

PROCESOS PARA PREPARAR UN INHIBIDOR DE JAK1 Y NUEVAS FORMAS DE ESTE

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad del número de serie 61/986.738, presentado el 30 de abril de 2014, y el número de serie 61/986.789, presentado el 30 de abril de 2014, cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a procesos para preparar un inhibidor de JAK1, así como nuevas formas del inhibidor.

ANTECEDENTES

Las proteínas cinasas (PK) regulan diversos procesos biológicos que incluyen crecimiento, supervivencia y diferenciación celular, formación de órganos, morfogénesis, neovascularización, regeneración y reparación tisular, entre otros. Las proteínas cinasas también cumplen funciones especializadas en un huésped de enfermedades humanas incluido el cáncer. Las citocinas, polipéptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular, regulan muchas de las vías involucradas en la respuesta inflamatoria del hospedador a la sepsis. Las citocinas influyen en la diferenciación, proliferación y activación celular, y pueden modular tanto la respuesta pro-inflamatoria como anti-inflamatoria para permitir que el hospedador reaccione en forma adecuada a los patógenos. La señalización de una amplia variedad de citocinas involucra a la familia de las cinasas de Janus (JAK) de proteínas tirosinas cinasas y los Transductores de Señal y Activadores de Transcripción (STAT). Existen cuatro JAK conocidas en mamíferos: JAK1 (cinasa Janus-1), JAK2, JAK3 (también conocida como linfocito cinasa Janus; JAKL; y L-JAK) y TYK2 (proteína tirosina cinasa 2).

Las respuestas inmunitaria e inflamatoria estimuladas por citocinas contribuyen a la patogénesis de enfermedades: patologías tales como inmunodeficiencia combinada grave (SCID) se produce a raíz de la eliminación del sistema inmunitario, mientras que una respuesta inmunitaria/inflamatoria hiperactiva o inapropiada contribuye a la patología de enfermedades autoinmunitarias (p. ej., asma, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, miocarditis) y enfermedades como escleroderma y osteoartritis (Ortmann, R. A., T. Cheng, et al. (2000) *Arthritis Res* 2(1): 16-32).

La deficiencia en la expresión de JAK se asocia a diversos estados de enfermedad. Por ejemplo, los ratones Jak1^{-/-} son intervenidos durante el nacimiento, se les omite la asistencia y mueren en etapa perinatal (Rodig, S. J., M.

A. Meraz, et al. (1998) *Cell* 93(3): 373-83) en la vena de la cola. Los embriones de ratones Jak2^{-/-} son anémicos y mueren alrededor del día 12,5 postcoito debido a la ausencia de eritropoyesis definitiva.

Se cree que la vía JAK/STAT, y en particular las cuatro JAK, desempeñan un papel en la patogénesis de la respuesta asmática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis y otras enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias bajas relacionadas. Se han vinculado múltiples citocinas que señalizan a través de JAK a enfermedades/afecciones inflamatorias de las vías respiratorias altas, tales como aquellas que afectan la nariz y los senos (por ejemplo, rinitis y sinusitis) ya sean reacciones alérgicas clásicas o no. Asimismo, la vía JAK/STAT ha sido vinculada a enfermedades/afecciones inflamatorias del ojo y a respuestas alérgicas crónicas.

La activación de JAK/STAT en cánceres puede ocurrir debido a la estimulación de citocinas (por ejemplo, IL-6 o GM-CSF) o debido a la reducción de los supresores endógenos de la señalización de JAK tales como SOCS (supresores de señalización de citocinas) o PIAS (inhibidor de proteínas activadas por STAT) (Boudny, V., y Kovarik, J., *Neoplasms*. 49:349-355, 2002). La activación de la señalización de STAT, así como otras vías posteriores a las JAK (p. ej., Akt), ha sido vinculada a malos pronósticos en muchos tipos de cáncer (Bowman, T., et al. *Oncogene* 19:2474-2488, 2000). Los niveles elevados de citocinas circulantes que señalizan a través de la vía JAK/STAT desempeñan un rol causal en la caquexia y/o la fatiga crónica. Por ello, la inhibición de JAK puede ser beneficiosa para pacientes con cáncer por diversas razones que se extienden más allá de su posible actividad anti-tumoral.

La tirosina cinasa JAK2 puede ser beneficiosa para pacientes con trastornos mieloproliferativos, por ejemplo, policitemia vera (PV), trombocitopenia esencial (ET), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) (Levin, et al., *Cancer Cell*, vol. 7, 2005: 387-397) en la vena de la cola. La inhibición de la cinasa JAK2V617F disminuye la proliferación de células hematopoyéticas, lo que sugiere que JAK2 es un objetivo potencial para la inhibición farmacológica en pacientes con PV, ET y MMM.

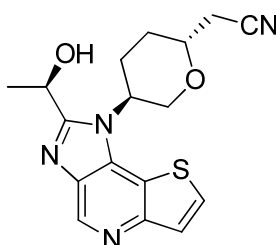
La inhibición de JAK puede beneficiar a pacientes que padecen trastornos inmunes de la piel, como psoriasis, y de sensibilización de la piel. Se cree que la permanencia de la psoriasis depende de varias citocinas inflamatorias además de varias quimiocinas y factores de crecimiento (JCI, 113:1664-1675), muchos de los cuales señalizan a través de JAK (*Adv Pharmacol.* 2000;47:113-74).

Por lo tanto, se necesitan continuamente agentes nuevos o mejorados que inhiben las cinasas como las JAK para desarrollar productos farmacéuticos nuevos y más efectivos diseñados para aumentar o suprimir las vías inmunitaria e inflamatoria

(como agentes inmunosupresores para los trasplantes de órganos), así como agentes para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades que comprenden una respuesta inflamatoria hiperactiva (p. ej., eccema), alergias, cáncer (p. ej., de próstata, leucemia, mieloma múltiple) y algunas reacciones inmunitarias (p. ej., erupción en la piel o dermatitis de contacto o diarrea) causada por otros agentes terapéuticos. Los compuestos de la invención, así como sus composiciones y métodos descritos en la presente, se refieren a estas necesidades y a otros fines.

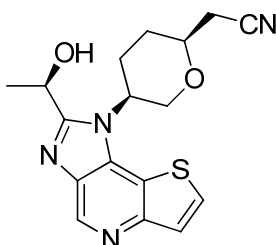
COMPENDIO

La presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula Ia:



Ia

que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula Ib:



Ib

con una base fuerte en presencia de un primer componente solvente.

La presente solicitud proporciona una forma anhidra de 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo.

La presente solicitud también proporciona una forma monohidrato de 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo.

La presente solicitud además proporciona diversos intermedios útiles en la síntesis del compuesto de fórmula Ia.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una característica de termograma de DSC del compuesto del ejemplo 9.

La figura 2 muestra una característica de termograma de TGA del compuesto del ejemplo 9.

La figura 3 muestra una característica de patrón XRPD del compuesto del ejemplo 9.

La figura 4 muestra una característica de termograma de DSC del compuesto del ejemplo 10.

La figura 5 muestra una característica de termograma de TGA del compuesto del ejemplo 10.

La figura 6 muestra una característica de patrón XRPD del compuesto del ejemplo 10.

La figura 7 muestra una característica de isoterma de sorción/desorción de vapor (1º ciclo) del compuesto del ejemplo 9.

La figura 8 muestra una característica de isoterma de sorción/desorción de vapor (4º ciclo) del compuesto del ejemplo 9.

La figura 9 muestra una superposición del patrón XRPD del compuesto del ejemplo 9 antes y después de un estudio de sorción de vapor dinámica (DVS).

La figura 10 muestra una característica de patrón XRPD del compuesto del ejemplo 9 después de 5 días en una cámara de humedad fijada a 75 % de humedad relativa y 40 °C.

La figura 11 muestra una característica de termograma de TGA del compuesto del ejemplo 9 después de 5 días en una cámara de humedad fijada a 75 % de humedad relativa y 40 °C.

La figura 12 muestra un termograma de DSC del compuesto del ejemplo 9 después de 5 días en una cámara de humedad fijada a 75 % de humedad relativa y 40 °C.

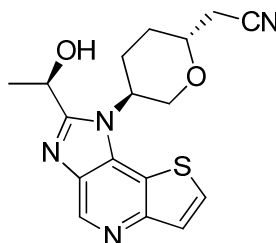
La figura 13 muestra una característica de patrón XRPD del compuesto del ejemplo 9 después de 7 días en una cámara de humedad fijada a 90% de humedad relativa y 30 °C.

La figura 14 muestra un termograma de TGA del compuesto del ejemplo 9 después de 7 días en una cámara de humedad fijada a 90% de humedad relativa y 30 °C.

La figura 15 muestra un termograma de DSC del compuesto del ejemplo 9 después de 7 días en una cámara de humedad fijada a 90% de humedad relativa y 30 °C.

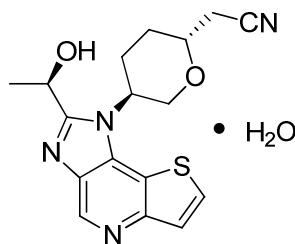
DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona, entre otros, procesos e intermedios para producir 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahydro-2H-piran-2-il)acetonitrilo, el cual es un compuesto de fórmula Ia:



Ia

así como nuevas formas del compuesto de fórmula Ia. El compuesto de fórmula Ia incluye formas anhidras e hidratadas del compuesto. Por ejemplo, la presente solicitud proporciona una nueva forma anhidra y una nueva forma monohidrato del compuesto de fórmula Ia. La forma monohidrato tiene la fórmula II:



II.

La presente solicitud proporciona una forma anhidra de 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahydro-2H-piran-2-il)acetonitrilo.

En algunas modalidades, la forma anhidra está sustancialmente aislada. En algunas modalidades, la forma anhidra es cristalina.

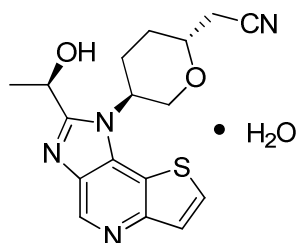
En algunas modalidades, la forma anhidra se caracteriza por un termograma de calorimetría de barrido diferencial que tiene un pico endotérmico que tiene un comienzo a aproximadamente 185 °C. En algunas modalidades, la forma anhidra se caracteriza por un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 190 °C. En algunas modalidades, la forma anhidra tiene un termograma de DSC sustancialmente como se muestra en la figura 1.

En algunas modalidades, la forma anhidra se caracteriza por un termograma de análisis termogravimétrico (TGA) que tiene una pérdida de peso de aproximadamente 1,25 % hasta 200 °C. En algunas modalidades, la forma anhidra tiene un termograma de TGA sustancialmente como se muestra en la figura 2.

En algunas modalidades, la forma anhidra tiene al menos un pico de XRPD, en

términos de 2-theta, seleccionado de aproximadamente 8,8°, aproximadamente 10,5°, aproximadamente 16,3°, aproximadamente 17,5°, aproximadamente 19,1°, aproximadamente 21,2°, aproximadamente 24,0° y aproximadamente 26,4°. En algunas modalidades, la forman anhidra tiene al menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,8°, aproximadamente 10,5°, aproximadamente 16,3°, aproximadamente 17,5°, aproximadamente 19,1°, aproximadamente 21,2°, aproximadamente 24,0° y aproximadamente 26,4°. En algunas modalidades, la forman anhidra tiene al menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,8°, aproximadamente 10,5°, aproximadamente 16,3°, aproximadamente 17,5°, aproximadamente 19,1°, aproximadamente 21,2°, aproximadamente 24,0° y aproximadamente 26,4°. En algunas modalidades, la forman anhidra tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,8°, aproximadamente 10,5°, aproximadamente 16,3°, aproximadamente 17,5°, aproximadamente 19,1°, aproximadamente 21,2°, aproximadamente 24,0° y aproximadamente 26,4°. En algunas modalidades, la forman anhidra tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,8°, aproximadamente 16,3°, aproximadamente 19,1°, aproximadamente 24,0° y aproximadamente 26,4°. En algunas modalidades, la forman anhidra tiene un patrón XRPD sustancialmente como se muestra en la figura 3. En algunas modalidades, la forma anhidra tiene una isoterma de sorción/desorción de vapor sustancialmente como se muestra en la figura 7. En algunas modalidades, la forma anhidra tiene una isoterma de sorción/desorción de vapor sustancialmente como se muestra en la figura 8.

La presente solicitud también proporciona una forma monohidrato de monohidrato de 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahydro-2H-piran-2-il)acetonitrilo, el cual es un compuesto de fórmula II:



II.

En algunas modalidades, la forman monohidrato tiene un contenido de agua de aproximadamente el 5 %. En algunas modalidades, la forma monohidrato está sustancialmente aislada. En algunas modalidades, la forma monohidrato es cristalina.

En algunas modalidades, la forma monohidrato se caracteriza por un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico que tiene un comienzo a aproximadamente 69 °C. En algunas modalidades, la forma monohidrato se caracteriza por un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 106 °C.

En algunas modalidades, la forma monohidrato se caracteriza por un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico que tiene un comienzo a aproximadamente 131 °C. En algunas modalidades, la forma monohidrato se caracteriza por un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 140 °C. En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene un termograma de DSC sustancialmente como se muestra en la figura 4.

En algunas modalidades, la forma monohidrato se caracteriza por un termograma de TGA que tiene una pérdida de peso de aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 150 °C. En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene un termograma de TGA sustancialmente como se muestra en la figura 5.

En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene al menos un pico de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de aproximadamente 8,5°, aproximadamente 8,7°, aproximadamente 14,6°, aproximadamente 15,1°, aproximadamente 19,4°, aproximadamente 25,1° y aproximadamente 26,5°. En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene al menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,5°, aproximadamente 8,7°, aproximadamente 14,6°, aproximadamente 15,1°, aproximadamente 19,4°, aproximadamente 25,1° y aproximadamente 26,5°. En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene al menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,5°, aproximadamente 8,7°, aproximadamente 14,6°, aproximadamente 15,1°, aproximadamente 19,4°, aproximadamente 25,1° y aproximadamente 26,5°. En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 8,5°, aproximadamente 8,7°, aproximadamente 14,6°, aproximadamente 15,1°, aproximadamente 19,4°, aproximadamente 25,1° y aproximadamente 26,5°. En algunas modalidades, la forma monohidrato tiene un patrón XRPD sustancialmente como se muestra en la figura 6.

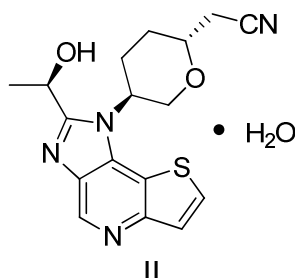
Usualmente, se considera que un patrón de XRPD de los reflejos (picos) representa una huella de una forma cristalina particular. Es sabido que las intensidades relativas de los picos de XRPD pueden variar ampliamente conforme a, entre otros, la técnica de preparación de la muestra, la distribución de tamaño de los cristales, diversos filtros utilizados, el procedimiento de fijación de la muestra y el instrumento particular utilizado. En algunos casos, se pueden observar picos nuevos o pueden desaparecer picos existentes conforme al tipo de

instrumento o las configuraciones. Tal como se usan en la presente, el término "pico" hace referencia a un reflejo con una altura/intensidad relativa de al menos alrededor del 4% del pico de altura/intensidad máximo. Asimismo, la variación del instrumento y otros factores pueden afectar los valores de 2 theta. Por ende, las asignaciones de los picos, tales como las informadas en la presente, pueden variar en más o menos aproximadamente 0,2° (2-theta), y el término "sustancialmente" y "aproximadamente", tal como se utilizan en el contexto de XRPD en la presente, comprenden las variaciones mencionadas anteriormente.

En la misma forma, las lecturas de temperatura vinculadas a DSC, TGA u otros experimentos térmicos pueden variar $\pm 3^{\circ}\text{C}$ conforme al instrumento, las configuraciones particulares, la preparación de muestra, etc. Por consiguiente, se entiende que una forma cristalina respecto a la que se informa en la presente que presenta un termograma de DSC "sustancialmente" como se ilustra en cualquiera de las figuras o el término "aproximadamente" comprende dicha variación.

La presente solicitud además proporciona un proceso para formar la forma anhidra de 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo que comprende:

(i) agregar n-heptano a una primera mezcla que comprende un compuesto de fórmula II:



y un primer componente solvente, en donde el primer componente solvente comprende acetato de etilo.

En algunas modalidades, el primer componente solvente además comprende metanol.

En algunas modalidades, el proceso además comprende antes (i):

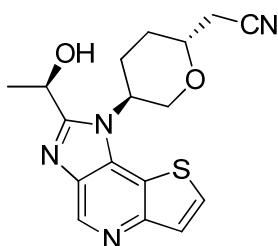
- (ii) disolver el compuesto de fórmula II en metanol para formar una segunda mezcla que comprende el compuesto de fórmula Ia y un segundo componente solvente que comprende metanol;
- (iii) filtrar y pulir la segunda mezcla; y
- (iv) agregar acetato de etilo a la segunda mezcla para formar la primera mezcla.

En algunas modalidades, el proceso además comprende calentar la primera mezcla a una temperatura de entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 75 °C.

En algunas modalidades, el proceso además comprende retirar al menos una

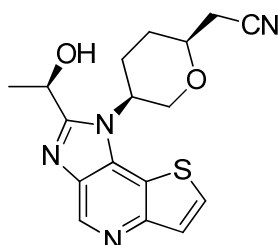
porción del acetato de etilo y metanol para formar la primera mezcla mediante destilación.

La presente solicitud además proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula Ia:



Ia

que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula Ib:



Ib

con una base fuerte en presencia de un primer componente solvente.

En algunas modalidades, la base fuerte es una base de alcóxido.

En algunas modalidades, la base fuerte es un alcóxido C₁₋₆ de metal alcalino.

En algunas modalidades, la base fuerte es *terc*-butóxido de potasio.

En algunas modalidades, el primer componente solvente comprende alcohol isopropílico.

En algunas modalidades, el primer componente solvente comprende alcohol isopropílico y tetrahidrofurano.

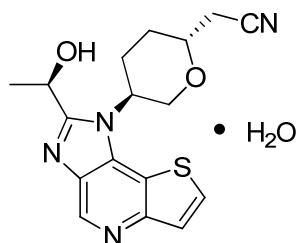
En algunas modalidades, la reacción de la composición con la base fuerte se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente.

En algunas modalidades, en donde se utiliza entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,15 equivalentes de base fuerte en base a 1 equivalente del compuesto de fórmula Ib.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula Ib está presente en una composición que comprende el compuesto de fórmula Ib y el compuesto de fórmula Ia antes de dicha reacción de dicho compuesto de fórmula Ib con dicha base fuerte.

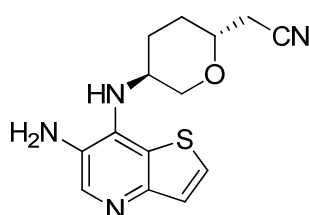
En algunas modalidades, la base fuerte que se hace reaccionar con un compuesto de fórmula Ib se denomina primera base fuerte.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula Ia se prepara como un compuesto de fórmula II:

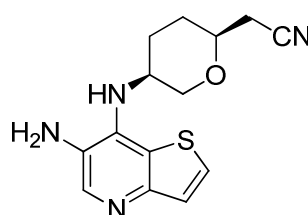


II.

En algunas modalidades, la composición que comprende un compuesto de fórmula Ia y un compuesto de fórmula Ib se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb:

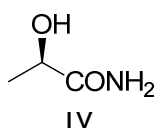


IIIa



IIIb

con un compuesto de Fórmula IV:



IV

en presencia de un reactivo alquiloxonio C_{1-6} y un segundo componente solvente.

En algunas modalidades, antes de la reacción, el compuesto de fórmula IV se hace reaccionar con dicho reactivo alquiloxonio C_{1-6} en el segundo componente solvente.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb.

En algunas modalidades, el reactivo alquiloxonio C_{1-6} es tetrafluoroborato de trietiloxonio.

En algunas modalidades, el segundo componente solvente comprende etanol.

En algunas modalidades, el segundo componente solvente comprende tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, el segundo componente solvente comprende etanol y tetrahidrofurano.

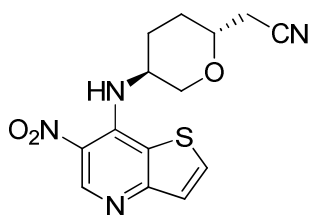
En algunas modalidades, la reacción de la composición del compuesto de fórmula IIIa y el compuesto de fórmula IIIb con el compuesto de fórmula IV se lleva a cabo

a una temperatura a reflujo.

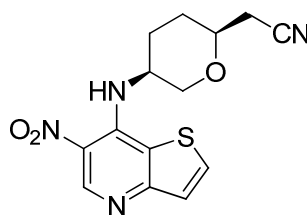
En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 equivalentes del compuesto de fórmula IV en base a 1 equivalente de la cantidad combinada del compuesto de fórmula IIIa y el compuesto de fórmula IIIb.

En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 equivalentes del reactivo alquiloxonio en base a 1 equivalente de la cantidad combinada del compuesto de fórmula IIIa y el compuesto de fórmula IIIb.

En algunas modalidades, la composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar una composición que comprende un compuesto de fórmula Va y un compuesto de fórmula Vb:



Va



Vb

con gas de hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación y un tercer componente solvente.

En algunas modalidades, el catalizador de hidrogenación es paladio en carbono.

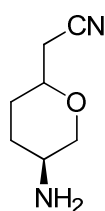
En algunas modalidades, el tercer componente solvente comprende 2,2,2-trifluoroetanol.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 35 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de una composición que comprende un compuesto de fórmula Va y un compuesto de fórmula Vb.

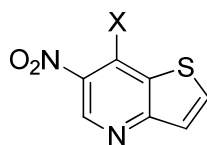
En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 % en peso del catalizador de hidrogenación en base a la masa total del compuesto de fórmula Va y el compuesto de fórmula Vb.

En algunas modalidades, la composición que comprende un compuesto de fórmula Va y un compuesto de fórmula Vb se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula VI:



VI

o una sal de este, con un compuesto de fórmula VII:

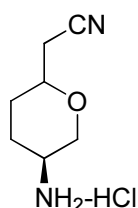


VII

en presencia de una base de amina terciaria y un cuarto componente solvente, en donde:

X es un grupo halo.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula VI, o sal de este, es una sal de fórmula VIa:



VIa.

En algunas modalidades, X es cloro.

En algunas modalidades, la base de amina terciaria es N-etil-N-isopropilpropan-2-amina.

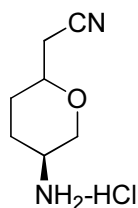
En algunas modalidades, la base de amina terciaria que está presente en la reacción del compuesto de fórmula VI se denomina primera base de amina terciaria.

En algunas modalidades, el cuarto componente solvente comprende N,N-dimetilformamida.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 75 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula VI.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula VI, o sal de este, es una sal de fórmula VIa:



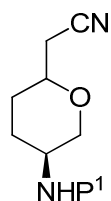
VIa;

el cuarto componente solvente comprende N,N-dimetilformamida;

la base de amina terciaria es N-etil-N-isopropilpropan-2-amina; y

X es cloro.

La presente solicitud además proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula VI que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula VIII:



VIII

en condiciones de desprotección para formar el compuesto de fórmula VI, o una sal de este;

en donde P¹ es un grupo protector amina.

En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, las condiciones de desprotección implican hacer reaccionar el compuesto de fórmula VIII con un ácido fuerte.

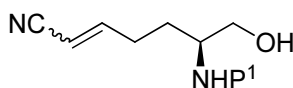
En algunas modalidades, el ácido fuerte es HCl.

En algunas modalidades, el ácido fuerte que se hace reaccionar con un compuesto de fórmula VIII se denomina primer ácido fuerte.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 40 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula VIII.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula VIII se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula IX:



IX

en presencia de una base fuerte y un quinto componente solvente, en donde ~~~~~ indica un enlace *cis* o *trans*; y P¹ es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, la base fuerte es una base de alcóxido C₁₋₆.

En algunas modalidades, la base de alcóxido es un alcóxido C₁₋₆ de metal alcalino.

En algunas modalidades, la base de alcóxido es metóxido de sodio.

En algunas modalidades, la base fuerte está presente en una cantidad catalítica.

En algunas modalidades, la cantidad catalítica comprende entre aproximadamente 0,010 y aproximadamente 0,020 equivalentes de la base fuerte en base a 1

equivalente del compuesto de fórmula IX.

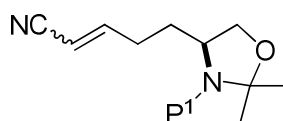
En algunas modalidades, la base fuerte que está presente en la reacción del compuesto de fórmula IX se denomina segunda base fuerte.

En algunas modalidades, el quinto componente solvente comprende tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 5 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula IX.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula IX se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula X:



X

en presencia de un ácido fuerte y un sexto componente solvente, en donde $\sim$ indica un enlace *cis* o *trans*; y P¹ es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, el ácido fuerte es ácido *p*-toluenosulfónico.

En algunas modalidades, el ácido fuerte está presente en una cantidad catalítica.

En algunas modalidades, la cantidad catalítica comprende entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,015 equivalentes del ácido fuerte en base a 1 equivalente del compuesto de fórmula X.

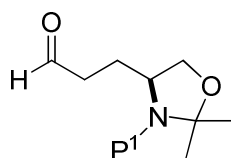
En algunas modalidades, el ácido fuerte que está presente en la reacción del compuesto de fórmula X se denomina segundo ácido fuerte.

En algunas modalidades, el sexto componente solvente comprende metanol.

En algunas modalidades, la reacción del compuesto de fórmula X en presencia del ácido fuerte se ejecuta a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente.

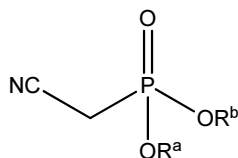
En algunas modalidades, el compuesto de fórmula X se prepara a través de un proceso que comprende:

(i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula XII:



XII

con un reactivo de Wittig en presencia de un séptimo componente solvente, en donde dicho reactivo de Wittig se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula XXI:



XXI

en presencia de una base fuerte, en donde cada uno de R^a y R^b es independientemente alquilo C_{1-6} ; y

P^1 es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P^1 es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, antes de (i), el compuesto de fórmula XXI se hace reaccionar con la base fuerte en dicho segundo componente solvente.

En algunas modalidades, cada uno de R^a y R^b es etilo.

En algunas modalidades, la base fuerte es *tert*-butóxido de potasio.

En algunas modalidades, la base fuerte que está presente en la reacción del compuesto de fórmula XXI se denomina base.

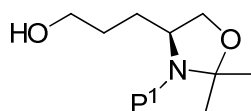
En algunas modalidades, el séptimo componente solvente comprende tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 5 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula XII.

En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 equivalentes del compuesto de fórmula XXI en base a 1 equivalente del compuesto de fórmula XII.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XII se prepara a través de un proceso que comprende oxidar un compuesto de fórmula XIII:



XIII

en donde P^1 es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P^1 es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, la oxidación comprende agregar un primer agente oxidante al compuesto de fórmula XIII para formar una primera mezcla.

En algunas modalidades, el primer agente oxidante es radical libre de 2,2,6,6-

tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).

En algunas modalidades, la adición de dicho primer agente oxidante se lleva a cabo en presencia de cloruro de tetra-N-butilamonio.

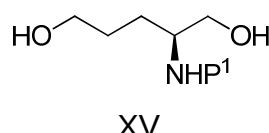
En algunas modalidades, la adición de dicho primer agente oxidante se ejecuta a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente.

En algunas modalidades, la oxidación además comprende una base y un segundo agente oxidante a dicha primera mezcla.

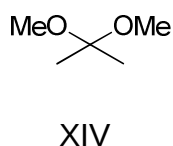
En algunas modalidades, el segundo agente oxidante es un compuesto de N-halosuccinimida.

En algunas modalidades, el segundo agente oxidante es N-clorosuccinimida.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XIII se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula XV:



con un compuesto de fórmula XIV:

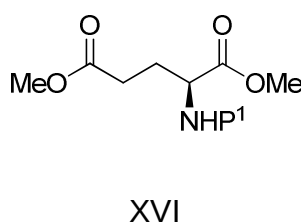


en presencia de eterato dietílico de trifluoruro de boro y un octavo componente solvente, en donde P¹ es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, el octavo componente solvente comprende acetona.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XV se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula XVI:



en presencia de un agente reductor y un noveno componente solvente, en donde P¹ es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, el agente reductor es borohidruro de litio.

En algunas modalidades, el agente reductor que está presente en la reacción del compuesto de fórmula XVI se denomina primer agente reductor.

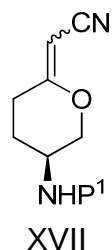
En algunas modalidades, el noveno componente solvente comprende

tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 40 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula XVI.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula VIII se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula XVII:



con gas de hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación y un décimo componente solvente;

en donde P¹ es un grupo protector amina.

El grupo ~~~ en la fórmula XVII indica que el grupo CN puede ser E o Z con respecto al oxígeno del anillo de pirano. En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

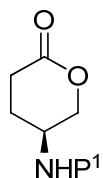
En algunas modalidades, el catalizador de hidrogenación es paladio en carbono.

En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 % en peso del catalizador de hidrogenación en base a la masa total del compuesto de fórmula XVII.

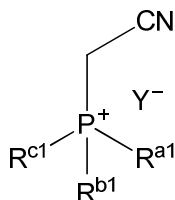
En algunas modalidades, el décimo componente solvente comprende metanol.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XVII se prepara mediante

(i) reacción de un compuesto de fórmula XVIII:



con un reactivo de Wittig en presencia de un undécimo componente solvente, en donde dicho reactivo de Wittig se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula XXI:



XXII

con una base fuerte, en donde:

cada uno de R^{a1} , R^{b1} y R^{c1} es independientemente alquilo C_{1-6} ;

Y^- es un ión de haluro; y

P^1 es un grupo protector amina.

En algunas modalidades, P^1 es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, Y^- es Cl^- .

En algunas modalidades, cada uno de R^{a1} , R^{b1} y R^{c1} es metilo.

En algunas modalidades, cada uno de R^{a1} , R^{b1} y R^{c1} es n-butilo.

En algunas modalidades, la base fuerte es *terc*-butóxido de potasio.

En algunas modalidades, la base fuerte es hexametildisilazida de litio.

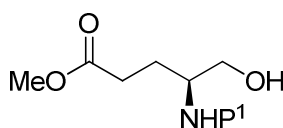
En algunas modalidades, la base fuerte que se hace reaccionar con un compuesto de fórmula XXII se denomina cuarta base fuerte.

En algunas modalidades, el undécimo componente solvente comprende tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, el undécimo componente solvente comprende N,N-dimetilacetamida.

En algunas modalidades, el undécimo componente solvente comprende tetrahidrofurano y N,N-dimetilacetamida.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XVIII se forma a través de un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula XIX:



XIX

en presencia de un ácido orgánico débil y un duodécimo componente solvente, en donde P^1 es un grupo protector amina. En algunas modalidades, P^1 es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, el ácido orgánico débil es ácido acético.

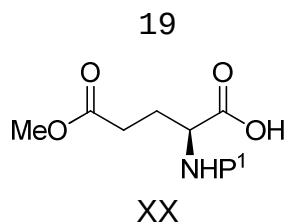
En algunas modalidades, el duodécimo componente solvente comprende tolueno.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura a reflujo.

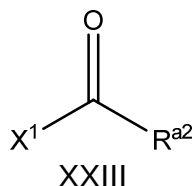
En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula XIX.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XIX se forma a través de un proceso que comprende:

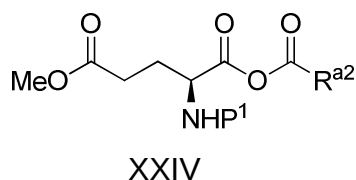
(i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula XX:



con un compuesto de fórmula XXIII:



en presencia de una base amina y de un decimotercer componente solvente para formar un compuesto de fórmula XXIV:



en donde

R^{a2} es alcoxi C₁₋₄;

X¹ es halo y

P¹ es un grupo protector amina.

En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

En algunas modalidades, el compuesto de fórmula XXIII es cloroformiato de etilo.

En algunas modalidades, la base amina es N-metilmorfolina.

En algunas modalidades, la base de amina que está presente en la reacción del compuesto de fórmula XX se denomina segunda base de amina terciaria.

En algunas modalidades, el decimotercero componente solvente comprende tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, la reacción se ejecuta a una temperatura a aproximadamente 0 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reacción se denomina reacción de un compuesto de fórmula XX.

En algunas modalidades, el proceso además comprende reducir dicho compuesto de fórmula XXIV con un agente reductor.

En algunas modalidades, el agente de reducción es borohidruro de sodio.

En algunas modalidades, el agente reductor se disuelve en un decimocuarto componente solvente.

En algunas modalidades, el agente reductor que está presente en la reducción del compuesto de fórmula XXIV se denomina segundo agente reductor.

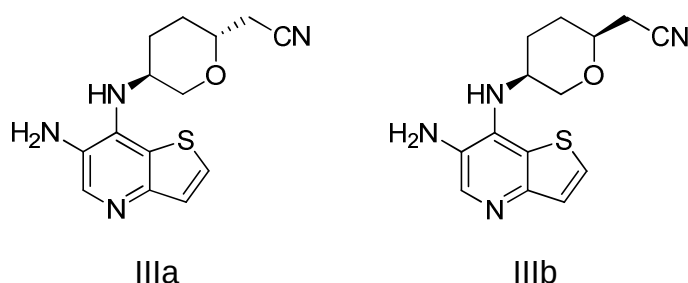
En algunas modalidades, el decimocuarto componente solvente comprende diglima.

En algunas modalidades, la reducción se ejecuta a una temperatura entre

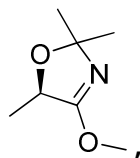
aproximadamente 70 °C y aproximadamente 80 °C.

En algunas modalidades, la etapa de reducción se denomina reducción de un compuesto de fórmula XXIV.

En algunas modalidades, la composición que comprende un compuesto de fórmula Ia y un compuesto de fórmula Ib se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb:



con (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol:



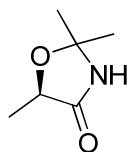
o una sal de este.

En algunas modalidades, la reacción de una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 70 °C.

En algunas modalidades, la reacción de una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb se realiza en presencia de un decimoquinto componente solvente.

En algunas modalidades, el decimoquinto componente solvente comprende metanol.

En algunas modalidades, el (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol se prepara mediante la reacción de (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona:



un tetrafluoroborato de trimetiloxonio.

En algunas modalidades, se utiliza aproximadamente 1 equivalente de tetrafluoroborato de trimetiloxonio en base a 1 equivalente de (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona.

En algunas modalidades, la reacción de (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona se realiza a aproximadamente temperatura ambiente.

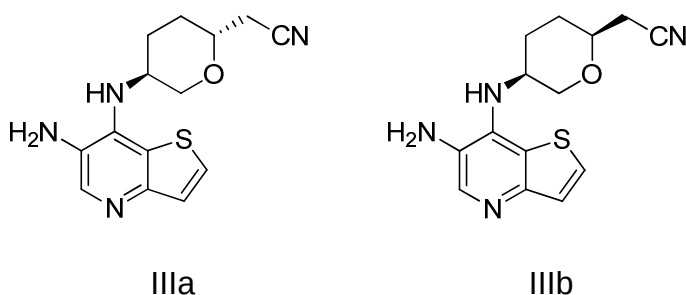
En algunas modalidades, la reacción de (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona se

realiza en presencia de un decimosexto componente solvente.

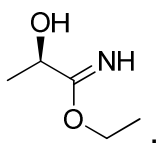
En algunas modalidades, el decimosexto componente solvente comprende diclorometano anhidro.

En algunas modalidades, las etapas de reacción de (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona con tetrafluoroborato de trimetiloxonio para formar (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol y reacción de (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol con una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb se llevan a cabo en el mismo paso sin aislar (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol.

En algunas modalidades, la composición que comprende un compuesto de fórmula Ia y un compuesto de fórmula Ib se prepara a través de un proceso que comprende hacer reaccionar una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb:



con 2-hidroxiopropanimidato de (*R*)-etilo:



En algunas modalidades, la reacción de una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 75 °C y aproximadamente 85 °C.

En algunas modalidades, la composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb además comprende un decimoséptimo componente solvente.

En algunas modalidades, el decimoséptimo componente solvente comprende etanol.

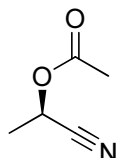
En algunas modalidades, antes de la reacción de una composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb, el 2-hidroxiopropanimidato de (*R*)-etilo se disuelve en un decimooctavo componente solvente.

En algunas modalidades, el decimooctavo componente solvente comprende tetrahidrofurano.

En algunas modalidades, antes de la reacción de la composición que comprende

un compuesto de fórmula IIIa y un compuesto de fórmula IIIb, la composición que comprende un compuesto de fórmula IIIa, un compuesto de fórmula IIIb y el decimoséptimo componente solvente se calienta a una temperatura de entre aproximadamente 75 °C y aproximadamente 85 °C.

En algunas modalidades, el 2-hidroxipropanimidato de (*R*)-etilo se prepara mediante la reacción de acetato de (*R*)-1-cianoetilo:



con etanol en presencia de un ácido fuerte.

En algunas modalidades, el ácido fuerte utilizado en la reacción de acetato de (*R*)-1-cianoetilo con etanol es cloruro de hidrógeno.

En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 2,9 y aproximadamente 3,1 equivalentes de etanol en base a 1 equivalente de 2-hidroxipropanimidato de (*R*)-etilo.

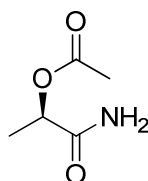
En algunas modalidades, se combina el acetato de (*R*)-1-cianoetilo y etanol para formar una mezcla de etanol.

En algunas modalidades, el ácido fuerte se agrega a la mezcla de etanol para formar una mezcla adicional.

En algunas modalidades, el ácido fuerte se agrega a una temperatura entre aproximadamente -45 °C y aproximadamente -35 °C.

En algunas modalidades, agregar el ácido fuerte a la mezcla de etanol para formar una mezcla adicional además comprende calentar la mezcla adicional a temperatura ambiente.

En algunas modalidades, el acetato de (*R*)-1-cianoetilo se forma mediante la reacción de acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo:



con cloruro cianúrico.

En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,5 equivalentes de cloruro cianúrico en base a 1 equivalente de acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo.

En algunas modalidades, antes de la reacción de acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo, el acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo se mezcla con un

decimonoveno componente solvente.

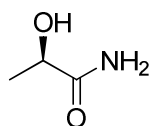
En algunas modalidades, el decimonoveno componente solvente comprende *N,N*-dimetilformamida.

En algunas modalidades, antes de la reacción de acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo, el cloruro cianúrico se disuelve en un vigésimo componente solvente.

En algunas modalidades, el vigésimo componente solvente comprende 2-metoxi-2-metilpropano.

En algunas modalidades, la reacción de acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo se realiza a aproximadamente temperatura ambiente.

En algunas modalidades, el acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo se prepara mediante la protección de (*R*)-2-hidroxipropanamida:



con cloruro de acetilo en presencia de una tercera base de amina terciaria.

En algunas modalidades, la tercera base de amina terciaria es 4-metilmorfolina.

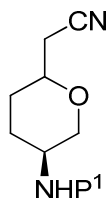
En algunas modalidades, se utiliza entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1,1 equivalentes de cloruro de acetilo en base a 1 equivalente de acetato de (*R*)-2-hidroxipropanamida.

En algunas modalidades, la protección se realiza en presencia de un vigesimoprimer componente solvente.

En algunas modalidades, el vigesimoprimer componente solvente comprende tetrahidrofurano.

La presente solicitud además proporciona intermedios útiles en la preparación del compuesto de fórmula Ia.

Por consiguiente, la presente solicitud proporciona un compuesto de fórmula VIII:

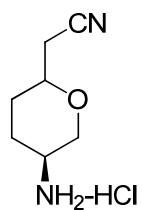


VIII

en donde P¹ es un grupo protector amina.

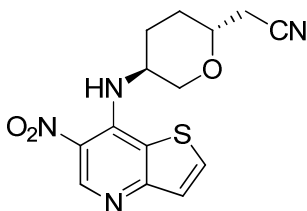
En algunas modalidades, P¹ es t-butoxicarbonilo.

La presente solicitud también proporciona una sal de fórmula VIa:



VIa.

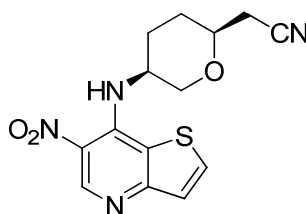
La presente solicitud también proporciona un compuesto de fórmula Va:



Va

o una sal de este.

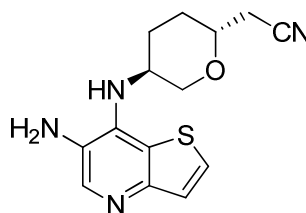
La presente solicitud también proporciona un compuesto de fórmula Vb:



Vb

o una sal de este.

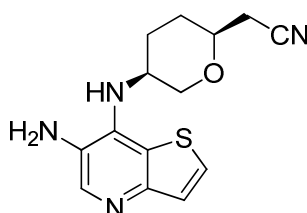
La presente solicitud también proporciona un compuesto de fórmula IIIa:



IIIa

o una sal de este.

La presente solicitud también proporciona un compuesto de fórmula IIIb:



IIIb

o una sal de este.

Además, se entiende que determinadas características de la invención que, con fines de claridad, se describen en el contexto de modalidades independientes, también se pueden proveer en combinación en una sola modalidad (mientras que se pretende que las modalidades estén combinadas como si hubieran sido escritas en forma múltiple y dependiente). Por el contrario, también pueden proporcionarse diversas características de la invención que, por motivos de brevedad, se describen en el contexto de una sola modalidad, de forma separada o en cualquier subcombinación adecuada.

En varias partes de la presente memoria descriptiva se divulgan sustituyentes de los compuestos de la invención en grupos o intervalos. Se pretende específicamente que la invención incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, se pretende que el término "alquilo C₁₋₆" describa específicamente metilo, etilo, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅ y alquilo C₆.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "reactivo de Wittig" se refiere a un iluro formado por la reacción de un compuesto de fosfonato de fórmula P(=O)(alcoxi C₁₋₆)₂(alquilo C₁₋₆-CN), en donde cada uno de los grupos alcoxi y alquilo tiene entre 1 y 6 carbonos, en presencia de una base fuerte (p. ej., terc-butoxido de potasio). En algunas modalidades, la frase "reactivo de Wittig" se refiere a un iluro formado por la reacción de una sal de fosfonio (p. ej., cloruro de cianometil(trimetil)fosfonio o cloruro de tributil(cianometil)fosfonio) en presencia de una base fuerte (p. ej., terc-butoxido de potasio).

Tal como se usa en la presente, el término "alquilo C_{n-m}" usado solo o en combinación con otros términos se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal o ramificada, con átomos de carbono de n a m. En algunas modalidades el grupo arilo contiene entre 1 y 6, 1 y 4 o 1 y 3 átomos de carbono. Los ejemplos de restos alquilo incluyen, de modo no taxativo, grupos químicos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, 2-metilo-1-butilo, 3-pentilo, *n*-hexilo, 1,2,2-trimetilpropilo y similares.

Tal como se usa en la presente, el término "alcoxi C₁₋₆" usado solo o en combinación con otros términos se refiere a un grupo de fórmula -O-alquilo, donde el grupo alquilo tiene de 1 a 6 carbonos. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi (por ejemplo, *n*-propoxi e isopropoxi), butoxi (por ejemplo, *n*-butoxi, *terc*-butoxi) y similares.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "reactivo de alquiloxonio C₁₋₆" se refiere a un reactivo que tiene un catión del grupo de fórmula (alquilo C₁₋₆)₃O⁺, en donde

el grupo alquilo C_{1-6} se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 carbonos. Algunos reactivos de alquiloxonio C_{1-6} ejemplares incluyen tetrafluoroborato de trimetiloxonio, tetrafluoroborato de trietiloxonio (reactivo de Meerwein), hexafluorofosfato de trietiloxonio, hexafluoroantimonato de trietiloxonio, y similares. Los contraiones incluyen, entre otros, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato y hexafluoroantimonato.

Como se usa en la presente, el término "amino" se refiere a un grupo de la fórmula $-NH_2$.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "base de amina" se refiere a un grupo amina monosustituido (es decir, base de amina primaria), grupo amina disustituido (es decir, base de amina secundaria) o un grupo amina trisustituido (es decir, base amina terciaria). Algunas bases amina monosustituidas ejemplares incluyen metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y similares. Algunas bases amina disustituidas ejemplares incluyen dimetilamina, dietilamina, dipropilamina, dibutilamina, pirrolidina, piperidina, azepano, morfolina y similares. En algunas modalidades, la amina terciaria tiene la fórmula $N(R')_3$, en donde cada R' es independientemente alquilo C_{1-6} , cicloalquilo de 3-10 miembros, heterocicloalquilo de 4-10 miembros, heteroarilo de 1-10 miembros y arilo de 5-10 miembros, en donde dicho cicloalquilo de 3-10 miembros, heterocicloalquilo de 4-10 miembros, heteroarilo de 1-10 miembros y arilo de 5-10 miembros están opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos alquilo C_{1-6} . Algunas bases de amina terciaria ejemplares incluyen trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, triisopropilamina, tributilamina, tri-terc-butilamina, N,N-dimetiletanamina, N-etil-N-metilpropan-2-amina, N-etil-N-isopropilpropan-2-amina, N-metilmorfolina y similares. En algunas modalidades, la frase "base de amina terciaria" se refiere a un grupo de fórmula $N(R)_3$, en donde cada R es independientemente un grupo alquilo C_{1-6} lineal o ramificado.

Según se emplea aquí, el término "cicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un resto hidrocarbonado cíclico no aromático, que opcionalmente puede contener uno o más grupos alqueno como parte de la estructura del anillo. En algunas modalidades, el cicloalquilo es un cicloalquilo de 3-10 miembros, que es monocíclico o bicíclico. En algunas modalidades, el cicloalquilo es un cicloalquilo monocíclico de 3-6 o 3-7. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen 1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptatrienilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo y similares. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

Tal como se usa en la presente, el término "arilo", empleado solo o en

combinación con otros términos, se refiere a un hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico (por ejemplo, que tiene 2, 3 o 4 anillos fusionados), tal como, de modo no taxativo, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, antracenilo, fenantrenilo y similares. En algunas modalidades, arilo es arilo C₆₋₁₀. En algunas modalidades, el grupo arilo es un anillo de naftaleno o anillo de fenilo. En algunas modalidades, el grupo arilo es fenilo.

Tal como se usa en la presente, el término "heteroarilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un resto de hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico (por ejemplo, que tiene 2, 3 o 4 anillos fusionados), tienen uno o más heteroátomos miembros del anillo seleccionados de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, heteroarilo es un heteroarilo de 5-10 miembros, que es monocíclico o bicíclico, que comprende de 1 a 9 átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros de anillo de heteroátomo independientemente seleccionados de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los ejemplos de grupo heteroarilo incluyen, de modo no taxativo, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, pirrolo, pirazolo, azolilo, oxazol, tiazol, imidazol, furano, tiofeno, quinolina, isoquinolina, indol, benzotiofeno, benzofurano, benzisoxazol, imidazo[1,2-b]tiazol, purina o similares.

Según se emplea aquí, el término "heterocicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un sistema de anillos no aromáticos, que opcionalmente puede contener uno o más grupos alquenileno o alquinileno como parte de la estructura del anillo y que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. Si el grupo heterocicloalquilo contiene más de un heteroátomo, los heteroátomos pueden ser iguales o diferentes. Los grupos cicloalquilo pueden incluir sistemas de anillos mono o policíclicos (por ejemplo, que tienen 2, 3 o 4 anillos puenteados, espirocíclicos o fusionados). En algunas modalidades, heterocicloalquilo es un heterocicloalquilo de 5-10 miembros, que es monocíclico o bicíclico, que comprende de 2 a 9 átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros de anillo de heteroátomo independientemente seleccionados de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen 1,2,3,4-tetrahidro-quinolina, azetidina, azepano, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina, pirano y un anillo de 2-oxo-1,3-oxazolidina.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "metal alcalino" incluye litio, sodio y potasio.

Tal como se usa en la presente, "halo" o "halógeno", empleado solo o en combinación con otros términos, incluye fluoro, cloro, bromo o yodo.

"Compuesto de N-halosuccinimida" ejemplar incluye, entre otros, N-clorosuccinimida, N-bromosuccinimida y N-yodosuccinimida.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "base de alcóxido" se refiere a una

base que tiene un grupo de fórmula (alquilo C_{1-6})O⁻, en donde el alquilo C_{1-6} se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 carbonos. Algunas bases de alcóxido ejemplares incluyen, entre otros, metóxido, etóxido, propóxido, isopropóxido, n-butóxido, iso-butóxido, terc-butóxido y similares.

Tal como se utiliza en la presente, la frase “alcóxido de metal alcalino” se refiere a un grupo de fórmula M(alquilo O- C_{1-6}), en donde M se refiere a un metal alcalino (p. ej., litio, sodio o potasio) y alquilo C_{1-6} se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 carbonos. Algunos alcóxidos de metal alcalino ejemplares incluyen, entre otros, metóxido de sodio, etóxido de sodio, isopropóxido de sodio, terc-butóxido de sodio, metóxido de litio, etóxido de litio, metóxido de potasio, etóxido de potasio, terc-butóxido de potasio y similares.

Tal como se utiliza en la presente, la frase “catalizador de hidrogenación” se refiere a un catalizador de metal (p. ej., paladio, níquel o rodio) adecuado para catalizar una reacción de hidrogenación (es decir, reacción de un compuesto con gas de hidrógeno). Algunos catalizadores de hidrogenación ejemplares incluyen, entre otros, paladio en carbono, catalizador de Lindlar (paladio depositado en carbonato de calcio o sulfato de bario), catalizador de Wilkinson, HRuCl(PPh₃)₃, RhCl(PPh₃)₃, [Rh(COD)Cl]₂, [Ir(COD)(PMePh₂)₂]⁺, [Rh(1,5-ciclooctadieno)(PPh₃)₂]⁺, PtO₂ (catalizador de Adam), paladio en carbono, negro de paladio, catalizador de Lindlar (paladio depositado en carbonato de calcio o sulfato de bario y tratado con plomo), y similares. En algunas modalidades, el catalizador de hidrogenación es uno que se encuentra en Nishimura, *Heterogeneous Catalytic Hydrogenation for Organic Synthesis*, 1^o edición, Wiley (17 de abril de 2001) o Chaloner, *Homogeneous Hydrogenation*, 1^o edición, Springer Países Bajos (6 de diciembre de 2010), cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

Los grupos protectores P¹ apropiados incluyen, de modo no taxativo, los grupos protectores para aminas delineados en Wuts y Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey, páginas 696-887 (y, en particular, páginas 872-887) (2007), que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Algunos grupos protectores amina ejemplares incluyen, entre otros, benciloxicarbonilo (Cbz), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo (Teoc), 2-(4-trifluorometilfenilsulfonil)etoxicarbonilo (Tsc), t-butoxicarbonilo (BOC), 1-adamantiloxicarbonilo (Adoc), 2-adamantilcarbonilo (2-Adoc), 2,4-dimetilpent-3-iloxicarbonilo (Doc), ciclohexiloxicarbonilo (Hoc), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (TcBOC), vinilo, 2-cloroetilo, 2-fenilsulfoniletilo, alilo, bencilo, 2-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, difenilo-4-piridilmetilo, N',N'-dimetilhidrazinilo, metoximetilo, t-butoximetilo (Bum), benciloximetilo (BOM), o 2-tetrahidropiranilo (THP), tri(alquilo C_{1-4})sililo (p. ej.,

tri(isopropilo)sililo), 1,1-dietoximetilo o N-pivaloiloximetilo (POM).

Algunos agentes de oxidación ejemplares incluyen periodinano Dess-Martin, radical libre de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilo (TEMPO), N-halosuccinimida (p. ej., N-bromosuccinimida, N-clorosuccinimida, N-yodosuccinimida) y similares.

Algunos agentes reductores ejemplares incluyen borohidruros de metal alcalino (p. ej., borohidruro de litio, borohidruro de sodio, borohidruro de potasio, etc.), hidruros de aluminio de metal alcalino (p. ej., hidruro de aluminio de litio, hidruro de aluminio de sodio), gas de hidrógeno (p. ej., H_2/Pd en carbono) y similares.

Algunos ácidos ejemplares pueden ser ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos e incluyen, entre otros, ácidos fuertes y débiles. Algunos ácidos ejemplares incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido p-toluenosulfónico, ácido 4-nitrobenzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido trifluoroacético y ácido nítrico. Algunos ácidos débiles incluyen, entre otros, ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico y ácido decanoico.

Algunos ejemplos de bases fuertes incluyen, de modo no taxativo, hidróxido, alcóxidos, amidas de metal, hidruros de metal, dialquilamidas de metal y arilaminas, donde los alcóxidos incluyen sales de litio, sodio y potasio de metil, etil y tbutil óxidos; las amidas de metal incluyen amida de sodio, amida de potasio y amida de litio; los hidruros de metal incluyen hidruro de sodio, hidruro de potasio e hidruro de litio y las dialquilamidas de metal incluyen sales de litio, sodio y potasio de amidas sustituidas por metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, trimetilsililo y ciclohexilo.

Todos los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de estos pueden aparecer junto con otras sustancias tales como agua y solventes (por ejemplo, en la forma de hidratos o solvatos) o pueden estar aislados.

En algunas modalidades, los compuestos de la invención o las sales de estos están sustancialmente aislados. "Sustancialmente aislado" significa que el compuesto está al menos parcial o sustancialmente separado del ambiente en el cual se formó o detectó. Una 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 el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % en peso de los compuestos de la invención, o sales de estos. Los métodos para aislar los compuestos y sus sales son habituales en la técnica.

Tal como se usa en la presente, "reaccionar" se usa tal como es usual en la técnica y hace referencia general a la unión de reactivos químicos de forma que haga posible su interacción a nivel molecular para lograr una transformación química o física. En algunas modalidades, la reacción implica dos reactivos, donde uno o más equivalentes del segundo reactivo se usan con respecto al primer reactivo. Los pasos de reacción de los procesos descritos en la presente se pueden llevar adelante por un tiempo y en condiciones adecuadas para preparar el producto identificado.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente se pueden desarrollar en solventes adecuados que un experto en la técnica de síntesis orgánica puede seleccionar. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o productos a las temperaturas a las que las reacciones se realizan, por ejemplo, temperaturas que pueden variar de la temperatura de congelamiento del solvente a la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada se puede llevar a cabo en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo del paso de reacción particular, se pueden seleccionar los solventes adecuados para un paso de reacción particular. En algunas modalidades, las reacciones se pueden realizar en ausencia de solvente, tal como cuando al menos uno de los reactivos es un líquido o gas.

Un "componente solvente" puede ser un disolvente o una mezcla de dos o más disolventes.

Como se usa en la presente, "segundo", "tercero", "cuarto", etc. como prefijo de la frase "componente solvente" se usa para diferenciar el componente solvente de otros componentes de solvente usados en etapas anteriores o posteriores del proceso y no indica que múltiples solventes deben estar presentes.

Los solventes adecuados pueden incluir solventes halogenados tales como tetracloruro de carbono, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tetracloroetilenos, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 2-cloropropano, a,a,a-trifluorotolueno, 1,2-dicloroetano, 1,2-dibromoetano, hexafluorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, 1,2-diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, mezclas de estos y similares.

Los solventes de éter adecuados incluyen: dimetoximetano, tetrahidrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, dietil éter, etilenglicol dimetiléter, etilenglicol dietiléter, dietilenglicol dimetiléter, dietilenglicol dietiléter (diglima), trietilenglicol dimetiléter, anisol, t-butil metil éter, mezclas de estos y similares.

Los solventes próticos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y no taxativo, agua, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetano, 2,2,2-trifluoroetanol,

etilenglicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, i-butil alcohol, t-butil alcohol, 2-etoxietanol, dietilenglicol, 1-, 2- o 3-pentanol, neo-pentil alcohol, t-pentil alcohol, dietilenglicol monometil éter, dietilenglicol monoetil éter, ciclohexanol, benzil alcohol, fenol o glicerol.

Los solventes apróticos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y no taxativo, tetrahidrofurano (THF), N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N-metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrilo, dimetil sulfóxido, propionitrilo, formato de etilo, acetato de metilo, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, acetato de etilo, sulfolano, N,N-dimetilpropionamida, tetrametilurea, nitrometano, nitrobenceno o hexametilfosforamida.

Los solventes de hidrocarburo adecuados incluyen benceno, ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m-, o- o p-xileno, octano, indano, nonano o naftaleno.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente se pueden realizar en el aire o en una atmósfera inerte. Típicamente, las reacciones que contienen reactivos o productos que son sustancialmente reactivos con el aire se pueden llevar a cabo usando técnicas sintéticas sensibles al aire que son conocidas por los expertos en la técnica.

En algunas modalidades, la preparación de compuestos puede implicar la adición de ácidos o bases para afectar, por ejemplo, la catálisis de una reacción deseada o la formación de formas de sales tales como sales de adición de ácidos.

Los ejemplos de ácidos pueden ser ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico. Los ácidos orgánicos incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico, ácido benzoico, ácido 4-nitrobenzoico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido tartárico, ácido trifluoroacético, ácido propiólico, ácido butírico, ácido 2-butinoico, ácido vinil acético, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico y ácido decanoico.

Los ejemplos de bases incluyen hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y bicarbonato de sodio. Algunos ejemplos de bases fuertes incluyen, de modo no taxativo, hidróxido, alcóxidos, amidas de metal, hidruros de metal, dialquilamidas de metal y arilaminas, donde los alcóxidos incluyen sales de litio, sodio y potasio de metil, etil y t-butil óxidos; las amidas de metal incluyen amida de sodio, amida de potasio y amida de litio; los hidruros de metal incluyen hidruro de sodio, hidruro de potasio e hidruro de litio y las dialquilamidas de metal incluyen sales de litio, sodio y potasio

de amidas sustituidas por metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, trimetilsililo y ciclohexilo.

Al realizar la preparación de los compuestos de acuerdo con los procesos descritos en la presente, se pueden usar las operaciones de aislamiento y purificación usuales tales como concentración, filtración, extracción, extracción de fase sólida, recristalización, cromatografía y similares, para aislar los productos deseados.

La expresión "temperatura ambiente", tal como se usan en la presente, se entiende en la técnica y se refiere generalmente a una temperatura (por ejemplo, una temperatura de reacción) que es aproximadamente la temperatura del recinto en el cual la reacción se lleva a cabo, por ejemplo, una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 30 °C.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente se pueden desarrollar a temperaturas adecuadas que el experto en la técnica puede determinar. Por ejemplo, las temperaturas de reacción dependerán de los puntos de fusión y ebullición de los reactivos y solventes, si los hubiera, de la termodinámica de la reacción (por ejemplo, puede ser necesario llevar a cabo las reacciones vigorosamente exotérmicas a temperaturas reducidas) y de la cinética de la reacción (por ejemplo, una barrera de energía de activación elevada puede requerir temperaturas elevadas).

La preparación de los compuestos descritos en la presente puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos (p. ej., protección y desprotección de grupos amina). El experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados. La química de los grupos protectores pueden encontrarse, por ejemplo, en Wuts and Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^o ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey (2007) que se incorpora en la presente en su totalidad mediante esta referencia. Los ajustes a los grupos protectores y los métodos de formación y escisión descritos en la presente se pueden ajustar como sea necesario a la vista de los varios sustituyentes.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "condiciones de desprotección" se refiere a condiciones adecuadas para escindir un grupo protector amina. En algunas modalidades, las condiciones de desprotección pueden incluir la escisión de un grupo protector en presencia de un ácido fuerte, en presencia de una base fuerte, en presencia de un agente reductor o en presencia de un agente reductor. La desprotección de un grupo protector amina se puede lograr a través de métodos conocidos en la técnica para la extracción de grupos protectores particulares para aminas, por ejemplo los que se encuentran en Wuts y Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^o ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey,

páginas 696-887 (y, en particular, páginas 872-887) (2007), que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, el tratamiento comprende hacer reaccionar el compuesto protegido en condiciones ácidas (p. ej., ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético). En algunas modalidades, la temperatura es aproximadamente temperatura ambiente, a una temperatura de entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 40 °C, o a una temperatura de entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 30 °C.

Las reacciones se pueden controlar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (p. ej., ^1H o ^{13}C), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (p. ej., visible por UV), o espectrometría de masas, o por métodos de cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina (TLC).

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se utiliza en la presente para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin un exceso de toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, de forma proporcional con una relación riesgo/beneficio razonable.

La presente invención también incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente. Tal como se utiliza en la presente, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos, donde el compuesto precursor se modifica convirtiendo un resto de ácido o base existente en su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas del compuesto principal formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. En general, dichas sales pueden prepararse mediante la reacción de las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un solvente orgánico, o una mezcla de ambos; generalmente se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol o butanol) o acetonitrilo (ACN). Una lista de sales adecuadas se encuentra en *Remington's Pharmaceutical*

Sciences, 17^o ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977), cada uno de los cuales se incorporan al presente por referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente incluyen formas de N-óxido.

Métodos

El compuesto de fórmula Ia, 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxiethyl)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahydro-2H-piran-2-il)acetonitrilo, es un inhibidor selectivo de JAK1. El compuesto de fórmula Ia inhibe JAK1 preferentemente sobre JAK2 (p. ej., tiene una relación de $IC_{50} > 10$ de JAK1/JAK2).

JAK1 cumple una función importante en una cantidad de vías de señalización del factor de crecimiento y citocinas que, cuando se desregulan, pueden dar como resultado o contribuir a los estados de enfermedad. 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, J.E. et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). Debido a las señales de IL-6, al menos en parte, a través de JAK1, que antagonizan con IL-6 directa o indirectamente a través de la inhibición de JAK1 se espera que se proporcionen beneficios clínicos (Guschin, D., N., et al *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, J. S., et al. *Lancet* 371:987, 2008). Además, en algunos cánceres JAK1 muta, lo que resulta en el crecimiento y la supervivencia de células tumorales de constitución no deseable (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci EUA*.106:9414-8, 2009; Flex E., et al. *J Exp Med*. 205:751-8, 2008). En otras enfermedades autoinmunitarias y cánceres, los niveles sistémicos elevados de las citocinas inflamatorias que activan JAK1 pueden también contribuir a la enfermedad y/o a los síntomas asociados. Por lo tanto, los pacientes con tales enfermedades podrían beneficiarse de la inhibición de JAK1. Los inhibidores selectivos de JAK1 pueden ser eficaces a la vez que evitan los efectos potencialmente no deseables e innecesarios de la inhibición de otras cinasas de JAK.

Los inhibidores selectivos de JAK1, en relación con otras cinasas de JAK, pueden presentar múltiples ventajas terapéuticas sobre los inhibidores menos selectivos. Con respecto a la selectividad contra JAK2, una cantidad de citocinas y factores de crecimiento importantes emiten una señal a través de JAK2, estos incluyen, por ejemplo, eritropoyetina (Epo) y trombopoyetina (Tpo) (Parganas E, et al. *Cell*. 93:385-95, 1998). Epo es un factor de crecimiento clave para la producción de glóbulos rojos; por lo tanto, una insuficiencia de señalización dependiente de Epo puede resultar en números reducidos de glóbulos rojos y anemia (Kaushansky K, *NEJM* 354:2034-45, 2006). Tpo, otro ejemplo de un factor de crecimiento dependiente de JAK2, cumple una función fundamental en el control de la proliferación y maduración de megacariocitos, las células a partir de las cuales se

producen las plaquetas (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Como tal, la señalización de Tpo reducida disminuiría la cantidad de megacariocitos (megacariocitopenia) y reduciría el recuento plaquetario (trombocitopenia). Esto puede provocar un sangrado no deseado y/o sin control. La inhibición reducida de otros JAK, como JAK3 y Tyk2 puede también ser deseable ya que los humanos que carecen de la versión funcional de estas cinasas ha demostrado que padece numerosas enfermedades como inmunodeficiencia combinada grave o síndrome de hiperinmunoglobulina E (Minegishi, Y, et al. Immunity 25:745-55, 2006; Macchi P, et al. Nature. 377:65-8, 1995). Por lo tanto, un inhibidor de JAK1 con afinidad reducida con otros JAK presentaría ventajas significativas sobre un inhibidor menos selectivo con respecto a los efectos colaterales reducidos que implican la supresión inmunitaria, la anemia y trombocitopenia.

Otro aspecto de la presente invención pertenece a métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con JAK en un individuo (por ej., paciente) administrándole al individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica de este. Una enfermedad asociada con JAK puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que esté directa o indirectamente relacionado con la expresión o actividad del JAK, lo que incluye la sobreexpresión y/o los niveles de actividad anormales. Una enfermedad relacionada con JAK también puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que se puede prevenir, mejorar o curar mediante la modulación de la actividad de JAK.

Los inhibidores de JAK son útiles para tratar varias enfermedades o trastornos asociados con JAK. Los ejemplos de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades que implican el sistema inmunológico incluyendo, por ejemplo, rechazo de transplante de órganos (por ejemplo, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto versus hospedador). Los ejemplos adicionales de las enfermedades relacionadas con JAK incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica, diabetes tipo I, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, miastenia grave, nefropatías por inmunoglobulina, miocarditis, enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y similares. En algunas modalidades, la enfermedad autoinmunitaria es una dermatitis ampollosa autoinmunitaria tal como pénfigo vulgar (PV) o pénfigo vesicular (BP).

Los ejemplos adicionales de enfermedades relacionadas con JAK incluyen afecciones alérgicas tales como asma, alergias a la comida, dermatitis eczematosa, dermatitis de contacto, dermatitis atópica (eczema atrópica) y rinitis.

Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades virales como el virus de Epstein Barr (VEB), Hepatitis B, Hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus Varicela-Zóster (VVZ) y virus del Papiloma humano (VPH).

Los ejemplos adicionales de enfermedades relacionadas con JAK incluyen enfermedades relacionadas con recambio de cartílagos, por ejemplo, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpatética refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze, atropatía costal, osteoartritis deformans endémica, enfermedad de Mseleni, enfermedad de Handigodu, degeneración que resulta de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, escleroderma o espondilitis anquilosante.

Los ejemplos adicionales de enfermedad asociada con JAK incluyen malformaciones de cartílago congénitas, lo que incluye crondrólisis hereditaria, crondrodisplasias y pseudocrondrodisplasias (por ejemplo, microtia, enotia y condrodisplasia metafisaria).

Los ejemplos adicionales de enfermedades o afecciones relacionadas con JAK incluyen trastornos de la piel tales como la psoriasis (por ejemplo, la psoriasis vulgaris), la dermatitis atópica, erupción de la piel, irritación de la piel, sensibilización en la piel (por ejemplo, dermatitis por contacto, dermatitis alérgica por contacto). Por ejemplo, ciertas sustancias, incluidos algunos fármacos, cuando se aplican tópicamente pueden provocar una sensibilización cutánea. En algunas modalidades, la coadministración o administración secuencial de al menos un inhibidor de JAK de la invención junto con un agente que provoca una sensibilización indeseada puede ayudar en el tratamiento de dicha sensibilización indeseada o dermatitis. En algunas modalidades, el trastorno en la piel se trata mediante administración tópica de al menos un inhibidor de JAK de la invención.

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen las caracterizadas por tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de la cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman, leiomiomas uterino, melanoma, etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML) o mieloma múltiple) y cáncer de piel tal como linfoma de célula T cutáneo (CTCL) y linfoma de célula B cutáneo. Los ejemplos de CTCL incluyen el síndrome de Sezary y la micosis fungoide. Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen hipertensión arterial pulmonar.

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen cánceres asociados con inflamación. En algunas modalidades, el cáncer está relacionado con enfermedad inflamatoria intestinal. En algunas modalidades, la

enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa. En algunas modalidades, la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el cáncer relacionado con la inflamación es cáncer relacionado con colitis. En algunas modalidades, el cáncer relacionado con la inflamación es cáncer de colon o cáncer colorrectal. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), adenocarcinoma, cáncer de intestino delgado o cáncer de recto.

Las enfermedades asociadas con JAK también pueden incluir las caracterizadas por la expresión de: Los mutantes de JAK2, como aquellos que tienen al menos una mutación en el dominio pseudo-cinasa (por ej., JAK2V617F); mutantes de JAK2 que tienen al menos una mutación fuera del dominio pseudo-cinasa; mutantes de JAK1; mutantes de JAK3; mutantes del receptor de eritropoyetina (EPOR) o expresión desregulada de CRLF2.

Las enfermedades asociadas a JAK pueden incluir además trastornos mieloproliferativos (MPD), por ejemplo policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM), mielofibrosis primaria (PMF), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), síndrome hipereosinofílico (HES), enfermedad sistémica de los mastocitos (SMCD) y similares. En algunas modalidades, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis (por ejemplo, mielofibrosis primaria (PMF) o mielofibrosis post policitemia vera/trombocitemia esencial (Post-PV/Post-ET MF)). En algunas modalidades, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis post trombocitemia esencial (Post-ET MF). En algunas modalidades, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis post-policitemia vera (MF Post-PV).

Las enfermedades asociadas con JAK además incluyen síndrome mielodisplásico (MDS).

Tal como se utilizan en la presente, síndromes mielodisplásicos abarcan trastornos hematopoyéticos heterogéneos y clonales que se caracterizan por hematopoyesis ineficaz en uno o más de los linajes de células mieloides principales. Los síndromes mielodisplásicos están asociados con insuficiencia de la médula ósea, citopenias de sangre periférica y una propensión a progresar a leucemia mieloide aguda (AML). Además, se pueden detectar anomalías citogenéticas clonales en aproximadamente el 50 % de los casos con MDS. En 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Sociedad de Hematopatología (SH) y la Asociación Europea de Hematopatología (EAHP) propusieron nuevas clasificaciones para neoplasmas hematopoyéticos (Harris, et al., *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849; Vardiman, et al., *Blood* 2002;100:2292-2302). Para MDS, la OMS utilizó no solo los criterios morfológicos de la clasificación francesa-americana-británica (FAB) sino que también 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 MDS de la OMS (tabla 1) se refinó adicionalmente para permitir una clasificación precisa y pronósticamente relevante 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. 4º edición. Lyon France: IARC Press; 2008:88-103; Bunning y Germing, “Myelodysplastic syndromes/neoplasms” en el capítulo 5, Swerdlow, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (4º edición): Lyon, France: IARC Press;2008:88-103).

Tabla 1. Clasificación de la OMS del 2008 para síndrome mielodisplásico de novo

Subtipo	Sangre	Médula ósea
Citopenia refractaria con displasia unilínaje (RCUD)	Citopenia simple o bicitopenia	Displasia en ≥ 10 % de 1 línea celular, < 5 % de blastos
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS)	Anemia, sin blastos	≥ 15 % de precursores eritroides con sideroblastos en anillo, solo displasia eritroide, < 5 % blastos
Citopenia refractaria con displasia multilínaje	Citopenias, < 1 × 10 ⁹ /L monocitos	Displasia en ≥ 10 % de células en ≥ 2 linajes hematopoyéticos, ± 15 % de sideroblastos en anillo, < 5 % de blastos
Anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1)	Citopenias, entre ≤ 2 % y 4 % de blastos, < 1 × 10 ⁹ /L monocitos	Displasia unilínaje o multilínaje, sin bastones de Auer, entre 5 % y 9 % de blastos
Anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2)	Citopenias, entre ≤ 5% y 19% de blastos, < 1 × 10 ⁹ /L monocitos	Displasia unilínaje o multilínaje, ± bastones de Auer, entre 10% y 19% de blastos
Síndrome mielodisplásico, no clasificado (MDS-U)	Citopenias	Unilínaje o sin displasia pero citogenética de MDS característica, < 5 % de blastos
MDS asociado con del(5q) aislado	Anemia, plaquetas normales o aumentadas	Eritroide unilínaje. Del(5q) aislado, < 5 % de blastos

En algunas modalidades, la presente solicitud proporciona un método para tratar un síndrome mielodisplásico (MDS) en un paciente que lo necesita, el cual método comprende administrar a dicho paciente un compuesto de fórmula Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde dicho MDS se selecciona de citopenia refractaria con displasia unilínaje (RCUD), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS), citopenia refractaria con displasia multilínaje, anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1), anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2), síndrome mielodisplásico, no clasificado (MDS-U),

y MDS asociado con del(5q) aislado.

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es citopenia refractaria con displasia unilínea (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 multilineal.

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, no clasificado (MDS-U).

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

En algunas modalidades, el síndrome mielodisplásico es refractario a los agentes estimulantes de eritropoyesis.

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen mejorar los efectos secundarios dermatológicos de otros productos farmacéuticos por administración del compuesto de la invención. Por ejemplo, gran cantidad de agentes farmacéuticos generan reacciones alérgicas no deseadas que pueden manifestarse como erupción acneiforme o dermatitis relacionadas. Algunos agentes farmacéuticos de ejemplo que tienen tales efectos secundarios no deseados incluyen fármacos anticancerosos como gefitinib, cetuximab, erlotinib y similares. Los compuestos de la invención pueden ser administrados en forma sistémica o tópica (por ejemplo, localizadas cerca de la zona de la dermatitis) en combinación con (por ejemplo, en forma simultánea o consecutiva) el agente farmacéutico que tiene el efecto secundario dermatológico no deseado. En algunas modalidades, el compuesto de la invención puede ser administrado en forma tópica junto con uno o más productos farmacéuticos, donde los otros productos farmacéuticos causan dermatitis por contacto, sensibilización alérgica por contacto o trastornos similares de la piel, cuando se aplican en forma tópica en ausencia de una formulación de la invención. Por consiguiente, las composiciones de la invención incluyen formulaciones tópicas que contienen el compuesto de la invención y un agente farmacéutico adicional que puede ocasionar dermatitis, trastornos de la piel o efectos secundarios relacionados.

Las enfermedades adicionales relacionadas con JAK incluyen inflamación y enfermedades inflamatorias. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen sarcoidosis, enfermedades oculares inflamatorias (por ejemplo, iritis, uveítis,

escleritis, conjuntivitis o una enfermedad relacionada), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (por ejemplo, de las vías respiratorias superiores, lo que incluye la nariz y senos como rinitis o sinusitis o de las vías respiratorias inferiores, que incluye la bronquitis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y similares), miopatía inflamatoria como miocarditis y otras enfermedades inflamatorias. En algunas modalidades, la enfermedad inflamatoria del ojo es blefaritis.

Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen lesiones de reperusión isquémica o una enfermedad o afección relacionada con un evento isquémico inflamatorio tal como apoplejía o paro cardiorrespiratorio, estado de enfermedad impulsado por endotoxina (por ejemplo, complicaciones después de una cirugía de bypass o estados de endotoxina crónica que contribuyen al fallo cardíaco crónico), anorexia, caquexia, fatiga tal como la que resulta de o está asociada con cáncer, restenosis, esclerodermis, fibrosis, afecciones asociadas con hipoxia o astrogliosis tal como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer o neurodegeneración y otras enfermedades inflamatorias tales como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y choque séptico.

Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen gota y tamaño aumentado de la próstata debido a, por ejemplo, hipertrofia prostática benigna o hiperplasia prostática benigna, así como enfermedades de reabsorción ósea tal como osteoporosis u osteoartritis, enfermedades de reabsorción ósea asociadas con: desequilibrio hormonal y/o terapia hormonal, enfermedad autoinmunológica (por ejemplo, sarcoidosis ósea) o cáncer (por ejemplo, mieloma).

Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen un trastorno de ojo seco. Tal como se usa en la presente, "trastorno del ojo seco" pretende abarcar las enfermedades listadas en un informe oficial reciente del Dry Eye Workshop (DEWS), que define al ojo seco como "una enfermedad multifactorial de las lágrimas y superficie ocular que da como resultado síntomas de incomodidad, molestia visual e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial a la superficie ocular. Está acompañada de osmolaridad aumentada de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular". Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop", *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92 Abril de 2007, la cual se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, el trastorno de ojo seco se selecciona del trastorno de ojo seco evaporativo u ojo seco por falta de secreción acuosa (ADDE) o combinaciones adecuadas de estos. En algunas modalidades, el trastorno de ojo seco es ojo seco-síndrome de Sjogren (SSDE). En algunas modalidades, el trastorno de ojo seco es ojo seco no asociado con el síndrome de Sjogren (NSSDE).

Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen conjuntivitis, uveítis (incluyendo uveítis crónica), corioditis, retinitis, ciclitis, escleritis, episcleritis o iritis. Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen disfunción o falla respiratoria asociada con infección viral, tal como influenza y SARS.

Terapias de combinación

Es posible emplear uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, así como inhibidores de cinasas PI3Kδ, mTor, Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK tales como, por ejemplo, aquellos descritos en WO 2006/056399, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia u otros agentes se pueden utilizar en combinación con los compuestos descritos en la presente para tratar enfermedades, trastornos o afecciones relacionados con JAK. El o los agentes farmacéuticos adicionales pueden administrarse a un paciente de manera simultánea o secuencial.

Los quimioterapéuticos ejemplares incluyen inhibidores de proteosoma (por ejemplo, bortezomib), talidomida, revlimid y agentes que dañan el ADN tales como melfalán, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, etopósido, carmustina y similares.

Los esteroides de ejemplo incluyen corticoesteroides tales como dexametasona o prednisona.

Los ejemplos de inhibidores de Bcr-Abl incluyen los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de estos, de los géneros y especies que se describen en la patente estadounidense N° 5,521,184, WO 04/005281 y N.º de serie estadounidense 60/578,491, ambas se incorporan en sus totalidades a la presente mediante esta referencia.

Los inhibidores de Flt-3 adecuados ejemplares incluyen compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como se divulgan en WO 03/037347, WO 03/099771 y WO 04/046120, todas las cuales se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

Los inhibidores de RAF adecuados ejemplares incluyen los compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se divulga en WO 00/09495 y WO 05/028444, que se incorporan al presente por referencia en su totalidad.

Los inhibidores de FAK adecuados ejemplares incluyen los compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se divulga en WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 y WO 01/014402, que se incorporan al presente por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el agente farmacéutico adicional se selecciona de IMiD, un agente anti-IL-6, un agente anti-TNF-α, un agente hipometilante y un modificador de respuesta biológica (BRM).

En general, un BRM es una sustancia hecha a partir de organismos vivos para tratar enfermedades, el cual se puede producir naturalmente en el cuerpo o se puede realizar en el laboratorio. Algunos 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 elevada.

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

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

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

En algunas modalidades, el agente farmacéutico adicional se selecciona de globulina anti-timocítica, factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinantes (G-CSF), granulocito-monocito CSF (GM-CSF), un agente estimulante de eritropoyesis (ESA) y ciclosporina.

En algunas modalidades, el agente farmacéutico adicional es un inhibidor de JAK adicional. En algunas modalidades, el inhibidor de JAK adicional es tofacitinib o ruxolitinib.

En algunas modalidades, es posible utilizar uno o más de los compuestos de la invención en combinación con uno o más inhibidores de cinasa adicionales que incluyen imatinib, en particular para el tratamiento de pacientes con resistencia a imatinib u otros inhibidores de cinasa.

En algunas modalidades, un agente quimioterapéutico adecuado se puede seleccionar de agentes antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa 1, análogos de platino, taxanos, antraciclinas e inhibidores de EGFR, y combinaciones estos.

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

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

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

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

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

En algunas modalidades, el agente quimioterapéutico es FOLFIRINOX (5-FU,

lecovorina, irinotecano y oxaliplatino). En algunas modalidades, el agente quimioterapéutico son gemcitabina y Abraxane® (partículas unidas a proteína de paclitaxel para suspensión inyectable).

En algunas modalidades, se pueden usar uno o más inhibidores de JAK de la invención en combinación con un quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer, tal como mieloma múltiple y pueden mejorar la respuesta al tratamiento en comparación con la respuesta al agente quimioterapéutico solo, sin la exacerbación de sus efectos tóxicos. Los ejemplos de agentes farmacéuticos adicionales usados en el tratamiento de mieloma múltiple, por ejemplo, pueden incluir, de modo no taxativo, melfalán, melfalán más prednisona [MP], doxorubicina, dexametasona y Velcade (bortezomib). Otros agentes adicionales usados en el tratamiento de mieloma múltiple incluyen inhibidores de cinasa FAK, Bcr-Abl, Flt-3 y RAF. Los efectos sinérgicos o aditivos son resultados deseables de combinar un inhibidor de JAK de la presente invención con un agente adicional. Asimismo, la resistencia de células de mieloma múltiple con respecto a agentes, tal como dexametasona, puede ser reversible tras el tratamiento con un inhibidor de JAK de la presente invención. Los agentes se pueden combinar con los presentes compuestos en una forma de dosificación única o continua, o los agentes se pueden administrar simultánea o consecutivamente como formas de dosificación separadas.

En algunas modalidades, se administra un corticosteroide, tal como dexametasona, a un paciente en combinación con al menos un inhibidor de JAK donde la dexametasona se administra intermitentemente en oposición a la forma continua.

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

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

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se selecciona de Dehydrex™ (Holles Labs), Civamide (Opko), hialuronato de sodio (Vismed, Lantibio/TRB Chemedica), ciclosporina (ST-603, Sirion Therapeutics), ARG101(T) (testosterona, Argentis), AGR1012(P) (Argentis), ecabet sodio (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 (Duramycin, MOLI1901, Lantibio), CF101 (2S,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-[6-[(3-yodofenil)metilamino]purin-9-il]-N-metil-oxolan-2-carbamilo, Can-Fite Biopharma), voclosporina (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), Lacritina (Senju), rebamipida (Otsuka-Novartis), OT-551 (Othera), PAI-2 (University of Pennsylvania and Temple University), pilocarpina, tacrolimus, pimecrolimus (AMS981, Novartis), loteprednol etabonato, rituximab, diquafosol tetrasodio (INS365, Inspire), KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals), dehidroepiandrosterona, anakinra, efalizumab, micofenolato sodio, etanercept (Embrel®), hidroxicloroquina, NGX267 (TorreyPines Therapeutics), actemra, gemcitabina, oxaliplatino, L-asparaginasa o talidomida.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente antiangiogénico, un agonista colinérgico, un modulador del receptor de TRP-1, un bloqueador del canal de calcio, un secretagogo de mucina, un estimulante de MUC1, un inhibidor de calcineurina, un corticosteroide, un agonista del receptor de P2Y2, un agonista del receptor muscarínico, un inhibidor de mTOR, otro inhibidor de JAK, un inhibidor de la cinasa Bcr-Abl, un inhibidor de la cinasa FLT-3, un inhibidor de la cinasa RAF, un inhibidor de la cinasa FAK como, por ejemplo, los descritos en WO 2006/056399, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un derivado de tetraciclinas (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 anti-metabolito/demetilante (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina o azacitidina); una terapia antihormonal (por ejemplo, antagonistas receptores de hormonas, SERMs o inhibidor de la aromatasas); un inhibidor mitótico (por ejemplo, vincristina o paclitaxel); un inhibidor de la topoisomerasa (I o II) (por ejemplo, mitoxantrona e irinotecán); un inductor apoptótico (por ejemplo, ABT-737); una terapia de ácido nucleico (por ejemplo, antisentido o ARNi); ligandos de receptores nucleares (por ejemplo, agonistas y/o antagonistas: ácido transretinoico total o bexaroteno); agentes de direccionamiento epigenéticos como inhibidores de histona deacetilasa (por ejemplo, vorinostat), agentes hipometilantes (por ejemplo, decitabina); reguladores de la estabilidad proteica como inhibidores de Hsp90, ubiquitina y/o moléculas de

conjugación o no conjugación similares a la ubiquitina; o un inhibidor de EGFR (erlotinib).

En algunas modalidades, el o los agentes terapéuticos adicionales son gotas oculares emolientes (también conocidas como "lágrimas artificiales"), que incluyen, de modo no taxativo, composiciones que contienen polivinilalcohol, hidroxipropilmetilcelulosa, glicerina, polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) o celulosa de carboximetilo. Las lágrimas artificiales pueden ayudar en el tratamiento del ojo seco compensando la capacidad de humectación y lubricación reducida de la película lagrimal. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un fármaco mucolítico, tal como N-acetil-cisteína, que puede interactuar con las mucoproteínas y, por consiguiente, disminuir la viscosidad de la película lagrimal.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional incluye un agente antibiótico, antiviral, antifúngico, anestésico, anti-inflamatorio que incluye anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos y agentes antialérgicos. Los ejemplos de medicamentos adecuados incluyen aminoglicósidos como amicacina, gentamicina, tobramicina, esterptomicina, netilmicina y kanamicina; fluoroquinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, lomefloxacina, levofloxacina y enoxacina; naftiridina; sulfonamidas; polimixina; cloranficol; neomicina; paramomicina; colistimetato; bacitracina; vancomicina; tetraciclinas; rifampina y sus derivados ("rifampinas"); cicloserina; betalactamas; cafalosporinas; anfotericinas; fluconazol; flucitosina; natamicina; miconazol; ketoconazol; corticosteroides; diclofenac; flurbiprofeno; ketorolac; suprofen; cromolín; lodoxamida; levocabastina; nafazolina; antazolina; feniramina o antibiótico de azalida.

Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación

Cuando se emplean como fármacos, los compuestos de la invención se pueden administrar en la forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones se pueden preparar de una manera ya conocida en la técnica farmacéutica y se pueden administrar mediante diversas vías, dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (que incluye transdérmica, epidérmica, oftálmica y a membranas mucosas, incluyendo la administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, mediante la inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal intramuscular o inyección o infusión; o intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una dosis única en bolo o puede ser, por ejemplo, a través de una bomba de

perfusión continua. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables.

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, el compuesto de la invención 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 la administración tópica. Al fabricar las composiciones de la invención, el ingrediente activo generalmente se mezcla con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encierra dentro de dicho portador en forma de, por ejemplo, una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúe como vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, obleas, elíxires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos empaquetados estériles.

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, se puede moler hasta un tamaño de partícula menor que 200 mesh. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, se puede ajustar el tamaño de partícula mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, alrededor de 40 mesh.

Los compuestos de la invención se pueden moler usando procedimientos de molienda conocidos, tal como molienda húmeda, para obtener un tamaño de partícula adecuado para la formación de comprimidos y para otros tipos de formulación. Las preparaciones de los compuestos divididas finamente (nanopartículas) se pueden preparar mediante procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, véase Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2002/000196.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Adicionalmente, las formulaciones pueden incluir: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral;

agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes endulzantes; y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención se pueden formular de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende celulosa microcristalina silificada (SMCC) y al menos un compuesto descrito en el presente o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, la celulosa microcristalina silificada comprende aproximadamente el 98 % de celulosa microcristalina y aproximadamente el 2 % de dióxido de silicona p/p.

En algunas modalidades, la composición es una composición de liberación progresiva que comprende al menos un compuesto descrito en el presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un componente seleccionado de celulosa microcristalina, monohidrato de lactosa, hidroxipropil metilcelulosa y óxido de polietileno. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y celulosa microcristalina, monohidrato de lactosa, e hidroxipropil metilcelulosa. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y celulosa microcristalina, monohidrato de lactosa, e óxido de polietileno. En algunas modalidades, la composición también comprende estearato de magnesio o dióxido de silicona. En algunas modalidades, la celulosa microcristalina es Avicel PH102™. En algunas modalidades, el monohidrato de lactosa es Fast-flo 316™. En algunas modalidades, la hidroxipropilmetilcelulosa es hidroxipropilmetilcelulosa 2208 K4M (p. ej., Methocel K4 M Premier™) y/o hidroxipropilmetilcelulosa 2208 K100LV (p. ej., Methocel K00LV™). En algunas modalidades, el óxido de polietileno es óxido de polietileno WSR 1105 (p. ej., Polyox WSR 1105™).

En algunas modalidades, se utiliza un proceso de granulación húmeda para producir la composición. En algunas modalidades, se utiliza un proceso de granulación seca para producir la composición.

Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria, cada dosificación contiene entre alrededor de 5 y alrededor de 1.000 mg (1 g), más comúnmente alrededor entre 100 mg y alrededor de 500 mg del ingrediente activo. En algunas modalidades, cada dosificación contiene aproximadamente 10 mg del ingrediente activo. En algunas modalidades, cada dosificación contiene

aproximadamente 50 mg del ingrediente activo. En algunas modalidades, cada dosificación contiene aproximadamente 25 mg del ingrediente activo. El término "formas de dosificación unitaria" hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, 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 de la invención contienen de alrededor de 5 mg a alrededor de 50 mg del ingrediente activo. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos o composiciones que contienen alrededor de 5 mg a alrededor de 10 mg, alrededor de 10 mg a alrededor de 15 mg, alrededor de 15 mg a alrededor de 20 mg, alrededor de 20 mg a alrededor de 25 mg, alrededor de 25 mg a alrededor de 30 mg, alrededor de 30 mg a alrededor de 35 mg, alrededor de 35 mg a alrededor de 40 mg, alrededor de 40 mg a alrededor de 45 mg o alrededor de 45 mg a alrededor de 50 mg del ingrediente activo.

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

En algunas modalidades, las composiciones de la invención contienen de alrededor de 500 mg a alrededor de 1.000 mg del ingrediente activo. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos o composiciones que contienen alrededor de 500 mg a alrededor de 550 mg, alrededor de 550 mg a alrededor de 600 mg, alrededor de 600 mg a alrededor de 650 mg, alrededor de 650 mg a alrededor de 700 mg, alrededor de 700 mg a alrededor de 750 mg, alrededor de 750 mg a alrededor de 800 mg, alrededor de 800 mg a alrededor de 850 mg, alrededor de 850 mg a alrededor de 900 mg, alrededor de 900 mg a alrededor de 950 mg o alrededor de 950 mg a alrededor de 1.000 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. Ha de entenderse, sin embargo, que la cantidad del compuesto que efectivamente se administre en general será determinada por un médico, de acuerdo con las circunstancias pertinentes, que incluyen la afección a tratar, la vía de

administración elegida, el compuesto efectivamente administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

Para preparar las 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 de la presente invención. Al hacer referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo generalmente se dispersa de manera uniforme por toda la composición, de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Después, esta preformulación sólida se subdivide en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen, por ejemplo, entre alrededor de 0,1 y alrededor de 1000 mg del ingrediente activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o formarse de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, donde este último está en forma de un envoltorio por encima del primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Pueden usarse diversos materiales para dichas capas o recubrimientos entéricos, dichos materiales incluyen una cantidad 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 de la presente invención pueden incorporarse para su administración oral o mediante inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes de sabor adecuado, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones saborizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de maní, así como elíxires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables o mezclas de estos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describió anteriormente. En algunas modalidades, las composiciones se administran a través de la vía respiratoria nasal u oral para un efecto local o sistémico. Las composiciones se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las

soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador se pueden unir a una mascarilla, o respirador artificial positivo intermitente. Las composiciones en forma de soluciones, suspensiones o polvo pueden administrarse por vía oral o nasal mediante dispositivos que administran la formulación de manera apropiada.

Las formulaciones tópicas pueden contener uno o más portadores convencionales. En algunas modalidades, los ungüentos pueden contener agua y uno o más portadores hidrofóbicos seleccionados de, por ejemplo, parafina líquida, polioxietileno alquil éter, propilenglicol, vaselina blanca, y similares. Las composiciones de portadores de cremas pueden ser a base de agua en combinación con glicerol y uno o más componentes adicionales, por ejemplo, glicerolmonoestearato, glicerolmonoestearato-PEG y alcohol cetílico estearílico. Los geles pueden formarse mediante el uso de alcohol isopropílico y agua, de manera adecuada en combinación con otros componentes como, por ejemplo, glicerol, hidroxietil celulosa, y similares. En algunas modalidades, las formulaciones tópicas contienen al menos alrededor de 0,1; al menos alrededor de 0,25; al menos alrededor de 0,5; al menos alrededor de 1; al menos alrededor de 2 o al menos alrededor de 5 % en peso del compuesto de la invención. Las formulaciones tópicas pueden envasarse adecuadamente en tubos de, por ejemplo, 100 g que se asocian 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 administrada a un paciente variará dependiendo de qué se administre, la finalidad de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la forma de administración y similares. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos parcialmente detener los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las dosis eficaces dependerán de la condición de la enfermedad que se esté tratando, así como del criterio del médico tratante en función de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el estado general del paciente, y similares.

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 filtrarse en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como están o liofilizarse, estando la preparación liofilizada combinada con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones del compuesto en general estará entre 3 y 11, más preferentemente

entre 5 y 9 y aún más preferentemente entre 7 y 8. Se entenderá que el uso de algunos de los excipientes, portadores o estabilizadores anteriores provocará la formación de sales farmacéuticas.

La dosificación terapéutica de un compuesto de la presente invención puede variar según, por ejemplo, el uso particular para el cual se realiza el tratamiento, la manera de administración del compuesto, la salud y estado del paciente y la opinión del médico tratante. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de una cantidad de factores que incluyen la dosificación, características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden proporcionar en una solución acuosa de tampón fisiológico que contiene entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 10 % p/v del compuesto para la administración parenteral. Algunos intervalos de dosificación típicos se encuentran entre alrededor de 1 µg/kg y alrededor de 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas modalidades, el intervalo de dosis es de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por día. La dosis probablemente dependa de variables como el tipo y el grado de avance de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración. Las dosis eficaces se pueden extrapolar dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o en modelos animales. Las composiciones de la invención pueden incluir además uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como un compuesto quimioterapéutico, esteroide, antiinflamatorio o inmunosupresor, ejemplos de los cuales se enumeran anteriormente en la presente.

En algunas modalidades, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra como una composición oftálmica. Por consiguiente, en algunas modalidades, los métodos comprenden la administración del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador oftálmicamente aceptable. En algunas modalidades, la composición oftálmica es una composición líquida, composición semi-sólida, inserto, película, micropartículas o nanopartículas.

En algunas modalidades, la composición oftálmica es una composición líquida. En algunas modalidades, la composición oftálmica es una composición semi-sólida. En algunas modalidades, la composición oftálmica es una composición tópica. Las composiciones tópicas incluyen, entre otros, composiciones líquidas y semisólidas. En algunas modalidades, la composición oftálmica es una composición tópica. En algunas modalidades, la composición tópica comprende una solución acuosa, una suspensión acuosa, un ungüento o un gel. En algunas modalidades, la composición oftálmica se aplica tópicamente en la parte delantera del ojo, debajo

del párpado superior, en el párpado inferior y en el fondo de saco. En algunas modalidades, la composición oftálmica es esterilizada. La esterilización puede llevarse a cabo mediante técnicas como filtración esterilizante de la solución o mediante el calentamiento de la solución en la ampolla, lista para su uso. Las composiciones oftálmicas de la invención pueden contener adicionalmente excipientes farmacéuticos adecuados para la preparación de formulaciones oftálmicas. Los ejemplos de dichos excipientes son agentes conservantes, agentes amortiguadores, agentes quelantes, agentes antioxidantes y sales para regular la presión osmótica.

Tal como se usa en la presente, el término "portador oftálmicamente aceptable" se refiere a cualquier material que puede contener y liberar el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este y que es compatible con el ojo. En algunas modalidades, el portador oftálmicamente aceptable es agua o una solución o suspensión acuosa pero también incluye aceites como los utilizados para fabricar ungüentos y matrices de polímero como las utilizadas en insertos oculares. En algunas modalidades, la composición puede ser una suspensión acuosa que comprende el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Las composiciones oftálmicas líquidas, que incluyen ungüentos y suspensiones, pueden tener una viscosidad adecuada para la vía de administración seleccionada. En algunas modalidades, la composición oftálmica tiene una viscosidad en el intervalo de entre alrededor de 1,000 y alrededor de 30,000 centipoises.

En algunas modalidades, las composiciones oftálmicas pueden comprender adicionalmente uno o más tensioactivos, adyuvantes, soluciones reguladoras, antioxidantes, reguladores de la tonicidad, conservantes (por ej., EDTA, BAK (cloruro de benzalconio), clorito de sodio, perborato de sodio, policuaternio-1), espesantes o modificadores de la viscosidad (por ej., carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, alcohol polivinílico, polietilenglicol, glicol 400, propilenglicol hidroximetilcelulosa, hidroxipropil guar, ácido hialurónico e hidroxipropilcelulosa) y similares. Los aditivos en la formulación pueden incluir, de modo no taxativo, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido sórbico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, aceite de ricino y perborato de sodio.

Las composiciones oftálmicas acuosas (soluciones o suspensiones) en general no contienen sustituyentes fisiológica u oftalmológicamente dañinos. En algunas modalidades, en la composición se usa agua purificada o desionizada. El pH se puede ajustar agregando cualquier ácido, base o solución reguladora fisiológica u oftalmológicamente aceptable que regula el pH, dentro del intervalo de alrededor de 5,0 y 8,5. Los ejemplos oftálmicamente aceptables de ácidos incluyen acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico, clorhídrico y similares, y los ejemplos de bases

incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, trometamina, trishidroximetilamino-metano y similares. Las sales y soluciones reguladoras incluyen citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio y mezclas de los ácidos y bases anteriormente mencionados.

En algunas modalidades, los métodos involucran formar o proporcionar un depósito del agente terapéutico en contacto con la superficie externa del ojo. Un depósito se refiere a una fuente de agente terapéutico que no se elimina rápidamente con las lágrimas u otro mecanismo de depuración del ojo. Esto hace que se encuentren presentes concentraciones altas continuas y constantes de agente terapéutico en el fluido en la superficie externa del ojo mediante una sola aplicación. Sin la intención de vincularse a ninguna teoría, se considera que la absorción y penetración puede depender tanto de la concentración de fármaco disuelto y de la duración de contacto del tejido externo con el fluido que contiene el fármaco. Cuando el fármaco se retira mediante la depuración del fluido ocular y/o absorción en el tejido ocular, se proporciona más fármaco, por ej., se disuelve en el fluido ocular recargado desde el depósito. Por consiguiente, el uso de un depósito puede facilitar la carga del tejido ocular para agentes terapéuticos más insolubles. En algunas modalidades, el depósito puede permanecer por hasta ocho horas o más. En algunas modalidades, las formas de depósito oftálmico incluyen, de modo no taxativo, suspensiones poliméricas acuosas, ungüentos e insertos sólidos.

En algunas modalidades, la composición oftálmica es un ungüento o gel. En algunas modalidades, la composición oftálmica es un vehículo de administración basado en aceite. En algunas modalidades, la composición comprende una base de vaselina o lanolina a la que se agrega el ingrediente activo, generalmente de 0.1 a 2% y excipientes. Las bases comunes pueden incluir, de modo no taxativo, aceite mineral, petrolato y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el ungüento se aplica como una cinta sobre el párpado inferior.

En algunas modalidades, la composición oftálmica es un inserto oftálmico. En algunas modalidades, el inserto oftálmico es biológicamente inerte, suave, bioerosionable, viscoelástico, estable a la esterilización luego de la exposición a los agentes terapéuticos, resistente a las infecciones de bacterias transportadas por el aire, bioerosionable, biocompatible y/o viscoelástico. En algunas modalidades, el inserto comprende una matriz oftálmicamente aceptable, por ej., una matriz polimérica. En general, la matriz es un polímero y el agente terapéutico en general está dispersado allí o unido a la matriz polimérica. En algunas modalidades, el agente terapéutico puede ser liberado lentamente desde la matriz mediante la disolución o hidrólisis del enlace covalente. En algunas modalidades,

el polímero es bioerosionable (soluble) y la velocidad de disolución puede controlar la velocidad de liberación del agente terapéutico dispersado allí. En otra forma, la matriz polimérica es un polímero biodegradable que se descompone, tal como, por hidrólisis para liberar así el agente terapéutico unido a esta o dispersado allí. En modalidades adicionales, la matriz y el agente terapéutico pueden estar rodeados por un recubrimiento polimérico adicional para controlar aún más la liberación. En algunas modalidades, el inserto comprende un polímero biodegradable, tal como, policaprolactona (PCL), un copolímero de acetato de etilen-vinilo (EVA), cianoacrilato de polialquilo, poliuretano, un nilón, o poli (dl-lactido-co-glicólido) (PLGA) o un copolímero de cualquiera de estos. En algunas modalidades, el agente terapéutico está dispersado en el material de matriz o dispersado en medio de la composición monomérica usada para realizar el material de matriz antes de la polimerización. En algunas modalidades, la cantidad de agente terapéutico es de entre alrededor de 0.1 y alrededor de 50% o de entre alrededor de 2 y alrededor de 20%. En modalidades adicionales, la matriz polimérica biodegradable o bioerosionable se usa para no tener que retirar el inserto utilizado. A medida que se degrada o disuelve el polímero biodegradable o bioerosionable, se libera el agente terapéutico.

En modalidades adicionales, el inserto oftálmico comprende un polímero, que incluye, de modo no taxativo, los descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", *Asian J. Pharm.*, páginas 12-17 (Enero 2008), la cual se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, el inserto comprende un polímero seleccionado de polivinilpirrolidona (PVP), un polímero o copolímero de acrilato o metacrilato (por ej., familia de polímeros Eudragit® de Rohm o Degussa), hidroximetilcelulosa, ácido poliacrílico, dendrímeros de poli(amidoamina), poli(dimetil siloxano), polietilenóxido, poli(lactido-co-glicólido), poli(2-hidroxietilmetacrilato), alcohol poli(vinílico) o poli(propilen fumarato). En algunas modalidades, el inserto comprende Gelfoam® R. En algunas modalidades, el inserto es un ácido poliacrílico del conjugado 450 kDa-cisteína.

En algunas modalidades, la composición oftálmica es una película oftálmica. Los polímeros adecuados para dichas películas incluyen, de modo no taxativo, los descritos en Wagh, et al. (*ibid*). En algunas modalidades, la película es un lente de contacto blando, tales como los fabricados a partir de copolímeros de N,N-dietilacrilamida y ácido metacrílico reticulado con dimetacrilato de etilenglicol.

En algunas modalidades, la composición oftálmica comprende microesferas o nanopartículas. En algunas modalidades, las microesferas comprenden gelatina. En algunas modalidades, las microesferas se inyectan en el segmento posterior del ojo, espacio coroideo, en la esclerótica, por vía intraocular o subretinal. En

algunas modalidades, las microesferas o nanopartículas comprenden un polímero que incluye, de modo no taxativo, los descritos en Wagh, et al. (*ibid*), que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, el polímero es quitosano, un ácido policarboxílico tal como, ácido poliacrílico, partículas de albúmina, ésteres de ácido hialurónico, ácido poliitacónico, poli(butil)cianoacrilato, policaprolactona, poli(isobutil)caprolactona, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) o ácido poli (láctico). En algunas modalidades, las microesferas o nanopartículas comprenden partículas lipídicas sólidas.

En algunas modalidades, la composición oftálmica comprende una resina de intercambio iónico. En algunas modalidades, la resina de intercambio iónico es una zeolita inorgánica o resina orgánica sintética. En algunas modalidades, la resina de intercambio iónico incluye, de modo no taxativo, las descritas en Wagh, et al. (*ibid*), que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, la resina de intercambio iónico es un ácido poliacrílico parcialmente neutralizado.

En algunas modalidades, la composición oftálmica es una suspensión polimérica acuosa. En algunas modalidades, el agente terapéutico o un agente de suspensión polimérico se suspende en un medio acuoso. En algunas modalidades, las suspensiones poliméricas acuosas pueden formularse de modo que retengan la misma viscosidad o prácticamente la misma viscosidad en el ojo que tenían antes de la administración al ojo. En algunas modalidades, pueden formularse de modo que se produzca mayor gelación al entrar en contacto con el fluido lacrimógeno.

Compuestos marcados y métodos de ensayo

Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos marcados de la invención (radiomarcados, marcados con fluoresceína, etc.) que se usan no solo en técnicas de imagenología sino también en ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para localizar y cuantificar JAK en muestras de tejido, incluyendo humano, y para identificar ligandos de JAK mediante la unión por inhibición de un compuesto marcado. Por consiguiente, la presente invención incluye ensayos de JAK que contienen dichos compuestos marcados.

La presente invención también incluye compuestos de la invención marcados isotópicamente. Un compuesto "marcado isotópicamente" o "radiomarcado" es un compuesto de la invención donde uno o más átomos son reemplazados o sustituidos por un átomo que posee una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra comúnmente en la naturaleza (esto es, que existe en la naturaleza). Los radionúclidos adecuados que pueden incorporarse en los compuestos de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, ^3H (también escrito como T por tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N ,

^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I . El radionúclido que se incorpore en los compuestos radiomarcados de la presente dependerá de la aplicación específica de dicho compuesto radiomarcado. Por ejemplo, para el marcado de JAK *in vitro* y ensayos de competencia, los compuestos que incorporan ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o [sic] serán en general los más útiles. Para las aplicaciones de radioimagenología, ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br o ^{77}Br serán generalmente los más útiles.

Se deberá entender que un "compuesto radiomarcado" o "compuesto marcado" es un compuesto que ha incorporado al menos un radioisótopo. En algunas modalidades, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S and ^{82}Br . En algunas modalidades, el compuesto incorpora 1, 2 o 3 átomos de deuterio.

La presente invención puede incluir además métodos sintéticos para incorporar radioisótopos en los compuestos de la invención. Los métodos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos orgánicos se conocen en la técnica y cualquier experto en la técnica reconocerá fácilmente los métodos aplicables para los compuestos de la invención.

Un compuesto de la invención marcado puede utilizarse en un ensayo de detección para identificar/evaluar compuestos. Por ejemplo, puede evaluarse la capacidad de un compuesto recientemente sintetizado o identificado (es decir, compuesto de prueba) que está marcado de unirse a JAK controlando la variación de su concentración cuando entra en contacto con JAK, realizando un seguimiento del marcado. Por ejemplo, un compuesto de la prueba (marcado) se puede evaluar para conocer su capacidad de reducir la unión de otro compuesto que se sabe que se une a una JAK (es decir, compuesto estándar). Por consiguiente, la capacidad de un compuesto de prueba de competir con el compuesto estándar de unirse al JAK está directamente correlacionada con su afinidad de unión. Por el contrario, en algunos otros ensayos de análisis, el compuesto estándar está marcado y los compuestos de prueba no están marcados. Por consiguiente, se controla la concentración del compuesto estándar marcado para evaluar la competencia entre el compuesto estándar y el compuesto de prueba y entonces se determina la afinidad de unión relativa del compuesto de prueba.

Kits

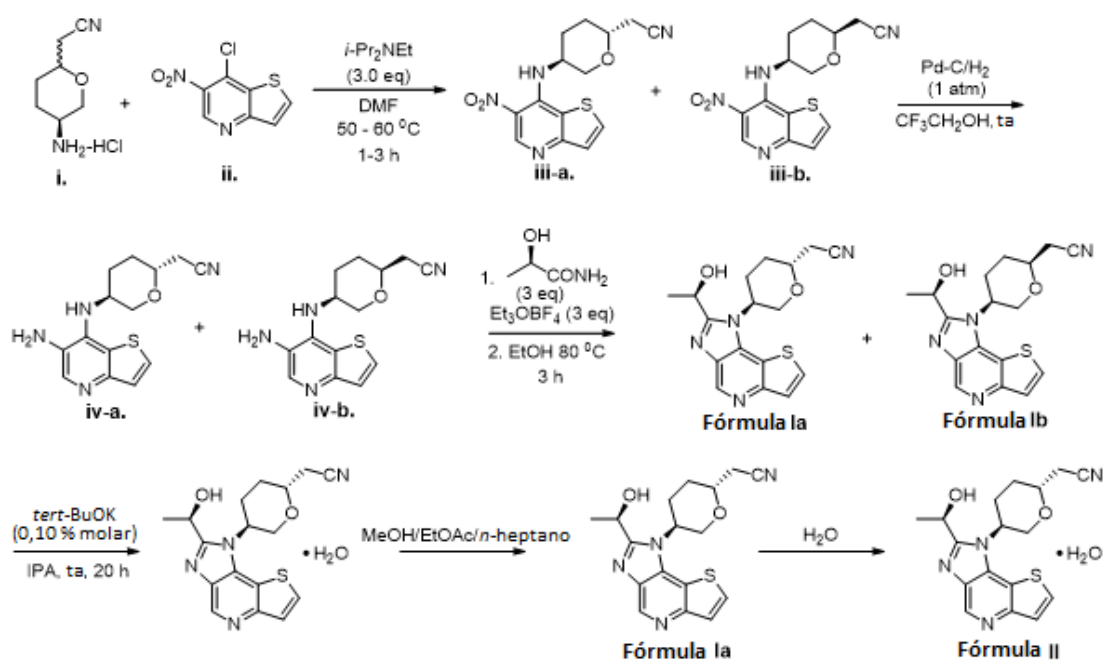
La presente invención también incluye kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos relacionados con JAK, tales como, cáncer, que incluyen uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención. Dichos kits, si se desea, pueden incluir además uno o más de varios componentes de los kits farmacéuticos convencionales, por

ejemplo, recipientes con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. También pueden incluirse instrucciones en el kit, ya sea en forma de prospectos o etiquetas, que indiquen las cantidades de los componentes que deben administrarse, indicaciones para la administración y/o indicaciones para mezclar los componentes.

Síntesis

El compuesto de fórmula Ia se puede sintetizar de acuerdo con las modalidades anteriores y como se ilustra adicionalmente en los esquemas I-III abajo. En el esquema I, el acoplamiento nucleofílico de (i) y (ii) en presencia de una base de amina (p. ej., *N,N*-diisopropiletilamina) proporciona la mezcla isomérica de compuestos (iii-a) y (iii-b). La reducción posterior del grupo nitro en condiciones de hidrogenación (p. ej., en presencia de gas hidrógeno y un catalizador de hidrógeno (p. ej., paladio sobre carbono)) proporciona la mezcla isomérica de compuestos (iv-a) y (iv-b). El acoplamiento de (iv-a) y (iv-b) con (R)-(+)-lactamida en presencia de un reactivo de alquiloxonio (p. ej., tetrafluoroborato de trietiloxonio) y la ciclación posterior proporcionan una mezcla de los compuestos tricíclicos fusionados de fórmula Ia y fórmula Ib. La reacción posterior en condiciones de racemización inversa (p. ej., en presencia de una base fuerte (p. ej., *tert*-butóxido de potasio)) produce un isómero simple del compuesto de fórmula Ia, 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo, que se puede hidratar opcionalmente para formar el compuesto monohidrato de fórmula II.

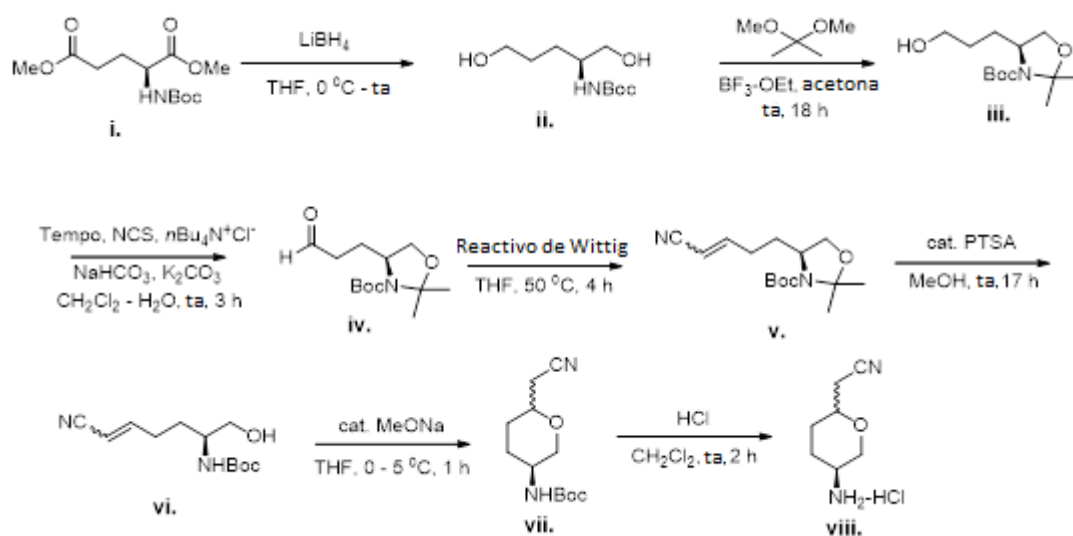
Esquema I



En el esquema II, los compuestos de fórmula VI se pueden producir mediante la reacción de (i) en presencia de un agente de reducción (p. ej., borohidruro de litio)

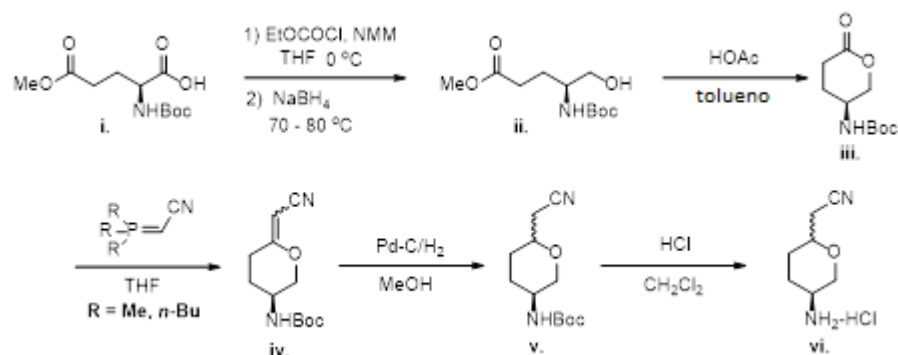
que proporciona el diol protegido por amina (ii), que queda protegido asimétricamente en presencia de 2,2-dimetoxipropano y eterato dietílico de trifluoruro de boro para formar oxazolidina (iii). La reacción del alcohol libre (iii) en condiciones de oxidación produce el aldehído (iv), que después se hace reaccionar en condiciones de Wittig-Horner modificadas (p. ej., en presencia de (cianometil)fosfonato de dietilo y un terc-butóxido de potasio) para formar una mezcla de los isómeros *cis* y *trans* (v). La desprotección de (v) en presencia de un ácido fuerte (p. ej., ácido *p*-toluensulfónico) produce el compuesto (vi), que se cicla en presencia de una base fuerte (p. ej., metóxido de sodio) para formar el pirano protegido por amina del compuesto (vii). La desprotección en condiciones estándar (p. ej., en presencia de un ácido fuerte) produce la sal de amina (viii).

Esquema II



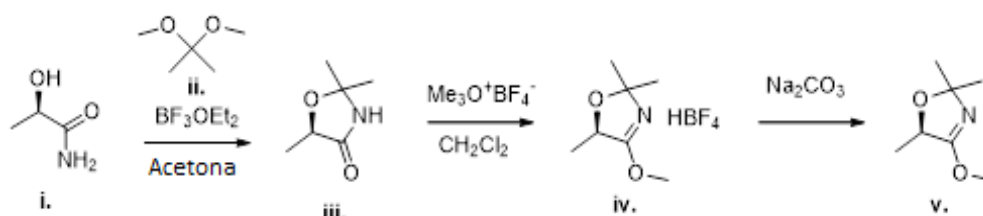
En el esquema III, se pueden producir compuestos de fórmula VI. En consecuencia, la reducción de carbonilo asimétrico del ácido carboxílico (i) produce el compuesto de hidroxi-éster (ii), que se cicla posteriormente en presencia de un ácido orgánico débil (p. ej., ácido acético) para formar la amino-lactona (iii). La reacción de (iii) en condiciones de Wittig modificadas (p. ej., en presencia de cloruro de cianometil (trimetil)fosfonio y terc-butóxido de potasio o, alternativamente, en presencia de cloruro de tributil(cianometil)fosfonio y terc-butóxido de potasio) proporciona la mezcla de isómeros *cis* y *trans* de (iv). La reducción del alqueno (iv) en presencia de un gas hidrógeno y un catalizador de hidrogenación (p. ej., paladio sobre carbono) proporciona la mezcla de los isómeros *R* y *S* de (v). La desprotección de la amina en condiciones estándar (p. ej., en presencia de un ácido fuerte) produce la sal de amina (vi).

Esquema III



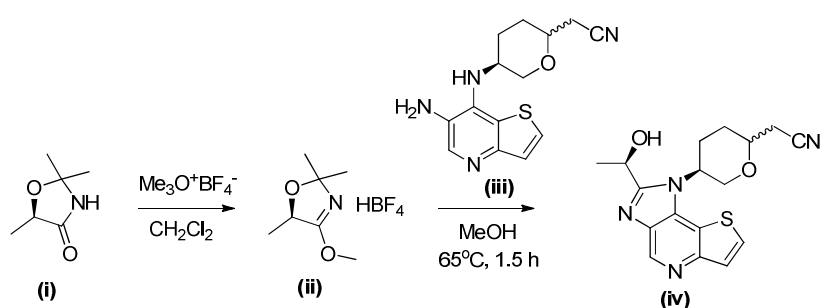
Se puede preparar el intermedio (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol, por ejemplo, de acuerdo con el proceso que se muestra en el esquema IV. Por ejemplo, la reacción de (*R*)-2-hidroxiopropanamida (i) con 2,2-dimetoxipropano (ii) en presencia de un eterato de boro-trihalógeno (p. ej., BF_3OEt_2) proporciona (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona (iii). La reacción del compuesto (iii) con un agente de metilación (p. ej., $\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$) y la reacción posterior en presencia de una base (p. ej., carbonato de sodio) proporciona (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol (v).

Esquema IV



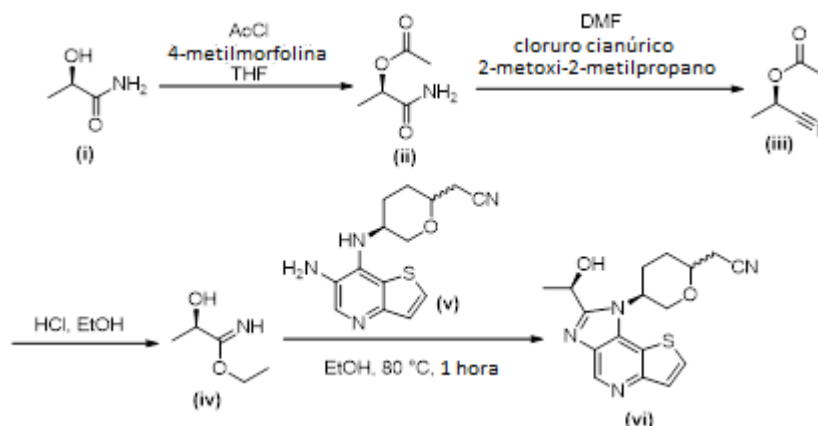
También se puede preparar una mezcla de los compuestos de las fórmulas Ia e Ib, por ejemplo, de acuerdo con el proceso que se muestra en el esquema V. (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona (i) se hace reaccionar primero con un agente de metilación (p. ej., $\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$) para formar (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol (ii), que posteriormente se hace reaccionar con una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (iii) para proporcionar una mezcla de los compuestos de fórmulas Ia e Ib (iv).

Esquema V



También se puede preparar una mezcla de los compuestos de las fórmulas Ia e Ib, por ejemplo, de acuerdo con el proceso que se muestra en el esquema VI. (R)-2-hidroxiopropanamida (i) se protege en primer lugar en condiciones de protección de alcohol estándar (p. ej., reacción con cloruro de acetilo) para formar acetato de (R)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo (ii), que después se hace reaccionar con cloruro cianúrico para formar acetato de (R)-1-cianoetilo (iii). La reacción posterior de (iii) con etanol en presencia de un catalizador ácido (p. ej., cloruro de hidrógeno) proporciona 2-hidroxiopropanimidato de (R)-etilo (iv) que después se hace reaccionar con una mezcla de 2-((2R,5S)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2S,5S)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (v) para formar una mezcla de los compuestos de fórmulas Ia e Ib (vi).

Esquema VI



EJEMPLOS

La invención se describirá más detalladamente mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ejemplo y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente varios parámetros que no son fundamentales y que se pueden cambiar o modificar para dar básicamente los mismos resultados.

La purificación preparativa por LC-MS de acceso abierto de algunos de los compuestos preparados se llevó a cabo en sistemas de fraccionamiento dirigido de masa de Waters. La configuración de los equipos básicos, los protocolos y el software de control para la operación de estos sistemas se han descrito detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Two-Pump At Column Dilution Configuration for Preparative LC-MS", K. Blom, *J. Combi. Chem.*, 4, 295 (2002); "Optimizing Preparative LC-MS Configurations and Methods for Parallel Synthesis Purification", K. Blom, R. Sparks, J. Doughty, G. Everlof, T. Haque, A. Combs, *J. Combi. Chem.*, 5, 670 (2003); y "Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks,

A. Combs, *J. Combi. Chem.*, 6, 874-883 (2004). Los compuestos separados se sometieron típicamente a cromatografía líquida/espectrometría de masas (LCMS) analítica para obtener la pureza bajo las siguientes condiciones: Instrumento; Agilent serie 1100, LC/MSD, Columna: Waters Sunfire™ C₁₈ 5 µm, 2,1 x 5,0 mm, Soluciones amortiguadoras: fase móvil A: TFA al 0,025 % en agua y fase móvil B: TFA al 0,025 % en acetonitrilo; gradiente de 2 % a 80% de B en 3 minutos con una velocidad de flujo de 1,5 mL/minuto.

Algunos de los compuestos preparados se analizaron utilizando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Las condiciones de DSC típicas son las siguientes: calorimetría de barrido diferencial de TA Instruments, modelo Q200 con automuestreador. Intervalo de temperatura: 30 - 350 °C; velocidad de rampa de temperatura: 10 °C/min; muestra de aluminio de bandeja y tapa Tcero; flujo de gas de nitrógeno a 50 mL/min.

Algunos de los compuestos preparados se analizaron utilizando análisis termogravimétrico (TGA). Las condiciones de TGA típicas son las siguientes: analizador termogravimétrico TA Instrument, modelo Q500. Intervalo de temperatura: 20 °C a 600 °C; velocidad de rampa de temperatura: 20 °C/min; flujo de purga de nitrógeno: 40 mL/min; flujo de purga de equilibrio: 60 mL/min; flujo de purga de muestra; bandeja de muestra de platino.

Analizador termogravimétrico PerkinElmer, modelo Pyris 1. Intervalo de temperatura: 25°C a 300 °C; velocidad de rampa de temperatura: 10 °C/min; flujo de gas de purga de nitrógeno: 60 mL/min; soporte de muestra de crisol cerámico TGA.

Algunos de los compuestos preparados se analizaron utilizando difracción de polvo de rayos X (XRPD). Las condiciones de XRPD típicas son las siguientes: Instrumento difractómetro de rayos X en polvo Bruker D2 PHASER; longitud de onda de radiación de rayos X: 1.05406Å CuKAl; polvo de rayos X: 30 KV, 10 mA; polvo de muestra: dispersado en un soporte de muestra sin antecedentes; condiciones de medición generales: Ángulo de inicio - 5 grados; ángulo de detención - 60 grados; toma de muestras - 0,015 grados; velocidad de barrido - 2 grados/min.

Difractómetro de rayos X en polvo Rigaku MiniFlex; la radiación de rayos X es de cobre Cu a 1,054056 Å con filtro K_β; polvo de rayos X: 30 KV, 15 mA; polvo de muestra: dispersado en un soporte de muestra sin antecedentes. Condición de medición general: Ángulo de inicio - 3 grados; ángulo de detención - 45 grados; toma de muestras - 0,02 grados; velocidad de barrido - 2 grados/min.

Algunos de los compuestos preparados se analizaron utilizando sorción de vapor dinámica (DVS). Las condiciones de DVS típicas son las siguientes:

Analizador de sorción de vapor simétrico SGA-100 de VTI Corporation. El perfil de

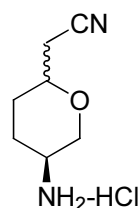
absorción de humedad se completó en cuatro ciclos en incrementos de humedad relativa (HR) del 10 % con la primera adsorción de 25 % a 95 % de HR, seguido de desorción en incrementos de 10 % de 95 % a 5 % de HR. Los criterios de equilibrio fueron 0,0050 % en peso en 5 minutos con un tiempo de equilibrio máximo de 180 minutos; intervalo de registro de datos: 2,00 min o 0,0100 % en peso. Todas las adsorciones y desorciones se realizaron a temperatura ambiente (25 °C). No se aplicó ninguna etapa de presecado.

Algunos de los compuestos preparados se analizaron después del tratamiento en una cámara de humedad. Las condiciones de la cámara de humedad típicas son las siguientes:

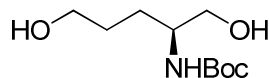
Temperatura: 40 °C; humedad relativa: 75%; tiempo: 5 días.

Temperatura: 30 °C; humedad relativa: 90%; tiempo: 7 días.

Ejemplo 1. Clorhidrato de 2-((2R,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2S,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo (procedimiento 1)



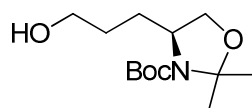
Etapas 1. 1,5-dihidroxipentan-2-ilcarbamato de (S)-terc-butilo



En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un condensador de reflujo, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó borohidruro de litio (29,9 g, 1,37 mol, 2,0 eq.) a temperatura ambiente. Se cargó tetrahidrofurano (THF, 1,12 L) al matraz manteniendo la temperatura interna por debajo de 40 °C. Se enfrió la solución resultante a 0 - 5 °C antes de añadir una solución de 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)pentanedioato de (*S*)-dimetilo (189 g, 0,687 mol) en THF (0,60 L) durante un período mayor que 50 minutos a través del embudo de adición. La mezcla de reacción resultante se calentó gradualmente a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 17 h y después se enfrió a 15 °C. Se le añadió metanol (MeOH, 415 mL) por goteo a la mezcla de reacción durante 3 h para inactivar el borohidruro de litio residual. Durante el añadido del metanol, se observó evolución de gas vigorosa. Se concentró la mezcla de reacción inactivada a presión reducida para retirar la mayoría de los disolventes y se trató el residuo con acetato de etilo (EtOAc, 350 mL) y agua (300 mL). Se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de filtrarse a través

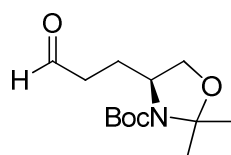
de un embudo sinterizado. Las dos fases del filtrado se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 mL). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (150 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida para proporcionar 1,5-dihidroxipentan-2-ilcarbamato de (*S*)-*terc*-butilo bruto (135 g, 89,7 %) como un sólido blanco, que se utilizó en la reacción posterior sin purificación adicional. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6,42 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,52 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,33 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H), 3,42 – 3,21 (m, 4H), 3,18 (dt, $J = 10,5, 6,1$ Hz, 1H), 1,54 - 1,44 (m, 1H), 1,41 - 1,28 (m, 11H), 1,22 - 1,16 (m, 1H) ppm.

Etapas 2. 4-(3-hidroxipropil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (S)-terc-butilo



En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó 1,5-dihidroxipentan-2-ilcarbamato de (*S*)-*terc*-butilo (105 g, 0,479 mol) y acetona (4,0 L) a temperatura ambiente. Se trató la solución con 2,2-dimetoxipropano (64,8 g, 0,622 mol, 1,3 eq.) y eterato dietílico de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, 6,1 mL, 0,048 mol, 0,10 eq.) secuencialmente a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 18 h antes de añadir trietilamina (TEA, 40,0 mL, 0,287 mol, 0,60 eq.). Se concentró la mezcla resultante a presión reducida para retirar la mayoría de los disolventes y se trató el residuo con EtOAc (1000 mL) y agua (200 mL). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (200 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (SiO_2 , elución en gradiente con 0 al 50 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 4-(3-hidroxipropil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (*S*)-*terc*-butilo (95,0 g, 76,5 %) como un aceite incoloro. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4,39 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H), 3,85 (dd, $J = 8,7, 5,7$ Hz, 1H), 3,72 (s, 1H), 3,66 (dd, $J = 8,8, 1,3$ Hz, 1H), 3,42 – 3,32 (m, 2H), 1,61-1,54 (m, 1H), 1,51 – 1,24 (m, 18H) ppm.

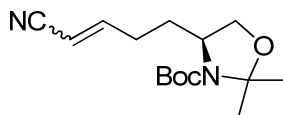
Etapas 3. 2,2-dimetil-4-(3-oxopropil)oxazolidin-3-carboxilato de (S)-terc-butilo



En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó 4-(3-hidroxipropil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (*S*)-*terc*-butilo

(110,0 g, 0,424 mol) y diclorometano (DCM, 1200 mL) a temperatura ambiente. Se trató la solución resultante con el radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO, 6,6 g, 0,042 mol, 0,10 eq.) y cloruro de *tetra-n*-butilamonio (11,8 g, 0,042 mol, 0,10 eq.) a temperatura ambiente antes de añadir secuencialmente una solución acuosa de bicarbonato de sodio (174 g, 2,08 mol, 5,0 eq.) y una solución acuosa de carbonato de potasio (28,7 g, 0,208 mol, 0,50 eq.) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Mientras se agitaba vigorosamente la mezcla resultante, se le añadió *N*-clorosuccinimida (69,1 g, 0,518 mol, 1,22 eq.) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante otras 3 h antes de transferirse a un embudo de separación. Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (250 mL). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (2 x 300 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se concentraron a presión reducida y se secaron al vacío para proporcionar 2,2-dimetil-4-(3-oxopropil)oxazolidin-3-carboxilato de (*S*)-*terc*-butilo bruto (109,1 g, 100 %) como un aceite anaranjado pálido, que se utilizó en la reacción posterior sin purificación adicional. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,64 (s, 1H), 4,01 – 3,60 (m, 3H), 2,39 (dd, $J = 10,9, 4,0$ Hz, 2H), 1,84 - 1,64 (m, 2H), 1,47-1,38 (m, 15H) ppm.

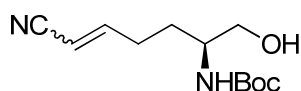
Etapas 4. 4-(4-cianobut-3-enil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (S)-terc-butilo



En un matraz de fondo redondo de 3 L, de 3 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar y un embudo de adición bajo atmósfera de nitrógeno se colocó *terc*-butóxido de potasio (solución 1 M en THF, 1000 mL, 1,00 mol, 1,11 eq.) y tetrahidrofurano (THF, 700 mL) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución a 0 - 5 °C y se le añadió cianometilfosfonato de dietilo (177,2 g, 1,00 mol, 1,11 eq.) por goteo a través del embudo de adición manteniendo la temperatura interna por debajo de 10 °C. Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 2 h y se etiquetó como solución A para la reacción posterior. En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 12 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno separado se colocó 2,2-dimetil-4-(3-oxopropil)oxazolidin-3-carboxilato de (*S*)-*terc*-butilo (232,0 g, 0,901 mol) y THF (3500 mL) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución resultante a 0 - 5 °C y se etiquetó como solución B. Se añadió la solución A a la solución B por goteo manteniendo la temperatura interna por debajo de 5 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó gradualmente a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se cargó agua (500 mL) a la mezcla de reacción y se separaron dos fases. La

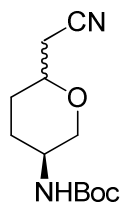
fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 mL, 2 veces). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 100 mL), se secaron en sulfato de magnesio anhidro y concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (SiO_2 , elución en gradiente con 0 al 30% de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 4-(4-cianobut-3-enil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (*S*)-*terc*-butilo (179,0 g, 70,8%) como un aceite incoloro. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6,84 (dt, $J = 16,4, 6,8$ Hz, 0,5H), 6,66 (dt, $J = 10,9, 7,7$ Hz, 0,5H), 5,83 – 5,51 (m, 1H), 3,92 – 3,49 (m, 3H), 2,35 – 2,05 (m, 2H), 1,73 – 1,52 (m, 2H), 1,45 - 1,38 (m, 15H).

Etapas 5. 6-ciano-1-hidroxihex-5-en-2-ilcarbamato de (S)-terc-butilo



En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó 4-(4-cianobut-3-enil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (*S*)-*terc*-butilo (179,0 g, 0,638 mol) y metanol (2000 mL) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución incolora resultante a 0 - 5 °C antes de tratarse con una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico (PTSA, 12,1 g, 0,064 mol, 0,10 eq.). Se calentó gradualmente la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante otras 17 h. Se añadió una solución acuosa de bicarbonato de sodio (100 mL) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se concentró la mezcla resultante a presión reducida hasta aproximadamente 500 mL. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (2 x 500 mL). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (2 x 100 mL), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se concentraron a presión reducida y se secaron al vacío para proporcionar 6-ciano-1-hidroxihex-5-en-2-ilcarbamato de (*S*)-*terc*-butilo bruto (144,2 g, 94 %) como un aceite rosado claro, que se utilizó en la reacción posterior sin purificación adicional. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,72 (dt, $J = 16,3, 6,9$ Hz, 0,5H), 6,53 (dt, $J = 10,9, 7,6$ Hz, 0,5H), 5,51 – 5,08 (m, 1H), 4,73 (s, 1H), 3,83 – 3,34 (m, 3H), 2,49 (dt, $J = 11,3, 5,9$ Hz, 1H), 2,31 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H), 1,74-1,57 (m, 3H), 1,44 (s, 9H).

Etapas 6. 6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-ilcarbamato de (S)-terc-butilo (mezcla de isómeros cis y trans)



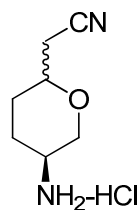
En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó 6-ciano-1-hidroxihex-5-en-2-ilcarbamato de (S)-*terc*-butilo (173,0 g, 0,720 mol) y tetrahidrofurano (1700 mL) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución a 0 – 5 °C antes de añadirle una solución de metóxido de sodio (solución 0,5 M en metanol, 21,30 mL, 0,011 mol, 0,015 eq.) en THF (90 mL) por goteo a través del embudo de adición manteniendo la temperatura interna por debajo de 5 °C. Se agitó la mezcla de reacción resultante a menos de 5 °C durante otra 1 h antes de añadirle salmuera (500 mL) y *terc*-butil metil éter (TBME, 400 mL) a la mezcla de reacción secuencialmente. Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con TBME (250 mL). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (250 mL), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se concentraron a presión reducida y se secaron al vacío para proporcionar 6-(cianometil)tetrahidro-2*H*-piran-3-ilcarbamato de (S)-*terc*-butilo bruto (173,0 g, 100 %) como un sólido viscoso. El producto bruto, obtenido como una mezcla de los isómeros *cis* y *trans*, se utilizó en la reacción posterior sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,13 (s, 0,5H), 4,25 (s, 0,5H), 4,10 (ddd, *J* = 10,9, 4,7, 2,2 Hz, 0,5H), 3,89 (d, *J* = 12,1 Hz, 0,5H), 3,72 (s, 0,5H), 3,66 – 3,57 (m, 1,5H), 3,56 – 3,49 (m, 0,5H), 3,03 (t, *J* = 10,8 Hz, 0,5H), 2,54 (dd, *J* = 6,0, 2,5 Hz, 2H), 2,19 – 2,08 (m, 0,5H), 2,00 (d, *J* = 13,2 Hz, 0,5H), 1,87 (d, *J* = 13,1 Hz, 0,5H), 1,65 – 1,62 (m, 2H), 1,44 (d, *J* = 6,5 Hz, 9H), 1,38 – 1,24 (m, 0,5H).

Etapas 7. Clorhidrato de 2-((2R,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2S,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo (mezcla de isómeros trans y cis)

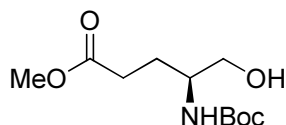
En un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un agitador mecánico superior, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó 6-(cianometil)tetrahidro-2*H*-piran-3-ilcarbamato de (S)-*terc*-butilo (una mezcla de isómeros *cis* y *trans*, 173,0 g, 0,720 mol) y diclorometano (1730 mL) a temperatura ambiente. Se trató la solución resultante con una solución de cloruro de hidrógeno 4,0 M (HCl) en 1,4-dioxano (720 mL, 2,880 mol, 4,0 eq.) a través del embudo de adición. Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 2 h antes de añadir *terc*-butil metil éter (TBME, 1000 mL). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se recogieron los sólidos blancos formados mediante filtración, se lavaron con TBME (280 mL) y se secaron en un horno de vacío con barrido de nitrógeno a 50 °C para proporcionar clorhidrato de 2-((2*R*,5*S*)-5-aminotetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2*S*,5*S*)-5-aminotetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (114,0 g, 89,6 %) como una mezcla de isómeros *trans* y *cis*. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,31 (s, 3H), 4,03 (ddd, *J* = 10,8, 4,5, 2,2 Hz, 0,5H), 3,92 (d, *J* = 12,6 Hz, 0,5H),

3,71 – 3,58 (m, 1H), 3,51 (ddp, $J = 8,8, 4,4, 2,1$ Hz, 0,5H), 3,36 (s, 0,5H), 3,25 (s, 0,5H), 3,04 (s, 0,5H), 2,87 – 2,56 (m, 2H), 2,08 (d, $J = 12,7$ Hz, 0,5H), 1,98 – 1,72 (m, 1,5H), 1,70 – 1,46 (m, 1,5H), 1,36 (qd, $J = 13,2, 3,9$ Hz, 0,5H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 118,48 (118,33), 72,52 (72,07), 67,75 (67,56), 45,53 (44,36), 28,59 (24,33), 26,78 (24,06), 23,42 (23,14) ppm; LCMS calculado para $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$: 140,2 (amina libre), encontrado: 141 ($\text{M}^+ + \text{H}$); proporción de sal (HCl a la amina libre): 1,00.

Ejemplo 2. Clorhidrato de 2-((2R,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2S,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo (procedimiento 2)

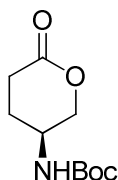


Etapas 1. (4S)-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-5-hidroxipentanoato de metilo



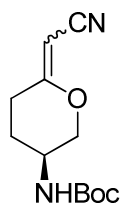
Se trató una solución de ácido (2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-5-metoxi-5-oxopentanoico (40,00 g, 153,1 mmol) en tetrahidrofurano (600 mL) con 4-metilmorfolino (17 g, 168,1 mmol, 1,1 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se enfrió a 0 °C antes de tratarse con cloroformiato de etilo (18 g, 165,9 mmol, 1,08 eq.) por goteo. Se agitó la mezcla de reacción resultante a 0 °C durante otros 20 minutos antes de filtrarse a través de Celite. Se lavó la almohadilla de Celite con THF (50 mL) y se enfrió la solución de filtrado transparente a 0 °C. Se trató la solución enfriada con NaBH_4 sólido (3,00 g, 79,3 mmol, 0,52 eq.) seguido de una solución de NaBH_4 (2,9 g, 76,1 mmol, 0,50 eq.) en diglima (40 mL). Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 3 h antes de tratarse con una solución acuosa 1,0 M de HCl (100 mL). Luego se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se filtraron los sólidos inorgánicos y se enjuagaron con EtOAc (100 mL). Se añadió acetato de etilo (1100 mL) al filtrado y se concentró la solución de filtrado combinada a presión reducida para retirar los disolventes (1200 mL). Se lavó la mezcla restante con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 mL) y agua (2 X 50 mL). Se concentró la fase orgánica a presión reducida para proporcionar (4S)-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-5-hidroxipentanoato de metilo bruto (37,9 g), que se utilizó en la reacción posterior sin purificación adicional.

Etapas 2. (6-oxotetrahidro-2H-piran-3-il)carbamato de (S)-terc-butilo



Se calentó una solución de (4S)-4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-5-hidroxipentanoato de metilo bruto (37,9 g, 153,1 mmol) en tolueno (600 mL) y ácido acético (200 mL) a reflujo durante 60 minutos. Se retiraron los disolventes mediante destilación azeotrópica a presión atmosférica. Durante la destilación azeotrópica, se introdujo una cantidad adicional de tolueno (600 mL) y se retiró un total de 1200 mL de los disolventes mixtos. Se enfrió la mezcla residual a temperatura ambiente durante 3 h y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se recogieron los sólidos mediante filtración, se lavaron con *n*-heptano (100 mL) y se secaron a presión reducida a menos de 40 °C para proporcionar el [(3S)-6-oxotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *tert*-butilo (25 g, 75 % rendimiento general para dos etapas). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,39 (dd, $J = 11,5, 5,4$ Hz, 1H), 4,18 (dd, $J = 11,4, 4$ Hz, 1H), 4,00 (s, 1H), 2,69 - 2,54 (m, 2H), 2,22 (dq, $J = 13,2, 6,6$ Hz, 1H), 1,86 (dq, $J = 14,6, 7,3$ Hz, 1H), 1,43 (s, 9H); GCMS calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 215,25; encontrado: 215,1.

Etapas 3. [(3S,6Z)-6-(cianometilen)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de tert-butilo y [(3S,6E)-6-(cianometilen)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de tert-butilo



Método A.

Se desgasificó una solución de cloruro de cianometil (trimetil)fosfonio (8,8 g, 58,06 mmol, 1,25 eq.) en *N,N*-dimetilacetamida (DMAC, 50 mL) y se enfrió a 0 °C. Se trató la solución enfriada con una solución de hexametildisilazida de litio 1,0 M en THF (LHMDS, 53,4 mL, 53,4 mmol, 1,15 eq.) a 0 °C. Se agitó la mezcla resultante a 0 °C durante 60 minutos antes de tratarse con una solución de [(3S)-6-oxotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *tert*-butilo (10 g, 46,46 mmol) en THF (40 mL) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 2 h seguido de agitación durante la noche a temperatura ambiente. Se inactivó la mezcla de reacción con agua (100 mL) y se separaron las dos fases. Se extrajo la fase acuosa con *tert*-butil metil éter (TBME, 2 X 150 mL). Se lavó la fase orgánica combinada con agua (2 X 150 mL) antes de concentrarse a presión reducida para proporcionar el producto bruto deseado (11 g, 99 %) como una mezcla de [(3S,6Z)-6-

(cianometilen)tetrahidro-2*H*-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo y [(3*S*,6*E*)-6-(cianometilen)tetrahidro-2*H*-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo, que se utilizó en la reacción posterior sin purificación y separación adicionales. Se obtuvieron muestras analíticas de los isómeros individuales mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂, elución en gradiente con 0 - 30 % de *t*-butil metil éter (MTBE) en heptano).

Para el (3*S*,6*E*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,82 (s, 1H), 4,67 (s, 1H), 4,12 (dd, 1H), 3,93 (m, 1H), 3,81 (dd, 1H), 2,79 (dt, 1H), 2,58 (m, 1H), 2,12 (dt, 1H), 1,69 (dt, 1H), 1,40 (s, 9H); GCMS calculado para C₁₂H₁₈N₂O₃: 238,28; encontrado: 238,1.

Para el (3*S*,6*Z*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,81 (s, 1H), 4,48 (s, 1H), 4,19 (dt, 1H), 3,95 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 2,09 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,40 (s, 9H); GCMS calculado para C₁₂H₁₈N₂O₃: 238,28; encontrado: 238,1.

Método B.

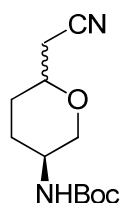
Se trató una mezcla de cloruro de tributil(cianometil)fosfonio (593 g, 2,14 mol) en THF (5,9 L) con *terc*-butóxido de potasio sólido (220 g, 1,97 mol) en partes a 0 °C durante 5 minutos. Se calentó gradualmente la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 h. Se trató la solución de iluro resultante con (6-oxotetrahidro-2*H*-piran-3-il)carbamato de (*S*)-*terc*-butilo (184 g, 0,855 mol) como un sólido a temperatura ambiente y se calentó la mezcla de reacción resultante a 70 °C y se agitó a 70 °C durante 16 h. Cuando el análisis de NMR indicó que el material de partida se había consumido, se enfrió gradualmente la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se vertió la suspensión resultante en un embudo de separación de 50-L que contenía solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (5 L) y hielo (1000 g). Se agregó acetato de etilo (6 L) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Se separaron las dos fases y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (3 L). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con cloruro de sodio acuoso saturado (3 X 4 L), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. Se disolvió el aceite oscuro resultante en DCM (500 mL) y se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, elución en gradiente con 20 - 40 % de acetato de etilo en heptanos) para proporcionar el producto bruto deseado (177 g, 87 % de rendimiento) como una mezcla de [(3*S*,6*Z*)-6-(cianometilen)tetrahidro-2*H*-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo y [(3*S*,6*E*)-6-(cianometilen)tetrahidro-2*H*-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo, que se utilizó en la reacción posterior sin purificación y separación adicionales. Se obtuvieron muestras analíticas de los dos isómeros mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂, elución en gradiente con 0 - 30 % de *t*-butil metil éter (TBME) en heptano).

Para el (3*S*,6*E*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,82(s, 1H), 4,67(s, 1H).

4,12(dd, 1H), 3,93(m, 1H), 3,81(dd,1H), 2,79 (dt, 1H), 2,58 (m, 1H), 2,12(dt, 1H), 1,69(dt, 1H), 1,40 (s, 9H); GCMS calculado para $C_{12}H_{18}N_2O_3$: 238,28; encontrado: 238,1.

Para el (3S,6Z)-isómero: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,81 (s, 1H), 4,48 (s,1H), 4,19 (dt, 1H), 3,95 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 2,09 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,40 (s, 9H); GCMS calculado para $C_{12}H_{18}N_2O_3$: 238,28; encontrado: 238,1.

Etap 4. [(3S,6S)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de terc-butilo y [(3S,6R)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de terc-butilo



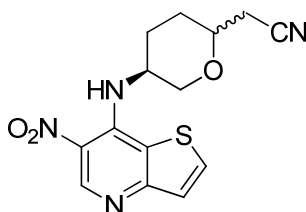
Se hidrogenó una mezcla de [(3S,6Z)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo y [(3S,6E)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo (110 g, 0,462 mol) y paladio sobre carbono (10 % en peso de Pd-C, 50 % húmedo, 14 g) en metanol (1,1 L) a 20 psi hasta que terminó la absorción de hidrogenó (4 a 12 h). Se filtró la mezcla de reacción a través de celite (100 g) y se lavó la almohadilla de Celite con metanol (500 mL). Se concentró el filtrado combinado a presión reducida para proporcionar los productos de reducción brutos como un sólido blancuzco. Se secaron adicionalmente los productos brutos mediante destilación azeotrópica con tolueno (2 x 500 mL) y *n*-heptano (2 x 500 mL) a presión reducida para retirar el metanol y el agua residual para proporcionar [(3S,6S)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo y [(3S,6R)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo (111 g, rendimiento casi cuantitativo) como una mezcla de diastereómeros, que se utilizó directamente en la reacción posterior sin purificación y separación adicionales. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, como una mezcla de dos diastereómeros) δ 5,15 (br s, 1 H), 4,29 (br s, 1 H), 4,14 - 4,07 (m, 1 H), 3,94 - 3,87 (m, 1 H), 3,77 - 3,44 (m, 5 H), 3,09 - 3,01 (m, 1 H), 2,58 - 2,49 (m, 4 H), 2,18 - 2,09 (m, 1 H), 2,05 - 1,95 (m, 1 H), 1,92 - 1,81 (m, 1 H), 1,76 - 1,51 (m, 5 H), 1,46 (s, 9 H), 1,44 (s, 9 H); GCMS calculado para $C_{12}H_{20}N_2O_3$: 240,30; encontrado: 240,1.

Etap 5. Clorhidrato de 2-((2S,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2R,5S)-5-aminotetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo

Se trató una solución de [(3S,6S)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo y [(3S,6R)-6-(cianometil)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de *terc*-butilo (240 g, 0,999 mol) en diclorometano (2,44 L) con una solución de 4 M HCl

en 1,4-dioxano (1 L, 3,99 mol, 4,0 eq.) por goteo durante 30 minutos manteniendo la temperatura interna por debajo de 25 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Cuando el análisis ^1H NMR de la muestra filtrada indicó que se había completado la reacción, se le añadió *terc*-butil metil éter (TBME, 675 mL) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se recogieron los sólidos blancos formados mediante filtración bajo una capa de nitrógeno, se lavaron con TBME (600 mL) y se secaron adicionalmente en un horno de vacío bajo una capa de nitrógeno durante 16 h para proporcionar clorhidrato de 2-((2*S*,5*S*)-5-aminotetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2*R*,5*S*)-5-aminotetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (151,7 g, 86 % de rendimiento) como una mezcla de isómeros *cis* y *trans*. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (una mezcla de isómeros *cis* y *trans*) δ 8,31 (s, 3H), 4,03 (ddd, J = 10,8, 4,5, 2,2 Hz, 0,5H), 3,92 (d, J = 12,6 Hz, 0,5H), 3,71 – 3,58 (m, 1H), 3,51 (ddp, J = 8,8, 4,4, 2,1 Hz, 0,5H), 3,36 (s, 0,5H), 3,25 (s, 0,5H), 3,04 (s, 0,5H), 2,87 – 2,56 (m, 2H), 2,08 (d, J = 12,7 Hz, 0,5H), 1,98 – 1,72 (m, 1,5H), 1,70 – 1,46 (m, 1,5H), 1,36 (qd, J = 13,2, 3,9 Hz, 0,5H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 118,48 (118,33), 72,52 (72,07), 67,75 (67,56), 45,53 (44,36), 28,59 (24,33), 26,78 (24,06), 23,42 (23,14) ppm; LCMS calculado para $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$: 140,2 (amina libre), encontrado: 141 ($\text{M}^+ + \text{H}$); proporción de sal (HCl a la amina libre): 1,00.

Ejemplo 3. 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-nitrotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-nitrotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo



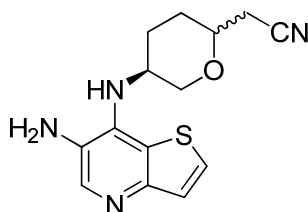
Una mezcla de clorhidrato de 2-((2*S*,5*S*)-5-aminotetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y clorhidrato de 2-((2*R*,5*S*)-5-aminotetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (2464 g, 13,95 mol, 1,16 eq.) y 7-cloro-6-nitrotieno[3,2-*b*]piridina (2581 g, 12,02 mol) en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 12,3 L) se trató con diisopropiletilamina (DIPEA, 4897 g, 46,13 mol, 3,84 eq.) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción resultante a 65 – 75 °C durante 2 – 6 h hasta que la HPLC mostró que se había completado la reacción. Se añadió agua (36,9 L) a la mezcla de reacción por encima de 55 °C para precipitar el producto bruto deseado y se enfrió gradualmente la mezcla resultante a 15 – 30 °C y se agitó a 15 – 30 °C durante 1 – 2 h. Se recogieron los sólidos amarillos mediante filtración,

se lavaron con agua (36,9 L) y *n*-heptano (30,8 L) y se secaron en un horno de vacío a 45 – 50 °C hasta un peso constante para proporcionar el producto bruto deseado (3550 g, 92,8 %) como una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-nitrotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-nitrotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo, que se utilizó en la reacción posterior sin purificación y separación adicionales. Se obtuvieron muestras analíticas del isómero *cis* y el isómero *trans* mediante separación de cromatografía en columna (SiO₂, elución en gradiente con 0-50 % de acetato de etilo en heptano).

Para (2*R*,5*S*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,09 (s, 1H), 8,87 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,35 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,53 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,32 (ddq, *J* = 14,4, 10,1, 4,3 Hz, 1H), 4,17 (ddd, *J* = 10,9, 4,5, 2,2 Hz, 1H), 3,66 (ddd, *J* = 9,2, 6,8, 4,5 Hz, 1H), 3,52 (t, *J* = 10,6 Hz, 1H), 2,85 (dd, *J* = 17,0, 4,4 Hz, 1H), 2,76 (dd, *J* = 17,0, 6,8 Hz, 1H), 2,28-2,23 (m, 1H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,61 – 1,43 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,30, 147,11, 145,78, 136,17, 125,59, 125,47, 118,47, 116,54, 71,79, 70,18, 50,25, 29,95, 29,18, 23,14 ppm; C₁₄H₁₄N₄O₃S (MW 318,3), LCMS (EI) *m/e* 319 (M⁺ + H).

Para (2*S*,5*S*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,69 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 9,14 (s, 1H), 8,37 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,49 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 4,03 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 3,89 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,75 (dd, *J* = 7,1, 3,6 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 17,1, 4,3 Hz, 1H), 2,71 (dd, *J* = 17,1, 7,0 Hz, 1H), 2,07-2,04 (m, 2H), 1,75 – 1,40 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,15, 147,26, 145,49, 136,22, 125,56, 125,28, 118,16, 116,77, 72,53, 70,31, 47,99, 27,84, 25,08, 23,65 ppm; C₁₄H₁₄N₄O₃S (MW 318,3), LCMS (EI) *m/e* 319 (M⁺ + H).

Ejemplo 4. 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo



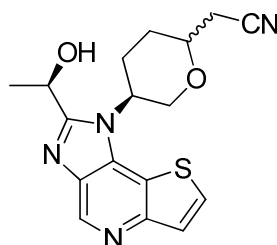
Se trató una solución de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-nitrotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-nitrotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (2000 g, 6,28 mol) en 2,2,2-trifluoroetanol (8,1 L) con paladio sobre carbono (10 % en peso de Pd-C, 50 % húmedo, 200 g) a temperatura ambiente. Se desgaseificó la mezcla de reacción resultante y se rellenó con gas nitrógeno tres veces seguido de gas hidrógeno tres

veces. Se ejecutó la reacción de hidrogenación a 20 – 35 °C con 50 psi de presión de hidrógeno. Cuando HPLC mostró que se había completado la reacción, se redujo la presión a atmosférica antes de desgasificarse y rellenarse con nitrógeno tres veces. Se filtró la mezcla a través de Celite (667 g) y se enjuagó la almohadilla de Celite con metanol (8 L). Se concentró el filtrado a presión reducida por debajo de 50 °C para proporcionar el producto bruto deseado (2242 g) como una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo. Esta mezcla, obtenida como una espuma que contenía los disolventes residuales no se pudo separar en una columna de gel de sílice y se utilizó en la reacción posterior con purificación adicional.

Para (2*R*,5*S*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,93 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,91 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,06 – 3,77 (m, 2H), 3,55 (dt, *J* = 8,7, 4,5, 2,1 Hz, 1H), 3,24 (t, *J* = 10,3 Hz, 1H), 2,92 – 2,62 (m, 2H), 2,20 – 1,97 (m, 1H), 1,88 – 1,70 (m, 1H), 1,66 – 1,51 (m, 1H), 1,50 – 1,37 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150,28, 136,88, 134,86, 128,10, 124,86, 124,82, 118,55, 117,95, 72,14, 71,70, 49,30, 30,79, 29,74, 23,32 ppm; C₁₄H₁₆N₄OS (MW 288,3), LCMS (EI) *m/e* 289 (M⁺ + H).

Para (2*S*,5*S*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,01 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,09 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 4,76 (s, 2H), 3,99 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,87 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 3,75 (dd, *J* = 11,7, 2,2 Hz, 1H), 3,66 (dddd, *J* = 10,3, 7,2, 4,4, 2,6 Hz, 1H), 2,85 – 2,62 (m, 2H), 1,86 – 1,69 (m, 2H), 1,63 (qd, *J* = 12,7, 12,2, 4,4 Hz, 1H), 1,52 – 1,44 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150,81, 137,91, 135,84, 128,17, 125,36, 124,83, 118,71, 118,61, 72,37, 70,23, 46,81, 27,08, 24,94, 23,44 ppm; C₁₄H₁₆N₄OS (MW 288,3), LCMS (EI) *m/e* 289 (M⁺ + H).

Ejemplo 5. 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo



En el reactor A, se trató una suspensión de (*R*)-(+)-lactamida (2045 g, 22,96 mol, 3,0 eq.) en THF (10,1 L) con Et₃O-BF₄ (4405 g, 22,96 mol, 3,0 eq.) a -10 a 0 °C.

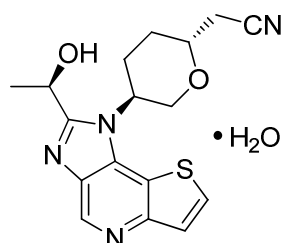
Se agitó la mezcla resultante en el reactor A a menos de 10 °C hasta que se formó una solución transparente. En el reactor B, se calentó una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (2207 g, 7,65 mol) en etanol (66,2 L) a reflujo para proporcionar una solución transparente. Se añadió gradualmente la solución en el reactor A a la mezcla en el reactor B manteniendo la mezcla en el reactor B a reflujo. La mezcla de reacción resultante en el reactor B se mantuvo a reflujo hasta que la HPLC mostró que se había completado la reacción. Se enfrió la mezcla de reacción en el reactor B a 10 – 30 °C antes de añadirle gradualmente una solución acuosa de bicarbonato de sodio (664 g, 7,4 L). Durante el añadido de solución acuosa de bicarbonato de sodio para ajustar el pH a 8 – 9, se controló la temperatura interna a menos de 35 °C. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante otros 30 minutos antes de filtrarse a través de Celite (1 kg). Después de la filtración, se enjuagó el lecho de Celite con etanol (5,0 L). Se concentró el filtrado combinado a presión reducida a menos de 60 °C y se le añadió diclorometano (17,7 L) para disolver el residuo. Se trató la solución de DCM resultante con una solución acuosa 1 N de HCl (19,0 L) para ajustar el pH de la fase acuosa a 1. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separaron las dos fases y se deseó la fase de DCM. Se lavó la fase acuosa ácida con DCM (8,6 L). Se separaron las dos fases y se deseó la fase de DCM. Se trató la fase acuosa ácida con acetato de etilo (30,6 L) seguido de carbonato de sodio sólido (540 g). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente hasta que la fase acuosa alcanzó un pH de 9 – 10. Se añadió *n*-heptano (60,0 L) a la mezcla y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante al menos 1 h. Se recogieron los sólidos por filtración y se lavaron con agua (8,6 L) y *n*-heptano (8,6 L) antes de disolverse en una mezcla de metanol y DCM. La solución resultante de MeOH y DCM se pasó por un lecho de gel de sílice y se lavó el lecho de gel de sílice con una mezcla de MeOH y DCM (1 a 9 en volumen). Se concentró la solución combinada a presión reducida para proporcionar un primer cultivo del producto deseado (1450 g), una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo, como una espuma blanca. Las dos fases del filtrado se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2 X 25,0 L). Se concentraron los extractos orgánicos combinados a presión reducida y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂, elución en gradiente con 0,5 % al 7,5 % de MeOH en DCM) para proporcionar un segundo cultivo del producto deseado (515 g; 1965 g en total, 75 %) y también una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-

imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo, como una espuma blanca. La mezcla de dos diastereómeros no se pudo separar mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se utilizó en la reacción posterior sin separación adicional.

Para el (2*R*,5*S*)-isómero: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, J = 11,0 Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, J = 17,0, 4,2 Hz, 1H), 2,84 (dd, J = 17,0, 6,6 Hz, 1H), 2,65 (qd, J = 12,7, 4,3 Hz, 1H), 2,19 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 2,06 (d, J = 13,4 Hz, 1H), 1,72 (dd, J = 12,6, 3,7 Hz, 1H), 1,66 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (MW 342,4), LCMS (EI) m/e 343 (M^+ + H).

Para el (2*S*,5*S*)-isómero: ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8,93 (s, 1H), 7,80 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 5,00 (dq, J = 9,4, 4,7 Hz, 1H), 4,43 (dd, J = 11,8, 9,3 Hz, 1H), 4,26 (dd, J = 8,6, 3,7 Hz, 1H), 4,16 (s, 1H), 4,03 – 3,89 (m, 1H), 3,17 (dd, J = 17,1, 8,6 Hz, 1H), 2,87 (dd, J = 17,2, 5,4 Hz, 1H), 2,57 (dtd, J = 14,8, 10,8, 4,2 Hz, 1H), 2,20 – 1,99 (m, 2H), 1,88-1,82 (m, 1H), 1,73 (d, J = 6,4 Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 158,04, 152,88, 142,12, 136,81, 136,46, 127,44, 127,14, 119,04, 116,97, 70,00, 64,83, 64,03, 54,55, 28,06, 25,73, 22,46, 21,94 ppm; $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (MW 342,4), LCMS (EI) m/e 343 (M^+ + H).

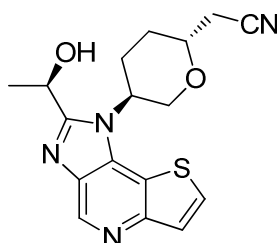
Ejemplo 6. 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato (producto bruto)



Una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (800 g, 2,34 mol) en 2-propanol (IPA, 16 L) se trató con una solución de 1,0 M *terc*-butóxido de potasio en THF (234 mL, 0,234 mol, 0,10 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Cuando la HPLC mostró que la reacción de racemización promovida por una base se había completado, se trató la mezcla de reacción con una solución acuosa 0,1 M de HCl (aproximadamente 2,4 L) para ajustar el pH a 6 – 7.

Se concentró la mezcla a presión reducida a menos de 50 °C para retirar parcialmente el IPA (aproximadamente 9,6 L) y se trató el residuo con agua (10,5 L) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 h. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavaron con una mezcla de IPA y agua (2,4 L, 1 a 2 en volumen) y se secaron a presión reducida a menos de 50 °C con un peso constante para proporcionar 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato bruto (657 g, 78 %) como un sólido blanco. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, *J* = 17,0, 4,2 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 17,0, 6,6 Hz, 1H), 2,65 (qd, *J* = 12,7, 4,3 Hz, 1H), 2,19 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 2,06 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H), 1,72 (dd, *J* = 12,6, 3,7 Hz, 1H), 1,66 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; C₁₇H₁₈N₄O₂S (MW 342,4), LCMS (EI) *m/e* 343 (M⁺ + H); contenido de agua por KF: 5,15 %.

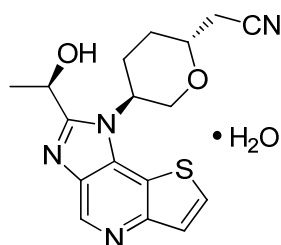
Ejemplo 7. 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (base libre cristalina anhidra)



Una solución de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato (650 g, 1,80 mol) en metanol (7 L) se filtró para ser pulida antes de concentrarse a presión atmosférica para retirar el metanol (5 L). Se trató la solución concentrada resultante con acetato de etilo (8,5 L) y se continuó la destilación atmosférica para retirar los disolventes (5,3 L). Se añadió gradualmente *n*-heptano (7,8 L) a la mezcla residual a 60 – 75 °C y la mezcla resultante se enfrió gradualmente a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante al menos 1,5 h. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavaron con *n*-heptano (2,0 L) y se secaron al vacío a menos de 50 °C con un peso constante para proporcionar 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo cristalino anhidro (586 g, 95 %) como un sólido blanco. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m,

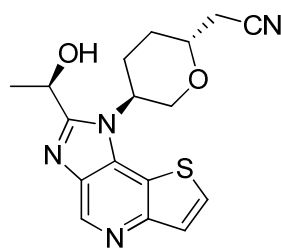
1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, $J = 17,0, 4,2$ Hz, 1H), 2,84 (dd, $J = 17,0, 6,6$ Hz, 1H), 2,65 (qd, $J = 12,7, 4,3$ Hz, 1H), 2,19 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 2,06 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H), 1,72 (dd, $J = 12,6, 3,7$ Hz, 1H), 1,66 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (MW 342,4), LCMS (EI) m/e 343 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ejemplo 8. 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato



Una suspensión de 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo cristalino anhidro (585 g, 1,71 mol) en agua (5,9 L) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Cuando la XRPD confirmó que la conversión de la forma cristalina anhidra a la forma cristalina monohidrato se había completado, se recogieron los sólidos mediante filtración y se lavaron con agua (2,9 L). Se secó la torta húmeda a 20 – 50 °C ya sea en un horno de vacío o empujando un vacío desde el filtro hasta que el contenido de agua analizado por KF fuera $5 \pm 0,3$ % para proporcionar 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato cristalino (602 g, 98 %) como un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 7,69 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, $J = 11,0$ Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, $J = 17,0, 4,2$ Hz, 1H), 2,84 (dd, $J = 17,0, 6,6$ Hz, 1H), 2,65 (qd, $J = 12,7, 4,3$ Hz, 1H), 2,19 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 2,06 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H), 1,72 (dd, $J = 12,6, 3,7$ Hz, 1H), 1,66 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; LCMS calculado para: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: 342,4, encontrado: 343 ($\text{M}^+ + \text{H}$); contenido de agua: 5,15 %.

Ejemplo 9. 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo (base libre cristalina anhidra)



Una solución de ((2*R*,5*S*)-5-{2-[(1*R*)-1-hidroxietil]-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il}tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo amorfo (84,5 g, 247 mmol) en metanol (MeOH, 800 mL) se filtró para ser pulida y se transfirió a un matraz de fondo redondo de 5 L, de 5 cuellos equipado con un condensador de reflujo. Se utilizaron 200 mL adicionales de metanol para lavar el embudo de filtro. A la solución de metanol resultante, se le añadió acetato de etilo (2000 mL) y se calentó la solución transparente resultante a 70 °C durante 30 minutos. Se destiló la mezcla de metanol y acetato de etilo a presión atmosférica. Se añadieron 2000 mL adicionales de acetato de etilo cuando la mezcla de disolventes recogida alcanzó 1700 mL y se continuó la destilación atmosférica. Cuando la mezcla de disolventes recogida total alcanzó 4000 mL (en aproximadamente 8 h), la solución restante en el matraz se volvió turbia y se formaron gradualmente los sólidos. Se continuó la destilación atmosférica hasta que la mezcla de disolventes recogida total alcanzó 4250 mL y la mezcla de disolventes restante, principalmente acetato de etilo, en el matraz fue de aproximadamente 750 mL. Se añadió lentamente *n*-heptano (1150 mL) al matraz a aproximadamente 70 °C (EtOAc a *n*-heptano aproximadamente a 1 a 1,5) y se enfrió gradualmente la mezcla resultante a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante otras 2 – 3 h para iniciar la cristalización. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavaron con *n*-heptano (2 x 300 mL) y se secaron a 50 °C en un horno de vacío con barrido de N₂ para proporcionar ((2*R*,5*S*)-5-{2-[(1*R*)-1-hidroxietil]-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il}tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (78,1 g, 92,4 %) como un polvo cristalino anhidro blanco.

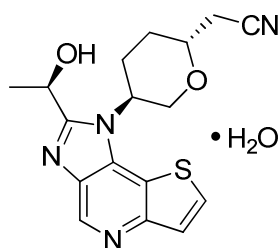
C₁₇H₁₈N₄O₂S (MW 342,42), LCMS (EI) *m/e* 343 (M⁺ + H); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,97 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,30 (t, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,17 (s, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, *J* = 17,0, 4,2 Hz, 1H), 2,86 (dd, *J* = 17,0, 6,6 Hz, 1H), 2,76 – 2,56 (m, 1H), 2,19 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H), 2,06 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 1,72 (dd, *J* = 12,6, 3,7 Hz, 1H), 1,66 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; contenido de agua por KF: 1,15 % en peso. El termograma de DSC que se muestra en la figura 1 reveló un evento endotérmico con un inicio a 185,05 °C, que se refiere a la fusión del compuesto, y

el pico a 189,71 °C. El evento endotérmico a aproximadamente 260 °C se asocia con la descomposición del compuesto. El termograma de TGA que se muestra en la figura 2 reveló una pérdida de peso del 1,25 % hasta 200 °C. Se observó una pérdida de peso significativa a temperaturas por encima de 200 °C debido a la descomposición del compuesto. Se determinó el patrón de XRPD para el compuesto del título y se muestra en la figura 3. Se proporciona una lista de picos 2-theta en la tabla 2 abajo.

Tabla 2

2-Theta	d (Å)	Intensidad neta	Intensidad bruta	Intensidad relativa (%)
6,608	13,3654	608	931	2,7
8,802	10,0379	8330	8970	37,6
9,699	9,1114	1560	2280	7,0
10,016	8,8244	2260	3010	10,2
10,574	8,3595	6020	6800	27,2
13,207	6,6983	2970	3870	13,4
14,509	6,1000	1490	2560	6,7
15,092	5,8659	3980	5180	18,0
16,329	5,4241	21900	23300	98,8
16,889	5,2454	1350	2870	6,1
17,554	5,0482	5510	7120	24,9
18,017	4,9194	4010	5680	18,1
19,081	4,6474	11000	12800	49,6
19,726	4,4971	3490	5320	15,8
21,174	4,1927	7880	9770	35,6
21,648	4,1018	2740	4640	12,4
22,466	3,9544	1080	2980	4,9
23,387	3,8007	3290	5160	14,9
24,037	3,6993	12100	13900	54,7
25,096	3,5456	626	2370	2,8
26,204	3,3980	5000	6720	22,6
26,420	3,3708	6510	8220	29,4
26,858	3,3169	1190	2880	5,4
27,681	3,2201	1320	2970	6,0
27,933	3,1916	1200	2830	5,4
29,318	3,0439	1060	2600	4,8
31,169	2,8672	1510	2870	6,8
31,300	2,8555	1560	2910	7,1
33,466	2,6755	607	1730	2,7
35,550	2,5233	826	1820	3,7
40,831	2,2083	501	1450	2,3
41,961	2,1514	966	1920	4,4
44,759	2,0232	618	1520	2,8
51,694	1,7669	229	1020	1,0

Ejemplo 10. 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato



En un matraz de fondo redondo de 2-L equipado con un condensador de reflujo, un termopar y una barra de agitación magnética, se cargó 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo amorfo (93,0 g, 272 mmol) y alcohol isopropílico (IPA, 1116 mL) a temperatura ambiente. Se calentó la suspensión resultante a 50 - 55 °C para obtener una solución transparente. Se filtró para ser pulida la solución a través de un embudo de filtro a 50 °C. Se utilizó una cantidad adicional de alcohol isopropílico (IPA, 47 mL) para lavar el embudo de filtro. A la solución combinada se le añadió agua (930 mL) durante 30 minutos manteniendo la temperatura interna a 45 - 50 °C. Se formó gradualmente un precipitado blanco tras el añadido del agua. Se retiró el IPA por evaporación giratoria al vacío con un baño de agua a 50 °C. Durante la destilación, se le añadió una cantidad adicional de agua (1209 mL) para mantener el volumen total de la mezcla a aproximadamente 1500 mL. Después de la destilación al vacío, se enfrió gradualmente la mezcla resultante a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 – 2 h. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavaron con agua (186 mL) y se secaron en un embudo de filtro con un vacío de la cubierta a temperatura ambiente durante 16 h para proporcionar 2-((2R,5S)-5-(2-((R)-1-hidroxietil)-1H-imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo monohidrato (91,6 g, 94 %) como un polvo cristalino blanco. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, *J* = 17,0, 4,2 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 17,0, 6,6 Hz, 1H), 2,65 (qd, *J* = 12,7, 4,3 Hz, 1H), 2,19 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 2,06 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H), 1,72 (dd, *J* = 12,6, 3,7 Hz, 1H), 1,66 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; C₁₇H₁₈N₄O₂S (MW 342,42), LCMS (EI) *m/e* 343 (M⁺ + H). Contenido de agua por KF: 5,15 % en peso. Se determinó el intervalo de fusión/descomposición por DSC y se muestra en la figura 4. El termograma de DSC reveló un evento endotérmico de deshidratación con un inicio a 69,37 °C y el pico a 106,41 °C, seguido de la fusión con un inicio a 131,01 °C y un pico a 139,99

°C. El termograma de TGA (figura 5) mostró una pérdida de peso del 4,9 % hasta 150 °C, que corresponde al contenido de agua del monohidrato. Después de 200 °C, el compuesto comienza a descomponerse. Se determinó el patrón de XRPD para el compuesto del título y se muestra en la figura 6. Se proporciona una lista de picos 2-theta en la tabla 3 abajo.

Tabla 3

2-Theta	d (Å)	Intensidad neta	Intensidad bruta	Intensidad relativa (%)
8,477	10,4224	28200	28700	91,9
8,678	10,1819	14500	15000	47,3
11,368	7,7776	2600	3320	8,5
13,150	6,7274	564	1320	1,8
13,568	6,5211	162	922	0,5
14,592	6,0656	23400	24300	76,1
15,064	5,8765	21200	22100	69,0
15,789	5,6082	9180	10100	29,9
16,917	5,2369	6130	7140	19,9
17,427	5,0846	3000	4020	9,8
18,599	4,7668	7670	8720	25,0
19,388	4,5747	20300	21400	66,2
20,160	4,4011	4640	5700	15,1
21,091	4,2089	6690	7710	21,8
21,463	4,1368	839	1840	2,7
22,460	3,9554	3070	4150	10,0
22,871	3,8853	1370	2510	4,5
23,366	3,8040	6710	7900	21,8
23,503	3,7822	8550	9750	27,8
24,518	3,6279	706	2000	2,3
25,065	3,5499	29900	31200	97,3
25,674	3,4670	3830	5200	12,4
25,878	3,4401	11100	12500	36,2
26,306	3,3857	12500	13900	40,7
26,547	3,3549	18100	19500	58,9
27,574	3,2323	6810	8210	22,2
28,299	3,1511	717	2100	2,3
28,625	3,1160	3130	4490	10,2
29,200	3,0559	1670	3000	5,4
29,828	2,9930	1100	2370	3,6
30,451	2,9332	3810	5010	12,4
30,715	2,9085	5430	6600	17,7
31,001	2,8823	1830	2960	6,0
31,335	2,8524	1820	2910	5,9
32,496	2,7531	420	1420	1,4
33,388	2,6815	4050	5030	13,2
34,026	2,6327	1220	2180	4,0

34,291	2,6130	861	1800	2,8
35,285	2,5416	724	1630	2,4
35,729	2,5111	1990	2900	6,5
36,639	2,4507	684	1590	2,2
36,931	2,4320	744	1640	2,4
37,470	2,3983	2760	3630	9,0
37,686	2,3850	1160	2020	3,8
39,059	2,3043	567	1430	1,8
39,713	2,2678	767	1680	2,5
40,791	2,2103	908	1870	3,0
41,862	2,1563	2100	3070	6,8
42,406	2,1298	511	1470	1,7
43,684	2,0704	531	1430	1,7
44,647	2,0280	1760	2680	5,7
45,207	2,0042	462	1430	1,5
45,857	1,9773	428	1430	1,4
47,419	1,9157	1510	2540	4,9
47,976	1,8947	1750	2780	5,7
48,744	1,8667	896	1890	2,9
49,480	1,8406	470	1420	1,5
51,479	1,7737	811	1630	2,6
52,307	1,7476	452	1270	1,5
53,685	1,7060	321	1130	1,0

Ejemplo 11. Absorción dinámica de vapor

Se realizó un estudio de sorción de vapor dinámica (DVS) al compuesto del ejemplo 9 para monitorizar la hidroscopticidad, la formación de hidrato y la deshidratación, así como la transformación de la forma sólida. El perfil de absorción de humedad se completó en cuatro ciclos en incrementos de humedad relativa (HR) del 10 % con la primera adsorción de 25 % a 95 % de HR, seguido de desorción en incrementos de 10 % de 95 % a 5 % de HR. Los criterios de equilibrio fueron los siguientes: 0,0050 % en peso en 5 minutos con un tiempo de equilibrio máximo de 180 minutos. Todas las adsorciones y desorciones se realizaron a temperatura ambiente (25 °C). No se aplicó la etapa de secado previo a la muestra. La absorción de agua de la forma anhidra fue lenta por debajo del 85 % de HR y rápida por encima del 85 % de HR. Los cambios en los patrones de XRPD antes y después de DVS sugieren un cambio de forma sólida. Después del ciclo 4 de DVS, se convirtió completamente la forma anhidra a la forma hidrato. En condiciones de almacenamiento ambiente, la forma anhidra absorberá lentamente el agua y se convertirá en la forma hidrato. El proceso de deshidratación del hidrato a la forma anhidra es muy lento, incluso al 5 % de HR. La forma hidrato es físicamente estable en una amplia variedad de condiciones de humedad. Las isotermas de sorción/desorción de vapor se muestran en la figura 7 y la figura 8. Se muestra una superposición del patrón XRPD antes y después de DVS en la

figura 9.

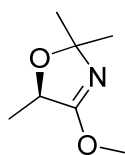
Ejemplo 12. Estudio A de cámara de humedad

Se colocó el compuesto del ejemplo 9 en una cámara de humedad fijada a 40 °C y 75 % de humedad relativa durante 5 días. Se analizó la muestra resultante por XRPD, TGA y DSC como se muestra en las figuras 10 a 12. Basándose en los datos de XRPD, se convirtió la base libre cristalina anhidra en la forma de hidrato cristalino. El contenido de agua por KF fue del 4,6 % y la pérdida de peso observada por TGA fue del 5,01 %.

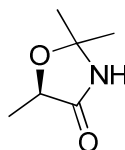
Ejemplo 13. Estudio B de cámara de humedad

Se colocó el compuesto del ejemplo 9 en una cámara de humedad fijada a 30 °C y 90% de humedad relativa (HR) durante 7 días. Se analizó la muestra resultante por XRPD, TGA y DSC como se muestra en las figuras 13 a 15. Basándose en la XRPD, se convirtió la base libre cristalina anhidra en la forma de hidrato cristalino. Los patrones de XRPD de la muestra a 30 °C / 90 % de HR correspondieron a la forma hidrato obtenida de una suspensión acuosa de la sustancia de fármaco de la base libre cristalina anhidra. El contenido de agua por KF fue del 4,72% y la pérdida de peso observada por TGA fue del 5,05%.

Ejemplo 14. (R)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol



Etapas 1. (R)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona



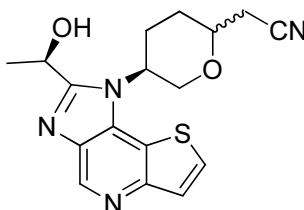
A una solución de (2R)-2-hidroxiopropanamida (30 g, 337 mmol) en acetona se le añadió 2,2-dimetoxipropano (51,8 mL, 421 mmol, 1,25 equiv.) y eterato dietílico de trifluoruro de boro (BF₃-Et₂O, 92,13 mL, 16,8 mmol, 0,05 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Cuando la TLC indicó que se había completado la reacción, se retiró el disolvente a presión reducida a menos de 35 °C y se añadió el residuo a metil *t*-butil éter (MTBE, 350 mL). Se trató la solución con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (15 mL), bicarbonato de sodio sólido (NaHCO₃, 4 g) y sulfato de sodio sólido (Na₂SO₄, 30 g) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se filtraron los sólidos y se

lavarón con metil *t*-butil éter (MTBE, 50 mL). Se separaron las dos fases de los filtrados combinados y se lavó la fase orgánica con agua (30 mL) y se secó con sulfato de sodio (Na_2SO_4 , 20 g). Después de retirar el agente de secado, se concentró el filtrado a presión reducida y se cambió el disolvente a *n*-hexano para proporcionar el producto deseado. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavaron con *n*-hexano y se secaron para dar el producto deseado, (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona, (42 g, 97 %) como sólidos cristalinos blancos. ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ 7,66 (s, 1H), 4,37 (q, $J = 6,7$ Hz, 1H), 1,47 (s, 3H), 1,44 (s, 3H), 1,36 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2) δ 175,58 (s), 90,70 (s), 73,76 (s), 29,97 (s), 28,52 (s), 18,60 (s) ppm.

Etapas 2. (R)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol

A una solución de (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona (20 g, 155 mmol) en diclorometano (DCM, 200 mL) se le añadió tetrafluoruro de trimetoxonio ($\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$, 24,1 g, 155 mmol, 1,0 equiv.) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 6 horas. Cuando ^1H -NMR indicó que la reacción se había completado, se añadió la mezcla de reacción a diclorometano (DCM, 100 mL) y se enfrió a 0 – 5 °C. Se trató la solución resultante con una solución acuosa de carbonato de sodio 2M (Na_2CO_3 , 230 mL), manteniendo la temperatura interna a 0 – 5 °C. Se separaron las dos fases y se lavó la fase orgánica con agua (2 x 100 mL), se secó sobre sulfato de sodio (Na_2SO_4 , 50 g) y se concentró a presión reducida para dar el producto deseado bruto, (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol, (19 g, 87 %) como un aceite amarillo, que se puede utilizar directamente para la reacción posterior sin purificación adicional. Se obtuvo el producto deseado puro (12 g; bp 50°C a 50 mba) mediante destilación de vacío como un aceite incoloro. ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ 4,58 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 1,41 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,29 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2) δ 169,80 (s), 103,90 (s), 75,08 (s), 56,46 (s), 30,50 (s), 28,69 (s), 20,07 (s) ppm.

Ejemplo 15. Preparación alternativa de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo



A un matraz, se le añadió (*R*)-2,2,5-trimetiloxazolidin-4-ona (6,7 g, 52 mmol), tetrafluoroborato de trimetiloxonio ($\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$, 7,7 g, 52 mmol) y diclorometano anhidro (DCM, 50 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Cuando ^1H NMR reveló que la formación de (*R*)-4-metoxi-2,2,5-trimetil-2,5-dihidrooxazol se había completado, se cargó la mezcla de reacción con una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (ejemplo 4, 5,0 g, 17,3 mmol) a temperatura ambiente. Se cambió el disolvente a metanol (80 mL) mediante el añadido de metanol a la mezcla de reacción y destilación para retirar el diclorometano. Se calentó la mezcla de reacción resultante a 65 °C durante 1,5 horas. Cuando la HPLC mostró que se había completado la reacción, se retiró el disolvente a presión reducida y se trató el residuo con diclorometano (80 mL). Se trató la mezcla resultante con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 10 mL) seguida de NaHCO_3 sólido (11,6 g, 139 mmol) antes de agitarse a temperatura ambiente durante 30 min. Se secó la mezcla sobre Na_2SO_4 y se filtró el líquido. Se retiraron los sólidos mediante filtración y se separaron las dos fases del filtrado. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. Se dividió el residuo en ácido clorhídrico acuoso 0,1 M (HCl) y se lavó la solución acuosa ácida resultante con diclorometano (2 x 20 mL). Se neutralizó la solución acuosa ácida con NaHCO_3 para precipitar el producto deseado bruto. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavaron con agua y se secaron para dar el producto deseado (5,0 g, 84 % de rendimiento) como una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo.

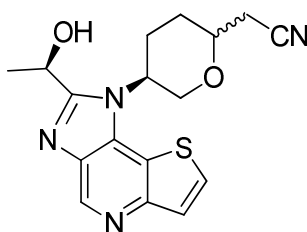
La mezcla de dos diastereómeros no se pudo separar mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se utilizó directamente en la reacción posterior (véase, p. ej., el ejemplo 6) sin separación adicional.

Para el (2*R*,5*S*)-isómero: ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, J = 11,0 Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, J = 17,0, 4,2 Hz, 1H), 2,84 (dd, J = 17,0, 6,6 Hz, 1H), 2,65 (qd, J = 12,7, 4,3 Hz, 1H), 2,19 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 2,06 (d, J = 13,4 Hz, 1H), 1,72 (dd, J = 12,6, 3,7 Hz, 1H), 1,66 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (MW 342,4), LCMS (EI) m/e 343 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

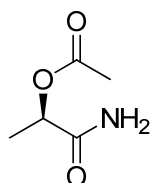
Para el (2*S*,5*S*)-isómero: ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8,93 (s, 1H), 7,80 (d, J =

5,5 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 5,00 (dq, J = 9,4, 4,7 Hz, 1H), 4,43 (dd, J = 11,8, 9,3 Hz, 1H), 4,26 (dd, J = 8,6, 3,7 Hz, 1H), 4,16 (s, 1H), 4,03 – 3,89 (m, 1H), 3,17 (dd, J = 17,1, 8,6 Hz, 1H), 2,87 (dd, J = 17,2, 5,4 Hz, 1H), 2,57 (dtd, J = 14,8, 10,8, 4,2 Hz, 1H), 2,20 – 1,99 (m, 2H), 1,88-1,82 (m, 1H), 1,73 (d, J = 6,4 Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 158,04, 152,88, 142,12, 136,81, 136,46, 127,44, 127,14, 119,04, 116,97, 70,00, 64,83, 64,03, 54,55, 28,06, 25,73, 22,46, 21,94 ppm; $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (MW 342,4), LCMS (EI) m/e 343 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ejemplo 16. Preparación alternativa de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo

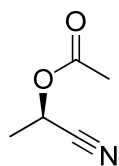


Etapas 1. Acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo



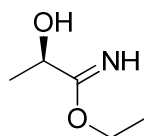
A un matraz de fondo redondo de 1 L y 3 cuellos equipado con un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno, un termopar y una barra de agitación magnética bajo nitrógeno, se le cargó (*R*)-2-hidroxiopropanamida (49,95 g, 543,8 mmol) y tetrahidrofurano (THF, 300 mL) a temperatura ambiente. La solución amarilla resultante se enfrió a 0 - 5 °C mediante un baño de hielo-agua antes de cargarle cloruro de acetilo (40,60 mL, 571,0 mmol, 1,05 equiv.) manteniendo la temperatura interna a menos de 20 °C. Después de que la temperatura interna se redujo nuevamente a menos de 5 °C, se le cargó 4-metilmorfolina (59,2 mL, 538,0 mmol, 0,99 equiv.) manteniendo la temperatura interna a menos de 10 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas antes de filtrar la mezcla para retirar los sólidos. Se lavaron los sólidos con THF (60 mL) y se concentró el filtrado a presión reducida para proporcionar el producto deseado bruto, acetato de (*R*)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo, (75,0 g, 105,2 %) como un sólido blanco a blancuzco, que se utilizó directamente en la siguiente reacción sin purificación adicional. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,42 (s, 1 H), 7,14 (s, 1 H), 4,84 (q, J = 7,6 Hz, 1 H), 2,03 (s, 3 H), 1,29 (d, J = 7,6 Hz, 3 H) ppm.

Etapa 2. Acetato de (R)-1-cianoetilo



A un matraz de fondo redondo de 3 L y 3 cuellos equipado con un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno, un termopar y una barra de agitación magnética bajo nitrógeno, se le cargó acetato de (R)-1-amino-1-oxopropan-2-ilo bruto (70,0 g, 533,8 mmol) y *N,N*-dimetilformamida (DMF, 280 mL) a temperatura ambiente. Se trató la solución amarilla clara resultante con cloruro cianúrico (44,0 g, 240,0 mmol) en 2-metoxi-2-metilpropano (TBME, 600 mL) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se filtraron los sólidos blancos y se lavaron con TBME (800 mL). Se lavaron los filtrados orgánicos combinados secuencialmente con solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso (NaHCO₃, 200 mL), agua (4 × 200 mL) y salmuera (100 mL). Se secó la fase orgánica resultante con MgSO₄ anhidro (15 g) y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto deseado bruto, acetato de (R)-1-cianoetilo, (42,03 g, 69,6 %) como un aceite incoloro a amarillo claro, que se utilizó directamente en la reacción posterior sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5,46 (q, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 2,09 (s, 3 H), 1,53 (d, *J* = 7,6 Hz, 3 H) ppm.

Etapa 3. 2-hidroxipropanimidato de (R)-etilo



A un matraz de fondo redondo de 100 mL equipado con una barra de agitación magnética se le cargó acetato de (R)-1-cianoetilo bruto (1,021 g, 8,665 mmol) y etanol (EtOH, 1,518 mL, 26,0 mmol) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución resultante a -40 °C antes de burbujearse en gas cloruro de hidrógeno (HCl) durante 45 segundos. La mezcla de reacción se calentó gradualmente hasta temperatura ambiente. Después de 16 horas, se enfrió la mezcla de reacción a 0 °C antes de cargarle secuencialmente tetrahidrofurano (THF, 2,0 mL, 25 mmol) y 4-metilmorfolina (0,865 mL, 7,87 mmol). Se retiraron los sólidos mediante filtración y el producto deseado bruto, 2-hidroxipropanimidato de (R)-etilo, en el filtrado se utilizó directamente en la reacción posterior sin purificación adicional. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,14 (s, 1 H), 4,52 - 4,40 (m, 3 H), 1,36 - 1,31 (m, 6 H) ppm.

Etapa 4. 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-

imidazo[4,5-d]tieno[3,2-b]piridin-1-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetonitrilo

A un matraz de fondo redondo de 100 mL y 3 cuellos equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar y una barra de agitación magnética bajo nitrógeno se le cargó una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(6-aminotieno[3,2-*b*]piridin-7-ilamino)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo (ejemplo 4, 0,30 g, 1,04 mmol) en etanol (EtOH, 4,0 mL) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla a 80 °C para proporcionar una solución transparente antes de añadirle una solución del 2-hidroxiopropanimidato de (*R*)-etilo bruto en THF generado en la etapa anterior a la solución de etanol a 80 °C. Cuando se completó la reacción después de 1 hora como lo indica la HPLC, se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción enfriada y se concentró el filtrado a presión reducida para proporcionar el producto deseado bruto (0,3 g, 84 % de rendimiento) como una mezcla de 2-((2*R*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo y 2-((2*S*,5*S*)-5-(2-((*R*)-1-hidroxietil)-1*H*-imidazo[4,5-*d*]tieno[3,2-*b*]piridin-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetonitrilo, que no se pudo separar mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se utilizó directamente en la reacción posterior sin separación adicional (véase, p. ej., el ejemplo 6).

Para el (2*R*,5*S*)-isómero: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,00 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,31 (t, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 1H), 4,02 (s, 1H), 2,96 (dd, *J* = 17,0, 4,2 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 17,0, 6,6 Hz, 1H), 2,65 (qd, *J* = 12,7, 4,3 Hz, 1H), 2,19 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 2,06 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H), 1,72 (dd, *J* = 12,6, 3,7 Hz, 1H), 1,66 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,95, 152,11, 141,57, 136,18, 135,24, 127,98, 126,79, 119,08, 116,12, 72,42, 68,87, 62,95, 51,67, 30,39, 28,44, 24,09, 22,36 ppm; C₁₇H₁₈N₄O₂S (MW 342,4), LCMS (EI) *m/e* 343 (M⁺ + H).

Para el (2*S*,5*S*)-isómero: ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 8,93 (s, 1H), 7,80 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 5,00 (dq, *J* = 9,4, 4,7 Hz, 1H), 4,43 (dd, *J* = 11,8, 9,3 Hz, 1H), 4,26 (dd, *J* = 8,6, 3,7 Hz, 1H), 4,16 (s, 1H), 4,03 – 3,89 (m, 1H), 3,17 (dd, *J* = 17,1, 8,6 Hz, 1H), 2,87 (dd, *J* = 17,2, 5,4 Hz, 1H), 2,57 (dtd, *J* = 14,8, 10,8, 4,2 Hz, 1H), 2,20 – 1,99 (m, 2H), 1,88-1,82 (m, 1H), 1,73 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 158,04, 152,88, 142,12, 136,81, 136,46, 127,44, 127,14, 119,04, 116,97, 70,00, 64,83, 64,03, 54,55, 28,06, 25,73, 22,46, 21,94 ppm; C₁₇H₁₈N₄O₂S (MW 342,4), LCMS (EI) *m/e* 343 (M⁺ + H).

Ejemplo A: Ensayo de cinasa JAK *in vitro*

Los compuestos que se describen en la presente se analizaron para determinar la actividad inhibidora de los objetivos JAK de acuerdo con el siguiente ensayo *in vitro* en Park et al., *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 94-104. Los dominios

catalíticos de JAK1 (a.a. 837-1142), JAK2 (a.a. 828-1132) y JAK3 (a.a. 781-1124) se expresaron mediante el uso de baculovirus en células de insectos y se purificaron. La actividad catalítica de JAK1, JAK2 o JAK3 se analizó mediante la medición de la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado se detectó mediante fluorescencia con resolución temporal homogénea (HTRF, por sus siglas en inglés). Se midió la IC_{50} de los compuestos para cada cinasa en las reacciones de 40 μ L que contenían la enzima, ATP y péptido 500 nM en solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.8) con NaCl 100 mM, DTT 5 mM y BSA 0.1 mg/mL (0.01 %). Para las mediciones de IC_{50} de 1 mM, la concentración de ATP en las reacciones fue de 1 mM. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se detuvieron con 20 μ L de EDTA 45 mM, SA-APC 300 nM, Eu-Py20 6 nM en solución amortiguadora de ensayo (Perkin Elmer, Boston, MA). La unión al anticuerpo etiquetado con Europium se llevó a cabo durante 40 minutos y la señal HTRF se midió en un lector de placa PHERAstar (BMG, Cary, NC). El compuesto de fórmula la se evaluó en el ensayo del ejemplo A en 1 mM ATP y se descubrió que tenía una IC_{50} en JAK1 de ≤ 100 nM y una IC_{50} en JAK2 de ≤ 1000 nM con una proporción JAK2/JAK1 de > 10 .

Ejemplo B: Ensayos celulares

Se pueden colocar en placas líneas celulares de cáncer dependientes de citocinas y por lo tanto la transducción de señales JAK/STAT, para el crecimiento, a 6000 células por pocillo (formato de placa de 96 pocillos) en RPMI 1640, FBS al 10% y 1 nG/mL de una citocina adecuada. Los compuestos pueden agregarse a las células en DMSO/medios (concentración final 0,2% de DMSO) e incubarse durante 72 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Se evalúa el efecto del compuesto sobre la viabilidad celular utilizando el ensayo "CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay" (Promega) seguido de cuantificación TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Se miden los potenciales efectos inespecíficos de los compuestos en paralelo utilizando una línea celular no dirigida por JAK con la misma lectura de ensayo. Típicamente, todos los experimentos se realizan por duplicado.

Las líneas celulares anteriores también se pueden utilizar para analizar los efectos de los compuestos sobre la fosforilación de las cinasas JAK o los posibles sustratos descendentes como las proteínas STAT, Akt, Shp2 o Erk. Estos experimentos se pueden realizar después de una inanición de citocinas durante la noche, seguida de una preincubación breve con el compuesto (2 horas o menos) y estimulación con citocinas de aproximadamente 1 hora o menos. Se extraen las proteínas de las células y se analizan mediante técnicas conocidas por los entendidos en la técnica incluido análisis de transferencia Western o ELISA utilizando anticuerpos que pueden diferenciar entre la proteína fosforilada y la

proteína total. Estos experimentos pueden utilizar células normales o de cáncer para investigar la actividad de los compuestos sobre la biología de la supervivencia de las células tumorales o sobre los mediadores de la enfermedad inflamatoria. Por ejemplo, con respecto a estos últimos, se pueden utilizar las citocinas como IL-6, IL-12, IL-23 o IFN para estimular la activación de JAK que produce la fosforilación de las proteínas STAT y potencialmente perfiles transcripcionales (evaluados por matriz o tecnología de qPCR) o producción y/o secreción de proteínas, como IL-17. La capacidad de los compuestos de inhibir estos efectos mediados por citocinas se puede medir utilizando técnicas comunes para los entendidos en la técnica. Para evaluar los efectos del compuesto sobre JAK2, se pueden estimular células primarias o líneas celulares con factores de crecimiento dependientes de JAK2 tales como GM-CSF o Tpo, proteínas extraídas de células y analizadas a través de técnicas familiares para los expertos en la técnica que incluyen transferencia Western o ELISA que utilizan anticuerpos que pueden diferenciar entre proteína fosforilada y total.

Los compuestos del presente también se pueden probar en modelos celulares diseñados para evaluar su potencia y actividad contra las JAK mutantes, por ejemplo, la mutación JAK2V617F hallada en los trastornos proliferativos mieloides. Estos experimentos a menudo utilizan células dependientes de citocina de linaje hematológico (por ejemplo, BaF/3) en las cuales las cinasas JAK naturales o mutantes se expresa ectópicamente (James, C., et al. *Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., et al. *JBC* 280:41893-41899). Los criterios de valoración incluyen los efectos de los compuestos sobre la supervivencia celular, la proliferación y las proteínas JAK, STAT, Akt o Erk fosforiladas.

Determinados compuestos del presente se pueden evaluar en cuanto a su actividad inhibitoria de la proliferación de células T. Este ensayo se puede considerar un segundo ensayo de proliferación impulsado por citocina (es decir, JAK) y también un ensayo simplista de supresión inmune o inhibición de la activación inmune. A continuación se describe brevemente cómo se pueden realizar dichos experimentos. Se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre completa humana utilizando el método de separación Ficoll Hypaque y se pueden obtener células T (fracción 2000) de PBMC mediante elutriación. Las células T humanas aisladas en el momento pueden mantenerse en el medio de cultivo (RPMI 1640 complementado 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 durante hasta 2 días. Para el análisis de proliferación celular estimulado por IL-2, las células T primero se tratan con Fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) a una concentración de 10 µg/mL durante 72 horas. Después de lavar una vez con PBS,

se colocan en placas 6000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se tratan con los compuestos a diferentes concentraciones 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 72h y se evalúa el índice de proliferación utilizando reactivos CellTiter-Glo Luminescent siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Promega; Madison, WI).

Ejemplo C: Eficacia antitumoral *in vivo*

Los compuestos de la presente pueden evaluarse en modelos de xenoinjerto de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos. Por ejemplo, una variante tumorigénica de la línea celular de plasmacitoma INA-6 puede usarse para inocular ratones SCID por vía subcutánea (Burger, R., et al. *Hematol J.* 2:42-53, 2001). Los animales que tienen tumores pueden luego aleatorizarse en grupos de tratamiento por fármaco o vehículo y se pueden administrar diferentes dosis de compuestos en cualquier cantidad de las vías usuales que incluyen la oral, i.p. o infusión continua usando bombas implantables. El crecimiento del tumor es controlado a lo largo del tiempo usando calibradores. Asimismo, las muestras tumorales pueden cultivarse en cualquier momento tras el inicio del tratamiento para analizar tal como se describe anteriormente (Ejemplo B) para evaluar los efectos del compuesto sobre las vías de señalización descendientes y actividad JAK. Además, la selectividad del compuesto o compuestos puede evaluarse usando modelos tumorales de xenoinjerto impulsados por otras cinasas conocidas (por ej. Bcr-Abl) tal como el modelo tumoral K562.

Ejemplo D: prueba de respuesta de hipersensibilidad retrasada de contacto con la piel murina

Los compuestos del presente también se pueden evaluar en cuanto a sus eficacias (de inhibición de las dianas de JAK) en el modelo de prueba de hipersensibilidad retrasada murina dirigida por células T. La respuesta de hipersensibilidad de contacto retardada (DTH) en piel murina es considerada un modelo válido de dermatitis de contacto clínico, y de otros trastornos inmunitarios de la piel mediados por células T, tal como la psoriasis (*Immunol Today.* 1998 enero; 19(1):37-44). La DTH murina comparte múltiples características con la psoriasis, que incluyen el infiltrado inmune, el consiguiente aumento de citocinas inflamatorias y la hiperproliferación de queratinocitos. Además, muchas clases de agentes que son eficaces para tratar la psoriasis en la clínica también son inhibidoras eficaces de la respuesta DTH en ratones (*Agents Actions.* 1993 Jan;38(1-2):116-21).

En el día 0 y 1, se sensibilizan ratones Balb/c con una aplicación tópica en el abdomen rasurado del antígeno 2,4,dinitro-fluorobenceno (DNFB). En el día 5, se mide el espesor de sus orejas utilizando un micrómetro de ingeniería. Esta medida

se registra y se utiliza como referencia. Luego se prueba en ambas orejas de los animales una aplicación tópica de DNFB en un total de 20 μL (10 μL en el pabellón auricular interno y 10 μL en el pabellón auricular externo) a una concentración de 0.2%. Se vuelven a medir las orejas pasadas veinticuatro a setenta y dos horas de la prueba. El tratamiento con los compuestos de prueba se da durante la totalidad de las fases de sensibilización y provocación (día -1 a día 7) o antes y durante la fase de provocación (generalmente en la tarde del día 4 al día 7). El tratamiento de los compuestos de prueba (en una concentración diferente) se administra sistémicamente o tópicamente (aplicación tópica del tratamiento sobre las orejas). Las eficacias de los compuestos de prueba se indican mediante una reducción en la hinchazón de las orejas en comparación con la situación sin el tratamiento. Los compuestos que causan una reducción del 20 % o más se consideraron eficaces. En algunos experimentos, los ratones se exponen pero no se sensibilizan (control negativo).

El efecto inhibitor (activación inhibidora de las vías JAK-STAT) de los compuestos de prueba pueden confirmarse por análisis inmunohistoquímico. La activación de las vías de JAK-STAT resulta en la formación y translocación de factores de transcripción funcionales. Además, el influjo de células inmunitarias y la proliferación aumentada de queratinocitos debería también proporcionar cambios únicos en el perfil de expresión en la oreja que pueden ser investigados y cuantificados. Las secciones de la oreja fijadas en formalina e incrustadas en parafina (cultivadas luego de la fase de exposición en el modelo DTH) se someten a análisis inmunohistoquímico mediante el uso de un anticuerpo que interactúa específicamente con STAT3 fosforilado (clon 58E12, *Cell Signaling Technologies*). Las orejas del ratón se tratan con compuestos de prueba, vehículo o dexametasona (un tratamiento clínicamente eficaz para la psoriasis), o sin ningún tratamiento, en el modelo DTH a efectos comparativos. Los compuestos de prueba y la dexametasona pueden producir cambios transcripcionales similares tanto cualitativa como cuantitativamente, y tanto los compuestos de prueba como la dexametasona pueden reducir la cantidad de células infiltrantes. La administración tanto sistémica como tópica de los compuestos de prueba puede producir efectos inhibitorios, es decir, reducir la cantidad de células infiltrantes e inhibir los cambios transcripcionales.

Ejemplo E: Actividad antiinflamatoria *in vivo*

Los compuestos del presente se pueden evaluar en modelos de roedores o no roedores diseñados para imitar una respuesta inflamatoria simple o compleja. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos de roedores de artritis para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos dosificados de manera preventiva o terapéuticamente. Estos modelos incluyen de modo no taxativo artritis inducida por

colágeno de ratón o rata, artritis inducida por adyuvante de rata y artritis inducida por anticuerpo de colágeno. Las enfermedades autoinmunitarias que incluyen, de modo no taxativo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I, uveoretinitis, tiroiditis, miastenia gravis, nefropatías por inmunoglobulina, miocarditis, sensibilidad de las vías respiratorias (asma), lupus o colitis pueden también usarse para evaluar el potencial terapéutico de compuestos en la presente. Estos modelos están bien establecidos en la comunidad de investigación y son conocidos para los expertos en la técnica (*Current Protocols in Immunology*, Vol 3., Coligan, J.E. et al, Wiley Press.; *Methods in Molecular Biology*: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. y Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

Ejemplo F: modelos animales para el tratamiento de ojo seco, uveítis y conjuntivitis

Se pueden evaluar agentes en uno o más modelos preclínicos de ojo seco conocidos para los expertos en la técnica incluidos, a modo no taxativo, modelo de glándula lagrimal de concanavalina A (ConA) de conejo, el modelo de ratón de escopolamina (subcutáneo o transdérmico), el modelo de glándula lagrimal de ratón de toxina botulínica o cualquier otro de una variedad de modelos autoinmunitarios de roedores espontáneos que resultan en disfunción de la glándula ocular (por ejemplo, NOD-SCID, MRL/lpr o NZB/NZW) (Barabino et al., *Experimental Eye Research* 2004, 79, 613-621 y Schrader et al., *Developmental Ophthalmology*, Karger 2008, 41, 298-312, incorporándose cada una a la presente por referencia en su totalidad). Los criterios de valoración de estos modelos pueden incluir la histopatología de las glándulas oculares y ojo (córnea, etc.) y posiblemente la prueba clásica de Schirmer o versiones modificadas de esta (Barabino et al.) que calculan la producción de lágrimas. La actividad puede evaluarse mediante la dosificación por múltiples vías de administración (por ej. sistémica o tópica) que pueden comenzar antes o después de que exista una enfermedad cuantificable.

Los agentes pueden evaluarse en uno o más modelos preclínicos de uveítis conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen, a modo no taxativo, modelos de uveítis autoinmunitaria experimental (EAU, por sus siglas en inglés) y uveítis inducida por exotoxina (EIU, por sus siglas en inglés). Los experimentos de EAU pueden realizarse en conejos, ratas o ratones y pueden implicar la inmunización activa o pasiva. Por ejemplo, se puede usar cualquier cantidad de antígenos retinianos para sensibilizar animales a un inmunógeno pertinente tras lo cual los animales pueden exponerse de manera ocular al mismo antígeno. El modelo de EIU es más preciso e implica la administración local o sistémica de lipopolisacárido en dosis subletales. Los criterios de valoración para ambos modelos EIU y EAU pueden incluir el examen fundoscópico, histopatología entre

otros. Estos modelos pueden ser analizados en Smith et al. (*Immunology and Cell Biology* 1998, 76, 497-512, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia). La actividad se evalúa mediante la dosificación por múltiples vías de administración (por ej. sistémica o tópica) que pueden comenzar antes o después de que exista una enfermedad cuantificable. Algunos modelos enumerados anteriormente pueden también desarrollar escleritis/episcleritis, coroiditis, ciclitis o iritis y por ende son útiles para investigar la actividad potencial de compuestos para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades.

Los agentes también pueden evaluarse en uno o más modelos preclínicos de conjuntivitis conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen, a modo no taxativo, modelos de roedores que utilizan cobayos, ratas o ratones. Los modelos de cobayos incluyen aquellos que utilizan inmunización activa o pasiva y/o protocolos de exposición inmunitaria tal como con ovoalbúmina o artemisa (descritos en Groneberg, D.A., et al., *Allergy* 2003, 58, 1101-1113, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad). Los modelos de rata y ratón son similares en el diseño general a los de cobayos (también descritos por Groneberg). La actividad puede evaluarse mediante dosificación a través de múltiples vías de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que pueden comenzar antes o después de que la enfermedad medible exista. Los criterios de valoración para dichos estudios pueden incluir, por ejemplo, análisis histológico, inmunológico, bioquímico o molecular de tejidos oculares tales como la conjuntiva.

Ejemplo G: Protección ósea *in vivo*

Los compuestos pueden evaluarse en varios modelos preclínicos de osteopenia, osteoporosis o resorción ósea conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar roedores ovariectomizados para evaluar la capacidad de los compuestos para afectar signos y marcadores de remodelación y/o densidad ósea (W.S.S. Jee y W. Yao, *J Musculoskel. Nueron. Interact.*, 2001, 1(3), 193-207, que se incorporan en su totalidad a la presente mediante esta referencia). De manera alternativa, la arquitectura y densidad ósea pueden evaluarse en roedores de control o tratados con compuesto en modelos de osteopenia inducida por terapia (por ej. glucocorticoides) (Yao, et al. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; and *id.* 58(11), 1674-1686, ambos de los cuales se incorporan en su totalidad a la presente mediante esta referencia). Además, los efectos de los compuestos sobre la resorción y densidad ósea pueden ser evaluables en modelos de roedores de artritis tratados anteriormente (Ejemplo E). Los criterios de valoración para todos estos modelos pueden variar pero a menudo incluyen valoraciones histológicas y radiológicas, así como inmunohistología y marcadores bioquímicos apropiados de remodelación ósea.

Ejemplo H: modelo de ratón transgénico S100A9

Anteriormente se mostró que los ratones transgénicos *S100A9* presentan acumulación de médula ósea de MDSC acompañada del desarrollo de citopenias multilineales progresivas y displasia citológica similar a MDS. Además, la maduración forzada temprana de MDSC a través de tratamiento de ácido *all-trans*-retinoico o interrupción de proteína adaptadora (DAP12) con motivo de activación (con ITAM) basada en inmunorreceptor de tirosina activa de señalización CD33 rescató el fenotipo hematológico y mitigó la enfermedad. Este sistema puede ser útil para evaluar los efectos sobre la inhibición de JAK1 en enfermedades similares a MDS en un modelo preclínico. *J. Clin. Invest.*, 123(11):4595-4611 (2013). Por consiguiente, un inhibidor selectivo de JAK1 es dosificado a través de sonda oral. La capacidad del compuesto de reducir las citopenias y displasia citológica observada en los ratones transgénicos *S100A9* es monitorizada.

Diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede. Dichas modificaciones también pretenden estar comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Número de serie estadounidense 14/068.796, presentado el 31 de octubre de 2013, incorporado a la presente en su totalidad mediante referencia. Todas las referencias, incluidas todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en la presente solicitud se incorporan a este documento mediante referencia en su totalidad.