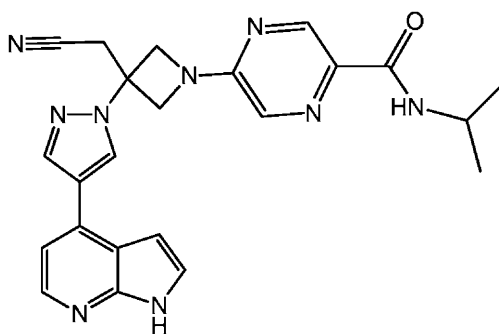
Etapa 2: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida

El (R)-(+)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo (8.3 mg, 0.013 mmol) se añadió a una mezcla de diclorhidrato de {3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (65 mg, 0.13 mmol), 4-cloro-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida (0.14 mmol) y carbonato de cesio (0.13 g, 0.40 mmol) en tolueno (4.0 mL) en atmósfera de N_2 , seguido de acetato de paladio (3.0 mg, 0.013 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 130 $^{\circ}$ C durante 5 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se trató con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto crudo que se usó directamente y sin purificación adicional en la etapa de reacción siguiente. LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$): m/z = 661.2.

Etapa 3: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida

Se añadió éterato de trifluoruro de boro (0.051 mL, 0.40 mmol) a una solución de 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil] benzamida en acetonitrilo (1.0 mL) a 0 °C en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. (LCMS (M+H)⁺: m/z = 561.3). Después, la mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió agua (0.13 mL). Después de 30 min, se añadió lentamente hidróxido de amonio 5.0 M en agua (0.2 mL, 1 mmol) a 0 °C durante 5 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se purificó mediante RP-HPLC (pH = 10) para proporcionar el producto deseado. LCMS (M+H)⁺: m/z = 531.0. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.62 (br, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.51 (dd, J = 8.8, 1.2 Hz, 1H), 7.78 (br, 1H), 7.35 (dd, J = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 11.9, 7.3 Hz, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.70 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 4.44 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 1.30 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

Ejemplo 15. 5-{3-(cianometil)-3-[4-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carboxamida



Etapas 1: 5-{3-(cianometil)-3-[4-(1-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxilato de metilo

La N,N-diisopropiletilamina (1.0 mL, 6.0 mmol) se añadió a una mezcla de diclorhidrato de {3-[4-(1-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (0.96 g, 2.0 mmol) y 5-cloropirazin-2-carboxilato de metilo (0.34 g, 2.0 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL). La mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante la noche. La mezcla se trató con NaHCO₃ acuoso saturado y se extrajo con diclorometileno (3x 20 mL).

Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice con acetato de etilo en hexanos (0-60 %) para proporcionar el producto deseado (0.13 g, 12 %). LCMS (M+H)⁺: m/z = 545.2.

Etapla 2: Ácido 5-{3-(cianometil)-3-[4-(1-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxílico

Una mezcla de reacción de 5-{3-(cianometil)-3-[4-(1-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo [2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxilato de metilo (0.13 g, 0.24 mmol), hidróxido de litio monohidratado (0.025 g, 0.60 mmol) en metanol (4.0 mL), THF (2.0 mL) y agua (1.0 mL) se agitó a 40 °C durante 3 h. La mezcla se ajustó a pH = 4 con solución acuosa de HCl 2.0 N y se concentró a presión reducida para retirar el MeOH y THF. El precipitado formado se filtró, se lavó con agua y éter, y se secó al vacío para proporcionar el producto deseado (0.100 g, 79 %). LCMS (M+H)⁺: m/z = 531.4.

Etapla 3: 5-{3-(cianometil)-3-[4-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carboxamida

Se añadió N,N-diisopropiletilamina (19 µL, 0.11 mmol) a una mezcla de ácido 5-{3-(cianometil)-3-[4-(1-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo [2,3-b]piridin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}pirazin-2-carboxílico (19.4 mg, 0.0365 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino)fosfonio (19 mg, 0.044 mmol) y 2-propanamina (3.2 mg, 0.055 mmol) en DMF (1.0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se trató con NaHCO₃ acuoso saturado y se extrajo con diclorometileno (3x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se trató con cloruro de metileno (1.3 mL) y TFA (1.3 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (1.3 mL) y se trató con etilendiamina (0.086 mL, 1.3 mmol). La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se purificó por RP-HPLC (pH = 10) para proporcionar el producto deseado. LCMS (M+H)⁺: m/z = 442.1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆): δ 12.19 (br, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.66 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.32 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 3.2, 2.7 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 3.5, 2.7 Hz), 4.82 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 4.56 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.79 (s, 2H), 1.17 (d, J = 6.4 Hz, 6H).

Ejemplo 16: Tris(trifluoroacetato) de {1-(cis-4-{[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetónitrilo

A una mezcla de tetrahidrofurano (40 mL) y NaH en aceite mineral (1.1 g, 28 mmol) a 0 °C se añadió gota a gota malonato de etilo (4.2 mL, 28 mmol). Después, se añadió 4-cloro-6-(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-ilo)-2-(trifluorometil)pirimidina (descrita en el Ejemplo 1 de la patente de los EE. UU. núm. 2013/0045963, Etapa 1) (3.75 g, 11.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 64 °C. Después de 3 horas, el análisis por HPLC y LCMS mostró que la reacción se había completado en un 70 %. Se calentó durante otras 6 horas y después se enfrió hasta 20 °C. Se formaron solo trazas del producto de descarboxilación. La reacción se diluyó con bicarbonato acuoso y se extrajo con EtOAc. El extracto de EtOAc se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó al vacío para dar 8.5 g de aceite (incluye un exceso de malonato de etilo y aceite mineral). El producto crudo se purificó por cromatografía en una columna de gel de sílice de 120 g, con el uso de disolvente A = hexano; disolvente B= EtOAc; flujo 60 mL/min; A, 3 min; Gradiente hasta 40 % de B en 40 min; detector ajustado a 254 nm; se recolectaron fracciones de 47 mL; tiempo de retención, 28 min. Las fracciones combinadas se evaporaron para dar 4.6 g de aceite incoloro, 90 % de rendimiento. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.05 (s, 1H); 5.30 (m, 1H, OCH); 4.85 (s, 1H, CH); 4.25 (m, 2H, OCH₂); 3.95 (s, 4H, OCH₂); 1.6-2.1 (m, 8H); 1.28 (t, 3H, CH₃).

Se disolvió [6-(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-ilo)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]malonato de dietilo (4.60 g, 9.95 mmol) en etanol (46 mL). Se añadió agua (18 µL, 1.0 mmol) y etóxido de sodio al 21 % en etanol (0.37 mL, 1.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 75 °C durante 1 hora. El análisis por HPLC y LCMS mostró 60 % de decarboxilación. El calentamiento continuó durante otras 2 horas (reacción completa). La reacción se diluyó con bicarbonato acuoso y se extrajo con EtOAc. El extracto de EtOAc se lavó con salmuera, después se secó (Na₂SO₄) y se evaporó al vacío para 3.4 g de aceite (88 % de rendimiento). LCMS, HPLC y NMR mostraron que

era lo suficientemente limpia para proseguir. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): δ 7.20 (s, 1H); 5.20 (m, 1H, OCH); 4.10 (q, 2H, OCH_2); 3.89 (s, 2H, CH_2); 3.85 (s, 4H, OCH_2); 1.5-2.0 (m, 8H); 1.15 (t, 3H, CH_3). HPLC mostró que tenía $\text{UV}_{\text{máx}}$ 222 y 252 nm.

Etapa 3: 2-[6-(1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-iloxi)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]etanol

El [6-(1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-iloxi)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]acetato de etilo (3.0 g) se disolvió en tetrahidrofurano (40 mL) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió tetrahidroborato de sodio (884 mg, 23.4 mmol) seguido de metanol (4.8 mL, 120 mmol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min, se retiró el baño de hielo y se agitó a 21 °C durante 0.5 horas. HPLC y LCMS mostraron que no quedaba éster y mostraron la conversión a la M+H 349 deseada; además, mostraron varios productos de sobre-reducción (al menos uno de los cuales no tiene absorbancia en UV). La mezcla de reacción se inactivó con agua y se evaporó. La mezcla de reacción se diluyó con bicarbonato acuoso y EtOAc, y se agitó durante 0.5 horas. La capa de EtOAc se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se evaporó para dar 3.0 g de aceite. El producto se purificó por cromatografía en una columna de gel de sílice de 120 g, con el uso de disolvente A = hexano; disolvente B= 3 % iPA/EtOAc; flujo 60 mL/min; A, 3 min; gradiente hasta 50 % de B en 30 min, después, 50 % de B durante 15 min; detector ajustado a 254 nm; se recolectaron fracciones de 47 mL; tiempo de retención, 34 min. Se evaporó para producir 1.5 g de un aceite viscoso de color amarillo claro, 56 % de rendimiento. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): δ 7.10 (s, 1H); 5.20 (m, 1H, OCH); 4.71 (t, 1H, OH); 3.85 (s, 4H, OCH_2); 3.72 (q, 2H, OCH_2); 2.85 (t, 2H, CH_2); 1.5-2.0 (m, 8H).

Etapa 4: 4-{[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexanona

Se disolvió 2-[6-(1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-iloxi)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]etanol en acetona (60 mL, 900 mmol), se añadió cloruro de hidrógeno 5.0 M en agua (20 mL, 98 mmol) y se agitó durante 17 horas. El análisis por LCMS y HPLC mostró una conversión casi completa a M+H 305. Se añadió bicarbonato acuoso, la mezcla de reacción se agitó y después se concentró. Esta mezcla se extrajo con EtOAc. El EtOAc se secó (Na_2SO_4) y se evaporó al vacío para dar 1.3 g de aceite viscoso de color amarillo claro (usado sin purificación en la reacción siguiente). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.80 (s, 1H); 5.60 (m, 1H, OCH); 4.06 (t, 2H, OCH_2); 3.04 (t, 2H, CH_2); 2.61 (m, 2H); 2.45 (m, 2H); 2.25 (m, 2H).

Etapa 5: {1-(4-{[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

El diclorhidrato de {3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (1.9 g, 3.9 mmol) y 4-{[6-(2-

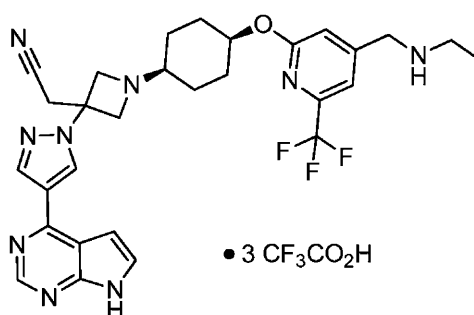
hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexanona (1.3 g, 4.3 mmol) se agitaron en tetrahidrofurano seco (36 mL) durante 15 min en atmósfera de nitrógeno. Después, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1.7 g, 8.2 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 horas. El análisis por HPLC y LCMS mostró una conversión neta a los productos *trans* y *cis* (M+H 698; relación 1:1). La reacción se inactivó con agua, se concentró, se agitó con KHCO₃ al 20 % y se extrajo con acetato de etilo, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó para dar 2.8 g. Los productos isómeros se separaron por LCMS preparativa con el uso de un instrumento Waters y una columna de 30 mm×100 mm Xbridge C18; 60 mL/min; 55 % CH₃CN-H₂O (NH₄OH al 0.1 %); 0.5 min; 4.5 gradiente a 72 %; 24 corridas; tiempo de retención del isómero *trans*, 4.6 min; isómero *cis*, 5.4 min. El isómero *cis* aislado contenía <1 % de isómero *trans* residual. Rendimiento: 1.00 g de isómero *cis*, 37 % de rendimiento. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; además COSY, HSQC y HMBC): δ 8.83 (s, 1H); 8.40 (s, 1H); 8.28 (s, 1H); 7.40 (m, 1H); 6.80 (m, 1H); 6.67 (s, 1H); 5.64 (s, 2H, SEM); 5.17 (m, 1H, OCH); 4.01 (t, 2H, OCH₂); 3.74 (s, 2H, NCH); 3.59 (m, 2H, NCH); 3.55 (t, 2H, SEM); 3.38 (s, 2H, CH₂CN); 2.95 (t, 2H, CH₂); 2.30 (m, 1H, NCH); 2.15 (m, 2H); 1.84 (m, 2H); 1.50 (m, 2H); 1.30 (m, 2H); 0.90 (t, 2H, SEM); -0.92 (s, 9H, SEM).

Etapas 6: Tris(trifluoroacetato) de {1-(*cis*-4-{[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetid-3-il}acetonitrilo

El isómero de {1-(4-{[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetid-3-il}acetonitrilo se disolvió en cloruro de metileno (18 mL) y ácido trifluoroacético (TFA, 18 mL, 230 mmol) y se agitó durante 1.0 hora. La solución se concentró para retirar el TFA. La LCMS mostró una conversión al intermedio hidroximetilo, M+H 598, algo de su éster TFA, M+H 694 y <5 % de SEM residual. El residuo se disolvió en metanol (36 mL) y se añadió hidróxido de amonio 15.0 M en agua (9.0 mL, 130 mmol). La solución se agitó a 21 °C durante 18 horas. La HPLC y LCMS mostraron que no quedaba el pico de M+H 598 o el éster TFA. La solución se evaporó. El trifluoroacetato de amonio se retiró por adición de bicarbonato acuoso y extracción del producto con EtOAc. El extracto combinado de EtOAc se evaporó para dar 0.96 g. Este se disolvió en 70 mL de H₂O/ACN al 10 % que contenía 1.5 equiv. de TFA (180 µL). El producto se aisló por LCMS preparativa con el uso de un instrumento Waters Fraction-Linx y una columna Sunfire C18 de 30 mm×100 mm; 60 mL/min; 15 % ACN-H₂O (TFA al 0.1 %), 0.5 min; gradiente de 4.5 min a 33 %; detector ajustado a m/z 568; 14 corridas; tiempo de retención 5.0 min. HPLC mostró UV_{máx.} 224, 252, 294 y 318 nm. Las fracciones combinadas se liofilizaron. Rendimiento 1.0 g de sólido (80 % de rendimiento) de color blanco. La NMR mostró

que era la sal 2.5 TFA. ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN ; además, COSY, HSQC y HMBC): δ 10.84 (s, 1H, NH); 9.00 (s, 1H); 8.90 (s, 1H); 8.56 (s, 1H); 7.66 (m, 1H); 7.10 (m, 1H); 6.86 (s, 1H); 5.39 (m, 1H, OCH); 4.86 (brs, 2H, NCH); 4.66 (m, 2H, NCH); 3.90 (t, 2H, OCH_2); 3.78 (s, 2H, CH_2CN); 3.39 (m, 1H, NCH); 2.92 (t, 2H, CH_2); 2.20 (m, 2H); 1.92 (m, 2H); 1.76 (m, 4H). ^{19}F NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -69.8 (s); -74.8 (s, TFA); LCMS calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_9\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z =568.24

Ejemplo 17: Tris(trifluoroacetato) de {1-(*cis*-4-{[4-(etilamin)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo



Etapas 1: Metanosulfonato de [2-[(*cis*-4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il]ciclohexil)oxi]-6-(trifluorometil)piridin-4-il]metilo

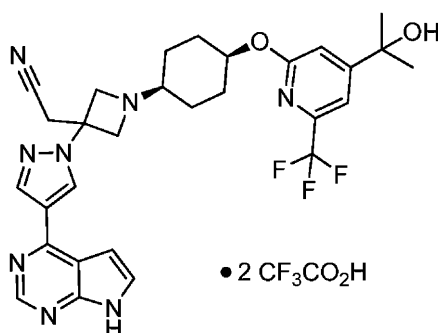
El {1-(*cis*-4-{[4-(hidroximetil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (del Ejemplo 64 de la patente de los EE. UU. núm. 2013/0045963, 145.0 mg, 0.2124 mmol) se disolvió en cloruro de metileno (2.93 mL) y se enfrió hasta 0 °C. A eso se añadió N,N-diisopropiletilamina (60.5 L, 0.347 mmol) seguido de cloruro de metanosulfonilo (23 L, 0.30 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se trató con EtOAc y se usó en la reacción siguiente. MS(ES):761(M+1).

Etapas 2: Tris(trifluoroacetato) de {1-(*cis*-4-{[4-(etilamino)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

El metanosulfonato de [2-[(*cis*-4-{3-(cianometil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il]ciclohexil)oxi]-6-(trifluorometil)piridin-4-il]metilo (50 mg, 0.06571 mmol) se disolvió en 1,4-dioxano (2.5 mL) y se añadió etilamina 2.0 M en THF (300 L, 0.6 mmol). La reacción se agitó a 25 °C durante 16 horas, momento en el cual el análisis por

LCMS mostró principalmente el producto. El producto se purificó por LC, se evaporó, se desprotegió como en el Ejemplo 1 de la patente de los EE. UU. núm. 2013/0045963 y se purificó por LC para dar el producto. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 9.08 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.25 (d, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.08 (d, 2H), 4.80 (d, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.50 (m, 1H), 3.16 (q, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.01 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.34 (t, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, CD_3OD) δ -70.52 (s), -77.49 (s). MS(ES):580(M+1).

Ejemplo 18: Bis(trifluoroacetato) de {1-(*cis*-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-3-il}acetonitrilo



Etapas 1: Ácido 2-cloro-6-(trifluorometil)isonicotínico

La 2-cloro-6-(trifluorometil)piridina (1.0 g, 5.51 mmol, Oakwood Products) se disolvió en tetrahidrofurano (20 mL) y se añadió cloruro de litio-cloro(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)magnesio (1:1) 1.0 M en THF (6.610 mL, 6.610 mmol, Aldrich Co.) a 25 °C. La reacción se agitó a 25 °C durante 1 hora y se enfrió hasta

-78 °C. La reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, se inactivó con agua y se particionó entre NaOH 1 N y éter. Las fases se separaron y la fase acuosa se lavó con más éter y se acidificó con HCl concentrado hasta pH~1 y se extrajo con éter. La fase orgánica combinada se lavó con agua, NaCl saturado, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a sequedad para proporcionar el producto crudo. El análisis por NMR mostró que consistía en una mezcla ~2:1 de ácidos para y meta carboxílicos. La mezcla se usó en la reacción siguiente. NMR 440 MHz (CDCl_3) δ 8.17 (s, 1H), 8.11 (s, 1H).

Etapas 2: 2-cloro-6-(trifluorometil)isonicotinato de etilo y 2-cloro-6-(trifluorometil)nicotinato de etilo

En un vial se disolvió ácido 2-cloro-6-(trifluorometil)nicotínico (0.98 g, 4.4 mmol) y ácido 2-cloro-6-(trifluorometil)isonicotínico (1.85 g, 8.2 mmol) en

ortoformiato de etilo (5.0 mL, 30.1 mmol) y se calentó a 120 °C durante 5 horas, momento en el cual el análisis por TLC mostró que la mayor parte del material de partida se había consumido y se habían formado los productos. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con el uso de 10 % EtOAc/hexanos para dar los dos productos de éster etílico. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.14 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 4.47 (q, 2H), 1.44 (t, 3H).

Etapa 3: 2-[2-cloro-6-(trifluorometil)piridin-4-il]propan-2-ol

El 2-cloro-6-(trifluorometil)isonicotinato de etilo (0.35 g, 1.4 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (13.8 mL) y se enfrió hasta -78 °C; después, se añadió bromuro de metilmagnesio 3.0 M en éter (1.4 mL, 4.1 mmol). La reacción se agitó a -78 °C durante 3 horas, momento en el cual el análisis por LCMS mostró ausencia del material de partida. La reacción se inactivó con NH_4Cl saturado y se particionó entre agua/HCl 1 N y EtOAc, las fases se separaron y la fase acuosa se lavó con más EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con agua, NaCl saturado, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a sequedad para proporcionar el producto crudo. El análisis por NMR mostró que consistía en una mezcla ~1:1 del alcohol y el intermedio metil cetona. El material crudo se usó sin purificación en la reacción siguiente. NMR 400 MHz NMR(CDCl_3): δ 7.70 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 1.60 (s, 6H)

Etapa 4: 2-[2-(1,4-dioxaespiro[4.5]decan-8-iloxi)-6-(trifluorometil)piridin-4-il]propan-2-ol

El 1,4-dioxaespiro[4.5]decan-8-ol (0.25 g, 1.58 mmol) y 2-[2-cloro-6-(trifluorometil)piridin-4-il]propan-2-ol (0.2 g, 0.835 mmol) se disolvieron en tetrahidrofurano (2 mL), se enfrió a 0 °C y se añadió una mezcla de hidruro de sodio al 60 % (70.0 mg, 1.75 mmol) en aceite mineral; la reacción se agitó durante 30 minutos a 0 °C y a 25 °C durante 60 horas, momento en el cual el análisis por TLC indicó la presencia de cierta cantidad de producto. La reacción se inactivó con agua, se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos se lavaron con agua, NaCl saturado, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó por LC (pH 2) para dar el producto. MS(ES):362 (M+1).

Etapa 5: 4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexanona

El 2-[2-(1,4-dioxaespiro[4.5]decan-8-iloxi)-6-(trifluorometil)piridin-4-il]propan-2-ol (0.049 g, 0.14 mmol) se disolvió en acetona (3.7 mL). Se añadió una solución de cloruro de hidrógeno 12.0 M en agua (0.43 mL, 5.2 mmol) y se agitó a 25 °C durante 16 horas, momento en el cual la LCMS mostró que la reacción se había completado en aproximadamente 70 %. Se añadió más cloruro de hidrógeno 12.0 M en agua (0.43 mL, 5.2 mmol) y se agitó durante 3 horas; la LCMS mostró que la reacción se había completado en ~90 % y se inactivó con un exceso de NaHCO_3 , se extrajo con EtOAc y el extracto orgánico se evaporó para

dar el producto. Este se usó sin purificación en la reacción siguiente. MS(ES):318 (M+1).

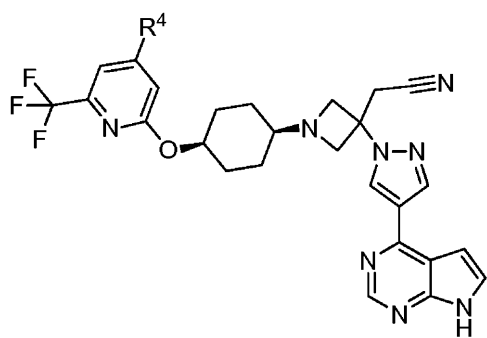
Etapas 5: {1-(cis-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

El diclorhidrato de {3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo (55.3 mg, 0.115 mmol) y 4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexanona se disolvieron en 1,2-dicloroetano seco (1.38 mL), se agitó durante 5 min y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (86.1 mg, 0.406 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 16 h, momento en el cual el análisis por LCMS mostró principalmente los dos productos diastereómeros. La reacción se inactivó con agua, se neutralizó con NaHCO₃, se extrajo con acetato de etilo y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por LCMS (pH 10) y las fracciones que contenían el segundo pico se combinaron y evaporaron para dar {1-(cis-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo. Además, se aisló el primer pico para dar {1-(trans-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo. MS(ES): 712(M+1).

Etapas 6: Bis(trifluoroacetato) de {1-(cis-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

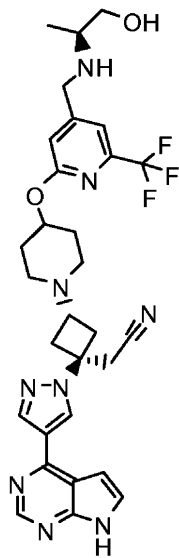
El {1-(cis-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo se desprotegió como se describe en el Ejemplo 1 de la patente de los EE. UU. núm. 2013/0045963 y se purificó por cromatografía líquida (pH 2) para dar bis(trifluoroacetato) de 1-(cis-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo. El bis(trifluoroacetato)de {1-(trans-4-{[4-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo se preparó y caracterizó de manera similar. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 9.07 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.78 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.24 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.09 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 4.82 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.5 (m, 1H), 2.27 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 1.74 (m, 4H), 1.50 (s, 6H). MS(ES): 581(M+1).

Los Ejemplos 19 y 20 más abajo se prepararon de manera análoga al procedimiento del Ejemplo 17.



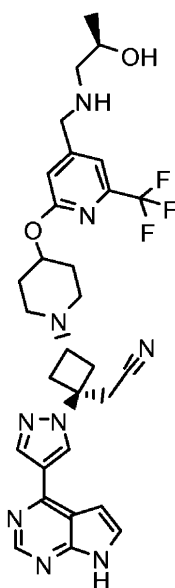
Ejemplo núm.	R4	MS (M+H)+	Nombre
19		622	Pentakis(trifluoroacetato) de {1-(<i>cis</i> -4-{[4-{[(3R)-3-hidroxipirrolidin-1-il]metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo
20		622	Tris(trifluoroacetato) de {1-(<i>cis</i> -4-{[4-{[(3S)-3-hidroxipirrolidin-1-il]metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo

Ejemplo 21. {trans-3-(4-{4-{[(1S)-2-hidroxi-1-metiletil]amino}metil}-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo



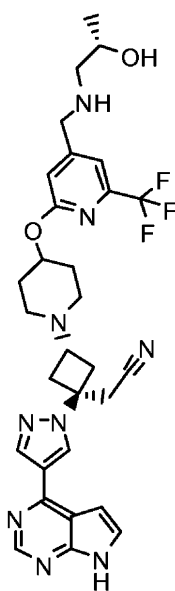
Se añadió N,N-diisopropiletilamina (9.4 μ L, 0.054 mmol) y anhídrido metanosulfónico (7.9 mg, 0.045 mmol) a una solución de {trans-3-(4-{[4-(hidroximetil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo (10.0 mg, 0.018 mmol, pico 1 del Ejemplo de intermedio A2 de la patente de los EE. UU. núm. 2014/0005166, Etapa F) en cloruro de metileno (0.30 ml) y el mesilato formado se agitó durante 30 minutos. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se volvió a disolver en una mezcla de tetrahidrofurano (0.30 mL) y metanol (0.10 mL), y se añadió (2S)-2-aminopropan-1-ol (20. μ L, 0.27 mmol, Acros). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante la noche. El disolvente se retiró al vacío y el producto crudo se desprotegió mediante agitación con TFA:DCM 1:1 durante una hora, después se concentró y se agitó con etilendiamina (0.10 mL) en metanol (1.0 mL) hasta que la desprotección, determinada por LCMS, fue completa. El producto se purificó con el uso de HPLC-MS preparativa (C18 eluida con un gradiente de MeCN/H₂O que contenía NH₄OH al 0.15 %). El eluyente se congeló y se liofilizó para proporcionar el producto como la base libre (6.0 mg, 54 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.74 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.00 – 6.97 (m, 2H), 5.23 – 5.00 (m, 1H), 3.90 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 10.9, 4.9 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 10.9, 6.9 Hz, 1H), 3.31 (s, 2H), 3.16 – 3.05 (m, 2H), 2.95 (p, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.83 – 2.63 (m, 3H), 2.56 – 2.42 (m, 2H), 2.39 – 2.23 (m, 2H), 2.19 – 2.04 (m, 2H), 1.93 – 1.75 (m, 2H), 1.05 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). ¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃OD) δ -70.30 (s). LCMS (M+H)⁺: 610.3

Ejemplo 22. {trans-3-(4-{[4-({[(2R)-2-hidroxipropil]amino}metil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo



Se siguió el procedimiento del Ejemplo 9 de la patente de los EE. UU. núm. 2014/0005166, con el uso de (2R)-1-aminopropan-2-ol (12 μ L, 0.15 mmol, Aldrich) en la etapa de desplazamiento, que se realizó a 50 $^{\circ}$ C durante 2 horas. El producto se obtuvo como la base libre (8.7 mg, 46 %). ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 12.13 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.11 – 4.90 (m, 1H), 4.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.67 (tt, J = 10.3, 5.6 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 3.11 – 2.96 (m, 2H), 2.81 (p, J = 7.5 Hz, 1H), 2.74 – 2.56 (m, 2H), 2.46 – 2.25 (m, 4H), 2.24 – 2.09 (m, 2H), 2.09 – 1.90 (m, 2H), 1.81 – 1.51 (m, 2H), 1.03 (d, J = 6.2 Hz, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, d_6 -DMSO) δ -67.29 (s). LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$): 610.3.

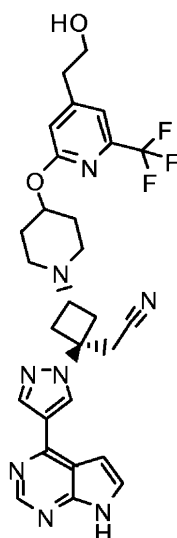
Ejemplo 23. {trans-3-(4-{[4-({[(2S)-2-hidroxipropil]amino}metil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo



Se siguió el procedimiento del Ejemplo 9 de la patente de los EE. UU. núm. 2014/0005166, con el uso de (2S)-1-aminopropan-2-ol (12 μ L, 0.15 mmol, Aldrich) en la etapa de desplazamiento, que se realizó a 50 $^{\circ}$ C durante 2 horas (7.9 mg, 42 %). ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 12.13 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.27 – 4.71 (m, 1H), 4.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.72 – 3.62 (m, 1H), 3.42 (s, 2H), 3.09 – 2.96 (m, 2H), 2.81 (p, J = 7.4 Hz, 1H), 2.72 – 2.55 (m, 2H), 2.43 – 2.25 (m, 4H), 2.25 – 2.08 (m, 2H), 2.08 – 1.96 (m, 2H), 1.78 – 1.57 (m,

2H), 1.03 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ -67.29 (s). LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 610.3.

Ejemplo 24. {trans-3-(4-{[4-(2-hidroxietil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo



El {trans-3-(4-{[4-(2-hidroxietil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi}piperidin-1-il)-1-[4-(7-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil}acetonitrilo (9.0 mg, 0.013 mmol, pico 2 del Ejemplo de intermedio A4 de la patente de los EE. UU. núm. 2014/0005166, Etapa 3) se desprotegió y purificó por agitación durante una hora en una mezcla de cloruro de metileno (0.50 mL) y ácido trifluoroacético (0.50 mL). Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se agitó en metanol (0.1 mL) que contenía etilendiaminadiamina (0.1 mL). La purificación mediante HPLC-MS preparativa (C18 eluida con un gradiente de $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ que contenía NH_4OH al 0.15 %) dio el producto como la base libre (5.8 mg, 79 %). ^1H NMR (300 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 12.12 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.08 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.99 (tt, $J = 8.2, 4.1$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.66 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 3.11 – 2.95 (m, 2H), 2.90 – 2.71 (m, 3H), 2.71 – 2.56 (m, 2H), 2.44 – 2.30 (m, 2H), 2.15 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 2.09 – 1.82 (m, 2H), 1.83 – 1.58 (m, 2H). ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ -67.26 (s). LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 567.2.

Ejemplo A: Ensayo *in vitro* de quinasas JAK

Los compuestos de la presente descripción se ensayaron para determinar la actividad inhibidora de objetivos JAK de acuerdo con el siguiente

ensayo *in vitro* descrito en Park *et al.*, *Analytical Biochemistry* **1999**, 269, 94-104. Los dominios catalíticos de la JAK1 (a.a. 837-1142), JAK2 (a.a. 828-1132) y JAK3 (a.a. 781-1124) humanas con una cola de His N-terminal se expresaron con el uso de baculovirus en células de insecto y se purificaron. La actividad catalítica de la JAK1, JAK2 o JAK3 se ensayó mediante la medición de la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado se detectó por fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF, por sus siglas en inglés). Se midieron las Cl_{50} de los compuestos para cada quinasa en reacciones de 40 microlitros que contenían la enzima, ATP y 500 nM de péptido en solución reguladora Tris 50 mM (pH 7.8) con 100 mM de NaCl, 5 mM de DTT y 0.1 mg/mL (0.01 %) de BSA. Para las mediciones de Cl_{50} 1 mM, la concentración de ATP en las reacciones fue 1 mM. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se inactivaron con 20 μ L de 45 mM de EDTA, 300 nM de SA-APC y 6 nM de Eu-Py20 en solución reguladora de ensayo (Perkin Elmer, Boston, MA). La unión al anticuerpo marcado con europio se realizó durante 40 minutos y la señal de HTRF se midió en un lector de placa Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). Ver en la Tabla 2 los datos de los compuestos de los ejemplos, evaluados mediante el ensayo del Ejemplo A con 1 mM de ATP.

Ejemplo B: Ensayos celulares

Las líneas celulares cancerosas dependientes de citocinas y, por lo tanto, la transducción de señales JAK/STAT, para crecimiento, pueden colocarse en placas a razón de 6000 células por pocillo (formato de placa de 96 pocillos) en RPMI 1640, 10 % de FBS y 1 nG/mL de citocina adecuada. Los compuestos pueden añadirse a las células en DMSO/medio (concentración final 0.2 % de DMSO) e incubarse durante 72 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. El efecto del compuesto sobre la viabilidad celular se evalúa mediante el uso del ensayo CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability (Promega) seguido de cuantificación TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Los posibles efectos fuera de objetivo de los compuestos se miden en paralelo con el uso de una línea celular no dirigida por JAK con la misma lectura del ensayo. Todos los experimentos se realizan, típicamente, por duplicado.

Las líneas celulares anteriores pueden usarse, además, para examinar los efectos de los compuestos sobre la fosforilación de las quinasas JAK o posibles sustratos corriente abajo, tales como proteínas STAT, Akt, Shp2 o Erk. Estos experimentos pueden realizarse después de una privación de citocinas durante la noche, seguido de una preincubación breve con el compuesto (2 horas o menos) y estimulación de citocinas de aproximadamente 1 hora o menos. Después, las proteínas se extraen de las células y se analizan mediante técnicas

familiares para los expertos en la materia, que incluyen transferencia Western o ELISA, con el uso de anticuerpos que puedan diferenciar entre proteína fosforilada y proteína total. Estos experimentos pueden usar células normales o cancerosas para investigar la actividad de los compuestos sobre la biología de supervivencia de células tumorales o sobre mediadores de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, con respecto a estos últimos, puede usarse citocinas tales como IL-6, IL-12, IL-23 o IFN para estimular la activación de JAK, lo que da como resultado la fosforilación de una o más proteínas STAT y, potencialmente, perfiles de transcripción (evaluados por tecnología de matrices o qPCR) o la producción y/o secreción de proteínas, tales como IL-17. La capacidad de los compuestos para inhibir estos efectos mediados por citocinas puede medirse con el uso de técnicas comunes para los expertos en la materia.

Los compuestos de la presente descripción pueden ensayarse, además, en modelos celulares diseñados para evaluar su potencia y actividad contra JAK mutantes, por ejemplo, la mutación JAK2V617F que se encuentra en trastornos proliferativos mieloides. Estos experimentos usan, frecuentemente, células dependientes de citocinas de linaje hematológico (por ejemplo, BaF/3), en las cuales se expresan ectópicamente las quinasas JAK silvestres o mutantes (James, C., *et al. Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., *et al. JBC* 280:41893-41899). Las variables de interés incluyen los efectos de los compuestos sobre la supervivencia celular, la proliferación y proteínas JAK, STAT, Akt o Erk fosforiladas.

Ciertos compuestos de la presente descripción pueden evaluarse para determinar su actividad inhibidora de la proliferación de células T. Ese ensayo puede considerarse un segundo ensayo de proliferación dirigido por citocinas (es decir, JAK) y, además, un ensayo simplista de la supresión o inhibición inmune de la activación inmune. El siguiente es un resumen breve de la manera en que pueden realizarse esos experimentos. Se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) a partir de muestras de sangre entera humana con el uso de un método de separación Ficoll Hypaque, y las células T (fracción 2000) pueden obtenerse a partir de las PBMC por elutriación. Las células T humanas recién aisladas pueden mantenerse en medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina) a una densidad de 2×10^6 células/mL a 37 °C por hasta 2 días. Para el análisis de proliferación celular estimulada por IL-2, las células T se tratan primero con fitohemaglutinina (PHA) a una concentración final de 10 µg/mL durante 72 horas. Después de lavar una vez con PBS, se siembran 6000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se tratan

con los compuestos a concentraciones diferentes en el medio de cultivo en presencia de 100 U/mL de IL-2 humana (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Las placas se incuban a 37 °C durante 72 h y el índice de proliferación se evalúa con el uso de reactivos luminiscentes CellTiter-Glo según el protocolo sugerido por el fabricante (Promega; Madison, WI).

Ensayo C. Modelo de ratón transgénico S100A9

Se ha demostrado previamente que los ratones transgénicos S100A9 exhiben acumulación de MDSC en la médula ósea acompañada por el desarrollo de citopenias multilíneas progresivas y displasia citológica similar al MDS. Además, la maduración forzada temprana de MDSC por tratamiento con ácido todo-trans-retinoico o por la interrupción de la señalización de CD33 por la proteína adaptadora (DAP12) que contiene el motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (que contiene ITAM) rescató el fenotipo hematológico y mitigó la enfermedad. Este sistema puede ser útil para evaluar los efectos sobre la inhibición de la JAK1 en enfermedades tipo MDS en un modelo preclínico. *J. Clin. Invest.*, 123(11):4595-4611 (2013). Por consiguiente, se dosifica un inhibidor selectivo de la JAK1 mediante alimentación por sonda oral. Se monitorea la habilidad del compuesto para reducir las citopenias y la displasia citológica observada en los ratones transgénicos S100A9.

Todas las patentes, solicitudes de patente, artículos de revistas y libros se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia.