

COMPUESTOS DE PIRIMIDINA COMO INHIBIDORES DE LA QUINASA JAK

Campo de la invención

La invención se dirige a compuestos de pirimidina útiles como inhibidores de la quinasa JAK. La invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, métodos para usar dichos compuestos para tratar enfermedades inflamatorias, y procesos e intermediarios que son útiles para preparar dichos compuestos.

Estado del Arte

La colitis ulcerativa es una enfermedad inflamatoria crónica del colon. La enfermedad se caracteriza por inflamación y ulceración de la capa mucosa del recto y del intestino delgado. Los síntomas comunes incluyen diarrea, heces con sangre y dolor abdominal. El curso clínico es intermitente, marcado por periodos alternantes de exacerbación y remisión. La incidencia parece ser mayor en los países desarrollados que en los países en desarrollo. Un estimado de 1,2 millones de personas en los principales países industrializados sufre de colitis ulcerativa y se espera que los números se incrementen junto con el crecimiento de la población. Los pacientes con colitis ulcerativa tienen un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal (por ejemplo Danese y col. *N Engl J Med*, **2011**, 365, 1713-1725).

A pesar de que existen una variedad de opciones terapéuticas para promover y mantener la remisión de la colitis ulcerativa (UC) en los pacientes, ninguna es ideal. Los tratamientos relacionados con la sulfasalazina con frecuencia son eficaces en la UC leve, pero mucho menos en la enfermedad moderada a severa. Con frecuencia se usan corticosteroides para proveer una inducción rápida de la remisión en los pacientes con UC moderada a severa.

Sin embargo, no se aconseja el uso crónico de esteroides para mantener la remisión debido a su asociación con efectos adversos a largo plazo (por ejemplo, osteoporosis y fracturas, infecciones, cataratas, curado de heridas lento y supresión de producción de hormonas de la glándula adrenal). Los inmunosupresores sistémicos tales como la azatioprina, ciclosporina y metotrexato tienen un inicio lento y una eficacia modesta en los pacientes con UC moderada a severa, pero su uso prolongado puede ser problemático debido a las consecuencias de la inmunosupresión a largo plazo (por ejemplo, riesgo incrementado de infecciones y linfoma). Los anticuerpos anti-TNF α (por ejemplo, infliximab y adalimumab), a pesar de ser caros y requerir administración subcutánea o intravenosa, son eficaces en aproximadamente entre 60 y 70 % de los pacientes con UC con enfermedad moderada a severa. Sin embargo, hasta un tercio de los pacientes fallan a la hora de mostrar una respuesta adecuada, mientras que otro tercio de los inicialmente sensibles desarrollan tolerancia a lo largo de unas pocas semanas (Allez y col., *J Crohn's Colitis*, **2010**, 4, 355-366; Rutgeerts y col., *N Engl J Med*, **2005**, 353, 2462-2476). La terapia más recientemente aprobada contra la UC, el vedolizumab, un anticuerpo anti-integrina $\alpha_4\beta_7$, es eficaz en los pacientes con UC moderada a severa a pesar de que su ruta parenteral es subóptima, y las consecuencias de la inmunosupresión a largo plazo a través de este mecanismo aún deben ser determinadas. A pesar de las opciones terapéuticas existentes, aproximadamente entre el 10 y el 20 % de los pacientes con UC aún requieren colectomía dentro de los 10 años del diagnóstico (Targownik y col., *Am J Gastroenterol*, **2012**, 107, 1228-1235). Es claro que aún existe una necesidad médica no resuelta por una terapia eficaz para promover y mantener la

remisión de la UC moderada a severa sin los problemas de seguridad que resultan de la inmunosupresión crónica y sistémica.

Si bien el mecanismo subyacente de la colitis ulcerativa no está completamente comprendido, se cree que los factores ambientales producen en los individuos genéticamente susceptibles una reacción inapropiada (excesiva) por parte del sistema inmunológico contra la microbiota del intestino, lo que resulta en una inflamación del colon, daño del tejido, y los síntomas asociados característicos de la enfermedad.

A pesar de que la patogénesis precisa de la UC no está clara, es evidente que las citoquinas proinflamatorias tienen un rol importante en la respuesta inmunológica (Strober y col., *Gastroenterol*, **2011**, 140, 1756-1767). Muchas de las citoquinas proinflamatorias más comúnmente elevadas en la UC (por ejemplo, IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, IL-23, IL-24, IFN γ y leptina), se basan en la familia de las tirosina quinasas JAK (es decir, JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) para su transducción de señal. La unión de una citoquina a un receptor de citoquina dependiente de JAK induce la dimerización del receptor, con lo que se produce la fosforilación de los residuos de tirosina en la quinasa JAK y ésta se activa. A su vez, las JAK fosforiladas, se unen a diversas proteínas STAT y las fosforilan, con lo cual éstas se dimerizan, ingresan en el núcleo celular y modulan directamente la transcripción génica, lo que induce los efectos ulteriores asociados a la enfermedad inflamatoria, entre otros. Las JAK generalmente se asocian a receptores de citoquinas en pares, como homodímeros o heterodímeros. Las citoquinas específicas están asociadas a apareamientos específicos de JAK.

La dermatitis atópica (AD) es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que se estima afecta 14 millones de personas sólo en los Estados Unidos. Se estima que la AD afecta entre 10 y 20 % de los niños y entre 1 y 3 % de los adultos en los países desarrollados (Bao et al., *JAK-STAT*, **2013**, 2, e24137) y la prevalencia está en aumento. Se ha asociado la AD con la elevación de citoquinas proinflamatorias en la vía JAK-STAT, en particular, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN γ , y TSLP (Bao et al., Leung et al., *The Journal de Clinical Investigation*, **2004**, 113, 651-657). Además, se ha mostrado que la regulación ascendente de IL-31, otra citoquina que señala a través de apareamiento JAK, cumple un papel en el prurito asociado con el estado crónico de la AD (Sunkoly et al., *Journal de Allergy y Clinical Immunology*, **2006**, 117, 411-417).

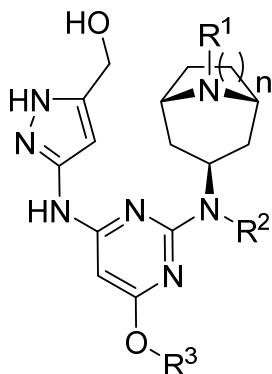
La inhibición de la familia de enzimas JAK podría inhibir la señalización de muchas citoquinas proinflamatorias clave. Por lo tanto, los inhibidores de JAK probablemente sean útiles para el tratamiento de la colitis ulcerativa y otras enfermedades inflamatorias gastrointestinales tales como la enfermedad de Crohn y colitis inducida por inhibidor de punto de control inmune, dermatitis atópica, y otras enfermedades inflamatorias de la piel, rinitis alérgica, asma, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Sin embargo, debido al efecto modulador de la vía de JAK/STAT sobre el sistema inmunológico, la exposición sistema a los inhibidores de JAK podría tener un efecto inmunosupresor sistémico adverso. Por lo tanto, sería deseable proveer nuevos inhibidores de JAK que tengan su efecto en el sitio de acción sin efectos sistémicos significativos. En particular, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales, tales como la colitis ulcerativa, sería deseable proveer nuevos inhibidores de JAK que se puedan administrar por vía oral y

que consigan una exposición terapéuticamente relevante en el tracto gastrointestinal con una mínima exposición sistémica.. También sería conveniente proveer nuevos inhibidores de JAK para el tratamiento de la dermatitis atópica, que se puedan administrar tópicamente con una exposición sistémica mínima.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención provee nuevos compuestos que tienen actividad como inhibidores de la quinasa JAK.

En consecuencia, la invención provee un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde

R¹ se selecciona entre:

(a) -S(O)₂R⁴, donde R⁴ se selecciona entre:

C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con -CN,

-OC₁₋₃alquilo, o C₃₋₆cicloalquilo,

heterociclilo que contienen entre 4 y 6 átomos del anillo que incluye un átomo de nitrógeno,

donde cualquier heterociclilo se sustituye opcionalmente con –

CN,

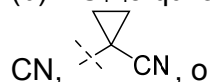
C₃₋₆cicloalquilo,

piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con fluoro,

y

fenilo;

(b) C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con –



piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con –CN;

y

(c) –C(O)R⁵, donde R⁵ se selecciona entre:

C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con

C₃₋₆cicloalquilo,

o con uno o dos fluoro,

–OC₁₋₄alquilo,

C₃₋₆cicloalquilo, y

morfolinilo;

R² es hidrógeno o metilo;

R³ es C₁₋₃alquilo; y

n es 1 o 2;

o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

Como se usa a partir de aquí, la expresión “compuesto de fórmula (I)” designa un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; es decir, esta frase designa un compuesto de fórmula (I) en forma

de base libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable a menos que se indique otra cosa.

La invención también provee una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención provee a particular compuesto de fórmula (I) en forma de base libre cristalina. 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo cristalino tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 235 °C y aproximadamente 245 °C, típicamente entre aproximadamente 237 °C y aproximadamente 242 °C, y exhibe cambios de peso de menos de aproximadamente 0,4 % cuando se expone a un rango de humedad relativa de entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 90 % a temperatura ambiente.

La invención también provee un método para tratar una enfermedad inflamatoria gastrointestinal, en particular una colitis ulcerativa, en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero un compuesto o una composición farmacéutica de la invención.

En aun otro aspecto, la invención también provee un método para tratar enfermedades inflamatorias o afecciones de la piel, en particular dermatitis atópica, en un mamífero, comprendiendo el método aplicar un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención a la piel de un animal.

En aspectos separados y distintos, la invención también provee intermediarios y procesos sintéticos que se describen en la presente, que son útiles para preparar los compuestos de la invención.

La invención también provee un compuesto de la invención tal como se describe aquí para uso en terapia médica, así como también el uso de un compuesto de la invención para elaborar una formulación o medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria gastrointestinal en un mamífero. La invención además provee el uso de un compuesto de la invención para elaborar una formulación o medicamento para tratar enfermedades inflamatorias de la piel.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Los diversos aspectos de la presente invención se ilustran en referencia a las figuras acompañantes.

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) de la forma cristalina I de 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo [de aquí en adelante la Forma I].

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

La Figura 3 muestra un gráfico de análisis de gravimetría térmica (TGA) de la forma cristalina I.

La Figura 4 muestra una isoterma de sorción dinámica de humedad (DMS) de la forma cristalina I observada a una temperatura de aproximadamente 25°C

La Figura 5 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) la forma cristalina II de 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo [de aquí en adelante la Forma II].

La Figura 6 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la forma cristalina II.

La Figura 7 muestra un gráfico de análisis de gravimetría térmica (TGA) de la forma cristalina II.

La Figura 8 muestra una isoterma de sorción dinámica de humedad (DMS de la forma cristalina II observada a una temperatura de aproximadamente 25 °C

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Entre otros aspectos, la invención provee inhibidores de quinasa JAK de fórmula (I), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, e intermediarios para la preparación de los mismos. Los siguientes sustituyentes y valores tienen la intención de proveer ejemplos representativos de los diversos aspectos de esta invención. Estos valores representativos están para definir en forma adicional dichos aspectos y no excluyen a otros valores ni limitan el alcance de la invención.

En un aspecto de la invención, R^1 se selecciona entre (a) $-S(O)_2R^4$, donde R^4 se selecciona entre C_{1-4} alquilo, donde C_{1-4} alquilo se sustituye opcionalmente con $-CN$, $-OC_{1-3}$ alquilo, o C_{3-6} cicloalquilo; heterociclilo que contiene entre 4 y 6 átomos del anillo que incluye un átomo de nitrógeno, donde cualquier heterociclilo se sustituye opcionalmente con $-CN$; C_{3-6} cicloalquilo; piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con fluoro; y

fenilo; (b) C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con –CN,  , o piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con –CN; y (c) C(O)R⁵, donde R⁵ se selecciona entre C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con C₃₋₆cicloalquilo, o con uno o dos fluoro; –OC₁₋₄alquilo; C₃₋₆cicloalquilo; y morfolinilo.

En otro aspecto R¹ es –S(O)₂R⁴, donde R⁴ se selecciona entre C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con –CN, –OC₁₋₃alquilo, o C₃₋₆cicloalquilo; heterociclilo que contiene entre 4 y 6 átomos del anillo que incluye un átomo de nitrógeno donde cualquier heterociclilo se sustituye opcionalmente con –CN; C₃₋₆cicloalquilo; piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con fluoro; y fenilo.

En aun otro aspecto, R¹ es –S(O)₂R⁴, donde R⁴ se selecciona entre C₁₋₂alquilo, donde C₁₋₂alquilo se sustituye opcionalmente con –CN, –OCH₃, o ciclopropilo; azetidinilo, donde azetidinilo se sustituye opcionalmente con –CN; pirrolidinilo; ciclopropilo; piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con fluoro; y fenilo.

En aun otro aspecto, R¹ es –S(O)₂R⁴, donde R⁴ es metilo, etilo, azetidinilo, pirrolidinilo, ciclopropilo, piridinilo, o fenilo, donde etilo se sustituye opcionalmente con metoxi, azetidinilo se sustituye opcionalmente con –CN, y piridinilo se sustituye opcionalmente con fluoro.

En un aspecto, R¹ es C₁₋₄alquilo, donde C₁₋₄alquilo se sustituye opcionalmente con

–CN, , o piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con –CN.

En otro aspecto, R^1 es C_{1-2} alquilo, donde C_{1-2} alquilo se sustituye opcionalmente con $-CN$, , o piridinilo, donde piridinilo se sustituye opcionalmente con $-CN$.

En un aspecto, R^1 es $-C(O)R^5$, donde R^5 se selecciona entre C_{1-4} alquilo, donde C_{1-4} alquilo se sustituye opcionalmente con C_{3-6} cicloalquilo, o con uno o dos fluoro; $-OC_{1-4}$ alquilo; C_{3-6} cicloalquilo; y morfolinilo.

En otro aspecto, R^1 es $-C(O)R^5$, donde R^5 se selecciona entre C_{1-2} alquilo, donde C_{1-2} alquilo se sustituye opcionalmente con ciclopropilo, o con uno o dos fluoro; $-OC_{1-4}$ alquilo; C_{3-6} cicloalquilo; y morfolinilo.

En aun otro aspecto, R^1 es $-C(O)R^5$, donde R^5 es $-CHF_2$, $-CH_2$ -ciclopropilo, $-OCH_3$, $-O$ -isobutilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o morfolinilo.

En un aspecto R^2 es hidrógeno o metilo. En un aspecto específico R^2 es metilo.

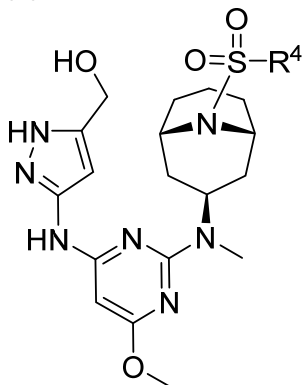
En un aspecto, R^3 es C_{1-3} alquilo.

En otro aspecto, R^3 es metilo.

En un aspecto, n es 1 o 2. En otro aspecto, n es 2.

En un determinado aspecto, la invención provee compuestos de fórmula

(II):



(II)

donde la variable R⁴ es como se define aquí.

En un aspecto, la invención provee los compuestos de los Ejemplos 1-9 y de las siguientes Tablas 1-3.

En otro aspecto, la invención provee un compuesto seleccionado entre:

1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo,

1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo,

(3-((6-metoxi-2-(metil((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(metilsulfonyl)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((6-metoxi-2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-((2-metoxietil)sulfonyl)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

3-((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-il)propanonitrilo,

5-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)picolinonitrilo,

5-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)nicotinonitrilo,

(1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de isobutilo,

2,2-difluoro-1-((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-il)etan-1-ona,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(azetidin-1-ilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-((5-fluoropiridin-3-il)sulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((6-metoxi-2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(fenilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(etilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-((ciclopropilmetil)sulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((6-metoxi-2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(piridin-3-ilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

3-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-il)-sulfonil)propannitrilo,

(3-((6-metoxi-2-(metil((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(pirrolidin-1-ilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(ciclopropilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((6-metoxi-2-(metil((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(piridin-3-ilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((6-metoxi-2-(metil((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(fenilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(azetidín-1-ilsulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-((ciclopropilmetil)sulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

(3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-((5-fluoropiridin-3-il)sulfonil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

4-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)picolinonitrilo,

(3-((6-metoxi-2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(piridin-3-ilmetil)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol,

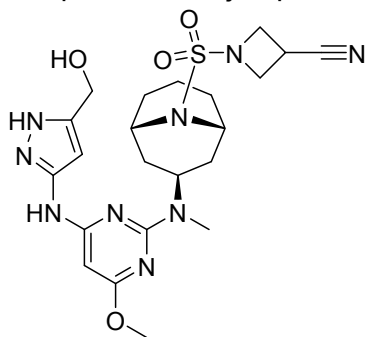
3-((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-il)propanonitrilo,

1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicciclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)ciclopropan-1-carbonitrilo,

(3-((6-metoxi-2-(metil((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(piridin-4-ilmetil)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol, 4-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)picolinonitrilo, 2,2-difluoro-1-((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)etan-1-ona, (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de isobutilo, (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de metilo, ((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)(morfolino)metanona, 2-ciclopropil-1-((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)etan-1-ona, ciclopentil((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metanona, y ciclobutil((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metanona, y sales aceptables farmacéuticamente del mismo.

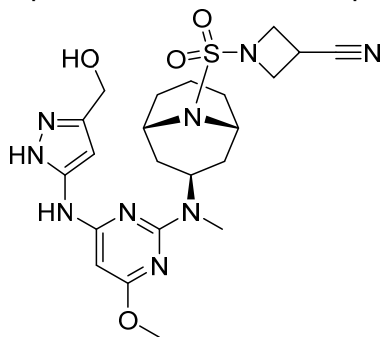
En la presente, las estructuras químicas se nombran de acuerdo con las convenciones de IUPAC según su implementación en el programa de

computación ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA). Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 2:



se designa como 1-(((1*R*,3*S*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo. La notación (1*R*,3*S*,5*S*) describe la orientación *exo* del grupo pirimidinilamino con respecto al grupo 9-azabicyclo[3,3,1]nonano y de manera similar para los compuestos que contienen un grupo 8-azabicyclo[3,2,1] (es decir, variable $n = 1$). Todos los compuestos de la invención están en la orientación *exo*.

Además, la unidad de pirazolilo de los compuestos de fórmula (I) existe en forma tautomérica. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 2 puede representarse en forma equivalente como:



De acuerdo con la convención de la IUPAC, estas representaciones dan origen a diferentes numeraciones de los átomos de la unidad de pirazolilo. La

representación anterior se designa 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((3-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-5-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo, en donde lo subrayado identifica el lugar en donde el nombre difiere del nombre de la primera de las representaciones. Ha de comprenderse que a pesar de que las estructuras se muestran, o se nombran, en una forma particular, la invención también incluye a la forma tautomérica de las mismas.

Los compuestos de la invención contienen uno o más centros quirales y por lo tanto, dichos compuestos (y los intermediarios de los mismos) pueden existir como mezclas racémicas; como estereoisómeros puros (es decir, enantiómeros o diastereoisómeros); mezclas enriquecidas en un estereoisómero y similares. Los compuestos quirales mostrados o nombrados en la presente sin una estereoquímica definida en un centro quiral incluyen a cualquiera o a todas las variaciones estereoisoméricas posibles en el estereocentro no definido, a menos que se indique otra cosa. La representación o la nomenclatura de un estereoisómero particular significa que el estereocentro indicado tiene la estereoquímica designada con la comprensión de que también pueden haber presentes cantidades menores de otros estereoisómeros, a menos que se indique otra cosa, con la condición de que no se elimine la utilidad del compuesto representado o nombrado por la presencia de otro estereoisómero.

Los compuestos de fórmula (I) también contienen varios grupos básicos (por ejemplo, grupos amino) y por lo tanto, dichos compuestos pueden existir como base libre o en diversas formas de sal, tales como una forma de sal monoprotonada, una forma de sal diprotonada, una forma de sal triprotonada, o

mezclas de las mismas. Todas las formas mencionadas están incluidas dentro del alcance de esta invención, a menos que se indique otra cosa.

Esta invención también incluye a los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I), es decir, los compuestos de fórmula (I) en donde se ha reemplazado o enriquecido un átomo con un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica que predomina en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en un compuesto de fórmula (I) incluyen, a título enunciativo no taxativo, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{35}S , y ^{18}F . Tienen un interés particular los compuestos de fórmula (I) enriquecidos en tritio o carbono-14, que son compuestos que se pueden usar, por ejemplo, en estudios de distribución tisular. También tienen un interés particular los compuestos de fórmula (I) enriquecidos en deuterio, especialmente en un sitio de acción metabólica, lo que da compuestos que se espera que tengan una mayor estabilidad metabólica. Además tienen un interés particular los compuestos de fórmula (I) enriquecidos en un isótopo que emite positrones, tal como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , lo que da compuestos que se pueden usar, por ejemplo, en estudios por Tomografía de Emisión de Positrones (PET).

Definiciones

Cuando se describe esta invención, incluyendo sus varios aspectos y formas de realización, los siguientes términos tienen los significados que se dan a continuación, a menos que se indique otra cosa.

El término "alquilo" designa a un grupo hidrocarbonado saturado monovalente que puede ser lineal o ramificado o combinaciones de los mismos. A menos que se defina de otra manera, dichos grupos alquilo

típicamente contienen entre 1 y 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, metilo (Me), etilo (Et), n-propilo (n-Pr) o (nPr), isopropilo (i-Pr) o (iPr), n-butilo (n-Bu) o (nBu), sec-butilo, isobutilo, *tert*-butilo (t-Bu) o (tBu), n-pentilo, n-hexilo, 2,2-dimetilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2-etilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2-propilpentilo, y similares.

Cuando se relaciona un número específico de átomos de carbono para un término particular, el número de átomos de carbono se muestra precediendo el término. Por ejemplo, el término "C₁₋₃ alquilo" significa un grupo alquilo que tiene entre 1 y 3 átomos de carbono en donde los átomos de carbono están en cualquier configuración químicamente aceptable, incluyendo las configuraciones lineales o ramificadas.

El término "alcoxilo" designa al grupo monovalente—O—alquilo, en donde alquilo se define como se hizo anteriormente. Los grupos alcoxilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, y similar.

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

El término "heterociclilo", "heterociclo", "heterocíclico", o "anillo heterocíclico" designa a un grupo cíclico no aromático monovalente saturado o parcialmente insaturado, que tiene entre 3 y 10 átomos de anillo totales, en

donde el anillo contiene entre 2 y 9 átomos de carbono de anillo y entre 1 y 4 heteroátomos de anillo que se seleccionan de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los grupos heterocíclicos pueden ser monocíclicos o multicíclicos (es decir, fusionados o puenteados). Los grupos heterocíclicos representativos incluyen, a modo de ejemplo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, tiomorfolilo, indolin-3-ilo, 2-imidazolinilo, tetrahidropiranilo, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-ilo, quinuclidinilo, 7-azanorbornanilo, nortropanilo, y similares, en donde el punto de unión es en cualquier átomo de anillo disponible de carbono o nitrógeno. Cuando el contexto hace evidente al punto de unión del grupo heterocíclico, dichos grupos como alternativa pueden denominarse como una especie sin valencia, es decir pirrolidina, piperidina, piperazina, imidazol, tetrahidropirano, etc.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” designa una cantidad que es suficiente para efectuar un tratamiento cuando se administra a un paciente en necesidad de tratamiento.

El término “tratamiento” como se usa en la presente designa al tratamiento de una enfermedad, trastorno, o condición médica (tal como una enfermedad inflamatoria gastrointestinal), en un paciente, tal como un mamífero (particularmente un humano) que incluye uno o más de los siguientes:

(a) prevenir la ocurrencia de la enfermedad, trastorno, o condición médica, es decir, prevenir la recurrencia de la enfermedad o condición médica o un tratamiento profiláctico de un paciente que tiene predisposición para la enfermedad o condición médica;

(b) producir una mejoría de la enfermedad, trastorno, o condición médica, es decir, eliminar o producir la regresión de la enfermedad, trastorno, o condición médica en un paciente, incluyendo contrarrestar los efectos de otros agentes terapéuticos;

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

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

El término “sal farmacéuticamente aceptable” designa a una sal que es aceptable para su administración a un paciente o un mamífero, tal como un humano (por ejemplo, sales que tiene una seguridad aceptable para mamíferos para un dado régimen de dosificación). Las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen a las sales de ácido acético, ascórbico, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, edisílico, fumárico, gentísico, glucónico, glucorónico, glutámico, hipúrico, hidrobromico, clorhídrico, isetiónico, láctico, lactobiónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, naftalenosulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, naftaleno-2,6-disulfónico, nicotínico, nítrico, orótico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y xinafoico, y similares.

El término “sal del mismo” designa a un compuesto que se forma cuando el hidrógeno de un ácido se reemplaza por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico, y similares. Por ejemplo, el catión puede ser una forma protonada de un compuesto de fórmula (I), es decir una forma en donde

uno o más grupos amino se han protonado mediante un ácido. Típicamente, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, a pesar de que esto no es requerido para las sales de los compuestos intermediarios que no están pensadas para su administración a un paciente.

El término "grupo protector de amino" designa a un grupo protector adecuado para prevenir reacciones indeseadas de un nitrógeno amínico. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, a formilo; grupos acilo, por ejemplo grupos alcanilo, tales como acetilo y trifluoroacetilo; grupos alcoxicarbonilo, tales como *tert*-butoxicarbonilo (Boc); grupos arilmetoxicarbonilo, tales como benciloxicarbonilo (Cbz) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); grupos arilmetilo, tales como bencilo (Bn), tritilo (Tr), y 1,1-di-(4'-metoxifenil)metilo; grupos sililo, tales como trimetilsililo (TMS), triisopropilsililo (TIPS), *tert*-butildimetilsililo (TBS o TBDMS), [2-(trimetilsilil)-etoxi]metilo (SEM); y y similares. Se describen numerosos grupos protectores, y su introducción y eliminación, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York

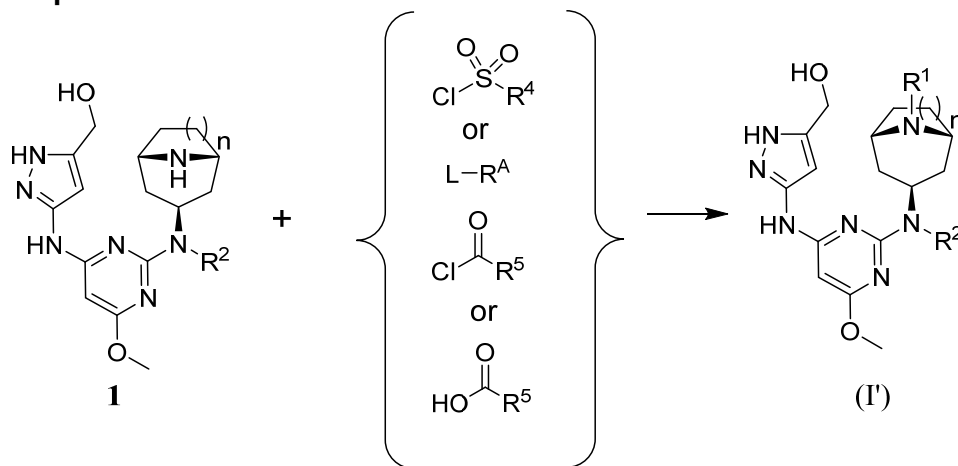
Procedimientos generales de síntesis

Los compuestos de esta invención, y los intermediarios de los mismos, se pueden preparar de acuerdo con los siguientes métodos y procedimientos generales usando materiales de partida y reactivos comercialmente disponibles o que se pueden preparar por métodos de rutina. Los sustituyentes y las variables (por ejemplo, R¹, R², R³, R⁴, etc.) que se usan en los siguientes esquemas tienen los mismos significados que se hallan en algún otro lugar de la presente, a menos que se indique otra cosa. Además, los compuestos que tienen un átomo o un grupo funcional ácido o básico se pueden usar o se

pueden producir como una sal a menos que se indique otra cosa (en algunos casos, el uso de una sal en una reacción particular requerirá la conversión de la sal a una forma de no sal, por ejemplo, una base libre, usando procedimientos de rutina antes de llevar a cabo la reacción).

A pesar de que en los siguientes procedimientos se puede mostrar o describir una forma de realización particular de la presente invención, las personas con experiencia en el arte han de reconocer que también se pueden preparar otras formas de realización o aspectos de la presente invención usando dichos procedimientos o mediante el uso de otros métodos, reactivos, y materiales de partida conocidos para las personas con experiencia en el arte. En particular, ha de apreciarse que los compuestos de la invención se pueden preparar mediante una variedad de rutas de proceso en donde se combinan los reactivos en diferentes órdenes para proveer diferentes intermediarios en la ruta para producir los productos finales.

Un método general para preparar los compuestos finales de la invención utiliza un intermediario clave **1** como se ilustra en el Esquema 1. Las variables R^1 , R^2 , R^4 , R^5 , y n se definen como en la fórmula (I), R^A representa un C₁₋₄alquilo opcionalmente sustituido, L es un grupo saliente. El esquema muestra los compuestos en los que la variable R^3 es metilo. Los compuestos en el cual R^3 es C₂₋₃alquilo se pueda preparar de manera análoga.

Esquema 1

Los compuestos de sulfonamida donde R^1 se define como $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^4$ como en la opción (a) se preparan típicamente poniendo en contacto el intermediario **1** con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1,1 equivalentes de un cloruro de sulfonilo de la forma $\text{Cl-S}(\text{O})_2\text{R}^4$ en presencia de un exceso de base a una temperatura del orden de $0\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción se realiza típicamente durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completa.

Para preparar los compuestos en los cuales R^1 es un grupo alquilo opcionalmente sustituido como se define en la opción (b), la reacción de alquilación típicamente usa un grupo saliente halo L, principalmente bromo o yodo. La reacción típicamente se lleva a cabo mediante el contacto del intermediario **1** con un exceso del reactivo L-R^A en un diluyente inerte en presencia de un exceso de base. La reacción típicamente se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60°C entre aproximadamente 10 y 24 horas o hasta que la reacción esté sustancialmente completa.

De manera alternativa, es posible usar la reacción de adición de Michael para preparar los compuestos en los que R^1 es un grupo cianoetilo. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos siguientes, para preparar un compuesto en el que R^1 es $-(CH_2)_2CN$, el intermediario **1** se pone en contacto con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1,5 equivalentes de acrilonitrilo en presencia de un exceso de base, por ejemplo diisopropiletilamina o diazobicycloundeceno. La reacción se realiza típicamente a temperatura ambiente durante entre aproximadamente 3 y aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción esté sustancialmente completa.

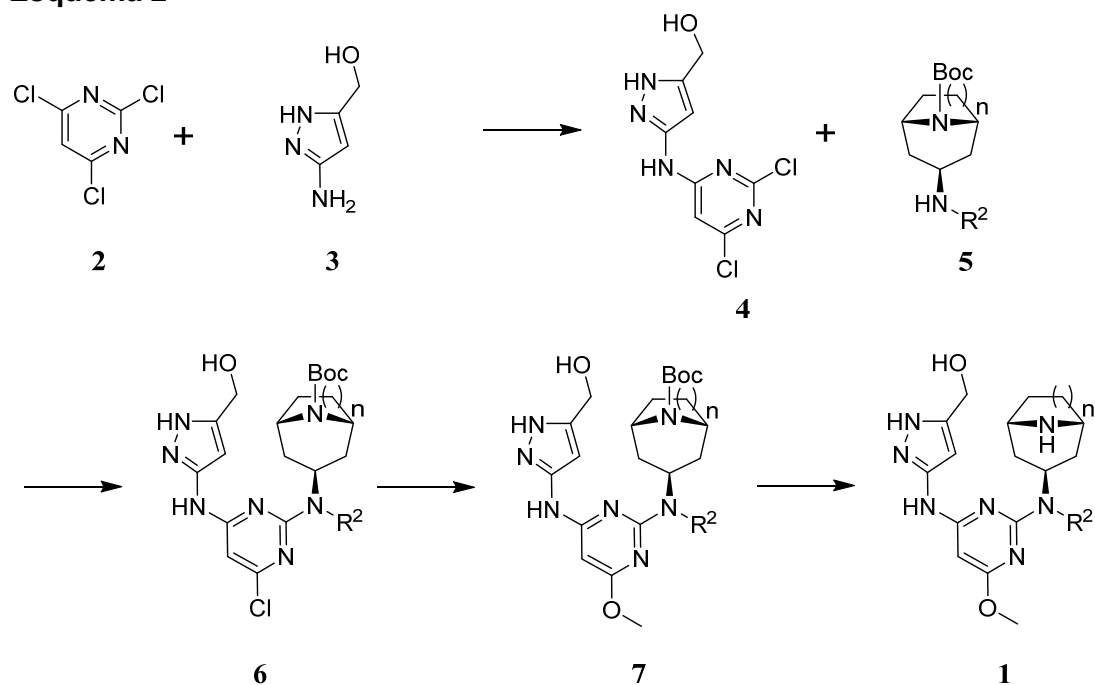
Los compuestos en los cuales R^1 se define como $-C(O)R^5$ pueden prepararse usando un cloruro de carbonilo de la forma $Cl-C(O)R^5$, específicamente un cloroformato cuando R^5 se define como $-OC_{1-4}alquilo$. Típicamente, el intermediario **1** se pone en contacto con aproximadamente un equivalente del cloruro de carbonilo en presencia de un exceso de base a una temperatura del orden de 0 °C. La reacción se realiza típicamente durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 horas o hasta que la reacción esté sustancialmente completa.

De manera alternativa, los compuestos en los cuales R^1 se define como $-C(O)R^5$ pueden prepararse poniendo en contacto el intermediario **1** con un exceso modesto de reactivo de ácido carboxílico $HO-C(O)-R^5$ bajo condiciones de acoplamiento de amida típicas. La reacción típicamente se lleva a cabo en presencia de un exceso de base usando un agente activante tal como *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio hexafluorofosfato (HATU). La reacción típicamente se lleva a cabo a temperatura ambiente entre

aproximadamente 3 y aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción esté sustancialmente completa..

En el esquema 2 se ilustra una reacción ejemplificativa de la preparación del intermediario **1** en la cual la variable R^3 es metilo.

Esquema 2

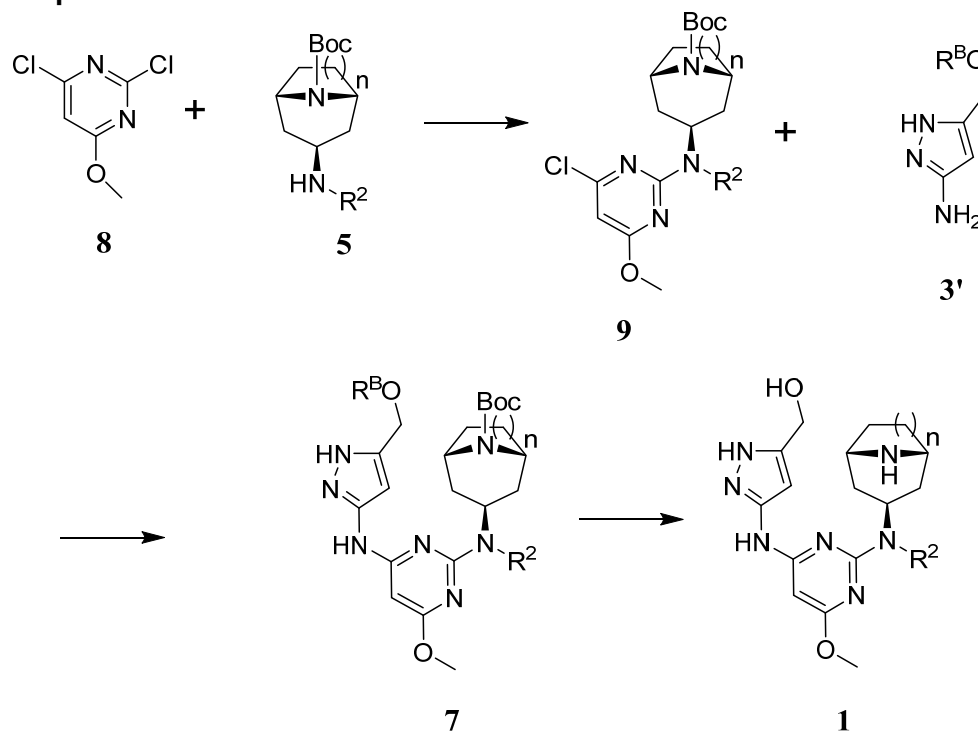


En la reacción de sustitución aromática del paso 1, la tricloropirimidina **2** se hace reaccionar con un exceso de amino-pirazol-metanol intermediario **3** en presencia de base para dar el intermediario **4**. El intermediario de amino-aza-biciclo **5** protegido con Boc se hace reaccionar entonces con el intermediario **4** para dar el intermediario **6**. Por ejemplo, el intermediario **4** se combina con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1,5 equivalentes del intermediario aza-biciclo **5** en presencia de un exceso de base, tal como diisopropiletilamina. La reacción se realiza típicamente a temperatura elevada,

entre aproximadamente 85 °C y aproximadamente 120 °C durante entre aproximadamente 6 y aproximadamente 12 horas o hasta que la reacción esté sustancialmente completa. La reacción del intermediario **6** con metóxido de sodio provee el intermediario **7**. La reacción se realiza típicamente en un tubo sellado a temperatura elevada, entre aproximadamente 85 °C y aproximadamente 120 °C, durante entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 horas o hasta que la reacción esté sustancialmente completa. En el último paso, el grupo Boc puede eliminarse mediante un tratamiento estándar con un ácido, típicamente ácido clorhídrico, para dar el intermediario **1**.

De manera alternativa, el intermediario **1** puede prepararse usando una secuencia de pasos que se muestra en el Esquema 3.

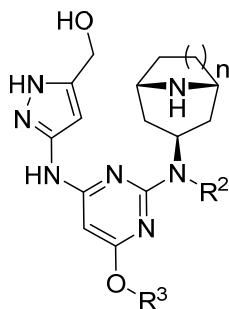
Esquema 3



donde R^B es hidrógeno o un grupo protector de sililo-oxígeno, tal como triisopropilsililo (TIPS) o *tert*-butildimetilsililo (TBS). El grupo amino-aza-bicilo **5** protegido con Boc se combina con el intermediario dicloro-metoxipirimidina **8** para formar el intermediario **9**. La reacción se realiza típicamente a temperatura elevada en presencia de base. Entonces se hace reaccionar el intermediario **9** con el intermediario amino-pirazol **3'** bajo condiciones estándares de Buchwald para dar intermediario **7**. Por ejemplo, el intermediario **9** se combina con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1,5 equivalentes del intermediario pirazol **3'** en presencia de una base tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio y un catalizador de paladio. La reacción se realiza típicamente a temperatura elevada, entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 110 °C, durante entre aproximadamente 8 y aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completa. En el paso final, el grupo protector Boc se elimina como en el Esquema 2. Cuando R^B es un grupo protector de sililo, los grupos sililo y Boc se pueden eliminar simultáneamente.

De manera acorde, en un aspecto, la invención provee un método para preparar un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el método comprende:

hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III):



(III)

con

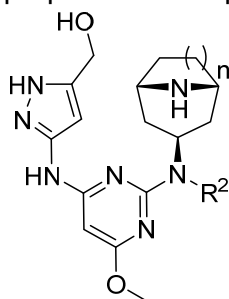
- (i) $\text{Cl-S(O)}_2\text{R}^4$,
- (ii) un compuesto de fórmula L-R^A donde L es un grupo saliente y R^A es C_{1-4} alquilo, donde C_{1-4} alquilo se sustituye opcionalmente con –

 CN , o piridinilo, donde el piridinilo se sustituye opcionalmente con – CN ;
- (iii) Cl-C(O)R^5 , o
- (iv) HO-C(O)R^5

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , y n son como se definen precedentemente, y opcionalmente forman una sal farmacéuticamente aceptable para dar un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En aspectos separados y distintos, la invención provee un compuesto de fórmula (III) donde las variables toman cualquiera de los valores descritos anteriormente y un compuesto de fórmula (III) donde R^2 y R^3 son cada uno metilo y n es 1 o 2.

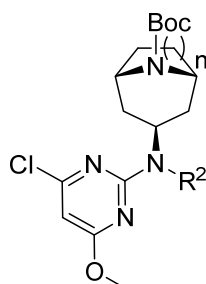
En otro aspecto del método, la invención provee un método para preparar un compuesto de fórmula 1



1

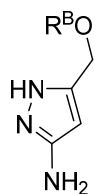
donde R^2 y n son como se definen precedentemente, comprendiendo el método:

(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula **9**:



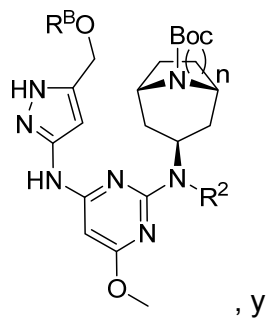
9

con un compuesto de fórmula **3**:



3'

donde R^B es hidrógeno o un grupo protector-de sililo-oxígeno para formar un compuesto de fórmula **7**:



7

(b) eliminar el grupo o los grupos protectores del compuesto de fórmula 7 para dar el compuesto de fórmula 1.

Formas cristalinas

En otro aspecto, la invención provee 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo (véase los ejemplos 2 y 10-13) en Forma I y Forma II de base libre cristalina.

En un aspecto, la Forma I de base libre cristalina se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) que tiene picos de difracción significativos, entre otros picos, a valores 2θ de $8,89\pm 0,20$, $12,99\pm 0,20$, $13,44\pm 0,20$, y $20,16\pm 0,20$. La Forma I además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluyendo tres o más, y cuatro o más picos de difracción adicionales a valores 2θ que se seleccionan entre $10,64\pm 0,20$, $10,99\pm 0,20$, $15,02\pm 0,20$, $15,74\pm 0,20$, $16,47\pm 0,20$, $20,93\pm 0,20$, $22,22\pm 0,20$, y $26,25\pm 0,20$. En otro aspecto, la Forma I se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción a valores 2θ de $8,89\pm 0,20$, $10,64\pm 0,20$, $10,99\pm 0,20$, $12,99\pm 0,20$, $13,44\pm 0,20$, $15,02\pm 0,20$, $15,74\pm 0,20$, $16,47\pm 0,20$, $20,16\pm 0,20$, $20,93\pm 0,20$, $22,22\pm 0,20$, y $26,25\pm 0,20$.

Como es bien conocido en el campo de la difracción de rayos X en polvo, las posiciones de los picos de los patrones de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como los detalles de preparación de muestra y geometría de instrumentos, en comparación con la altura relativa de los picos. De este modo, en un aspecto, la forma cristalina I se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo donde las

posiciones pico están sustancialmente de acuerdo con las que se muestran en la figura 1.

En otro aspecto, la forma cristalina I se caracteriza por su comportamiento cuando se expone a una alta temperatura. Como se demuestra en la Figura 2, la gráfica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrada a una tasa de calentamiento de 10°C por minuto exhibe un pico en el flujo de calor endotérmico, identificado como una transición de fusión, en el rango de entre aproximadamente 235 °C y aproximadamente 245 °C, incluyendo entre aproximadamente 237 °C y aproximadamente 242 °C. La curva del análisis de gravimetría térmica (TGA) de la Figura 3 muestra un comienzo de pérdida de peso que corresponde a una descomposición posterior a la fusión.

Se ha demostrado que la Forma cristalina presenta un perfil reversible de sorción/desorción con una propensión excepcionalmente pequeña a la higroscopicidad. . La Forma I mostró menos de aproximadamente 0,4 % de ganancia de peso en el rango de humedad relativa entre 5 % y 90 %. No se observó histéresis en dos ciclos de sorción y desorción. La Forma I se considera no higroscópica.

Además, la forma cristalina I ha mostrado ser estable a la micronización. No se pudieron observar diferencias entre el patrón de difracción de rayos X en polvo de material que no había sido micronizado y el patrón de material de Forma I después de la micronización.

La Forma II de base libre cristalina se caracteriza por el patrón PXRD de la figura 5 y además por su comportamiento cuando se expone a una alta temperatura. Como se demuestra en la Figura 6, la gráfica de calorimetría

diferencial de barrido (DSC) registrada a una tasa de calentamiento del 10°C por minuto exhibe un pico amplio en el flujo de calor endotérmico, en el rango de entre aproximadamente 205 °C y aproximadamente 240 °C, que junto con la curva del análisis de gravimetría térmica (TGA) de la Figura 7, puede interpretarse como una combinación de transición de fusión y descomposición.. La Forma II es un sólido ligeramente higroscópico que mostró una histéresis pequeña entre dos ciclos de sorción y desorción. La Forma II mostró aproximadamente 1,2 % de ganancia de peso en el rango de humedad de entre 5 % y 90 % de humedad relativa.

Tal como se describe en los Ejemplos 11 y 12, la Forma I puede prepararse disolviendo el compuesto en *N*-metilpirrolidona (NMP) o dimetilformamida (DMF) y agregando acetona y agua como antisolventes en una relación de aproximadamente 1:1,5 a 1:1,75 acetona:agua. La mezcla de reacción resultante se agitó durante entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 24 horas, se filtró, se lavó con una mezcla de acetona y agua, tal como una mezcla 1:1,4 de acetona y agua, y se secó para dar la forma cristalina I. En el ejemplo 13 se describe un proceso para preparar la forma cristalina II.

En otro aspecto, la invención provee un método para preparar forma cristalina I, que comprende: (a) disolver 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo en un diluyente seleccionado entre *N*-metilpirrolidona y dimetilformamida para formar una mezcla de reacción; (b) agregar acetona y agua a la mezcla de la reacción; y (c) aislar la forma cristalina I de la mezcla de la reacción.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se usan típicamente en la forma de una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un paciente por cualquier ruta de administración aceptable incluyendo, a título enunciativo no taxativo, los modos de administración oral, rectal, nasal, por inhalación, tópico (incluyendo transdérmico) y parenteral.

De manera acorde, en uno de sus aspectos composicionales, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de fórmula (I), en donde, como se definió previamente, "compuesto de fórmula (I)" designa a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Opcionalmente, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación, si se desea. Cuando se discuten las composiciones y los usos de las mismas, el "compuesto de la invención" también se puede denominar en la presente como "agente activo". Como se usa en la presente, el término "compuesto de la invención" incluye a todos los compuestos abarcados por la fórmula (I) así como también a las especies representadas por las fórmulas (II) y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Las personas con experiencia en el arte han de reconocer, sin embargo, que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, composiciones a granel, o menos de una

cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para una administración múltiple para conseguir una cantidad terapéuticamente eficaz.

Típicamente, dichas composiciones farmacéuticas contendrán entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 95% en peso del agente activo; incluyendo entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70% en peso del agente activo.

En las composiciones farmacéuticas de la invención se puede usar cualquier vehículo o excipiente convencional. La elección de un vehículo particular o excipiente, o combinaciones de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración que se esté usando para tratar a un paciente particular o del tipo de condición médica o estado de la enfermedad. Con respecto a esto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo de administración particular está bien dentro de las habilidades de las personas con experiencia en las artes farmacéuticas. Además, los vehículos o excipientes que se usan en las composiciones farmacéuticas de esta invención están comercialmente disponibles. A modo de ilustración adicional, las técnicas convencionales de formulación se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); y H.C. Ansel y col., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Los ejemplos representativos de los materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptable incluyen, a título enunciativo no taxativo, los siguientes: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa;

almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa, tal como celulosa microcristalina, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de maní, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes amortiguantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato; y otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas típicamente se preparan por mezclado o combinación exhaustiva e íntima del agente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes adicionales. La mezcla combinada uniforme resultante puede formarse o cargarse en comprimidos, cápsulas, píldoras y similares usando procedimientos y equipamientos convencionales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención preferiblemente se envasan en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada para dosificar un paciente, es decir, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de agente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea sola o en combinación con una o más unidades adicionales.

Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitarias pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras, y similares, o envases unitarios adecuados para la administración parenteral.

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para administración oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden estar en la forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas, cachets, grageas, polvos, gránulos; o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o agua-en-aceite; o como un elixir o jarabe; y similares; en donde cada uno contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo.

Cuando han de usarse para la administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, como cápsulas, comprimidos, píldoras y similares), las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente comprenderán el agente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, dichas formas de dosificación sólidas también pueden comprender: rellenos o extendedores, tales como almidones, celulosa microcristalina, lactosa, fosfato de dicalcio, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes desintegrantes, tales como croscarmelosa de sodio, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y/o carbonato de sodio; agentes retardadores de la solubilización, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio

cuaternario; agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o glicerol monoestearato; absorbentes, tales como caolina y/o arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y/o mezclas de los mismos; agentes colorantes; y agentes amortiguantes del pH..

También puede haber presentes agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Los agentes de recubrimientos para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, incluyen a aquellos que se usan para los recubrimientos entéricos, tales como celulosa acetato ftalato, polivinil acetato ftalato, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, ácido metacrílico, copolímeros de ésteres de ácido metacrílico, celulosa acetato trimelitato, carboximetiletilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa acetato succinato, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden formular para proveer una liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones

variables; u otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención opcionalmente pueden contener agentes opacadores y se pueden formular de manera que las mismas liberen el ingrediente activo solamente, o preferiblemente, en una cierta parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una forma retrasada. Los ejemplos de composiciones de integración que se pueden usar incluyen a sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede estar en una forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes que se describieron previamente.

Las formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Las formas de dosificación líquidas típicamente comprenden el agente activo y un diluyente inerte, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (esp., aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), ácido oleico, glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Como alternativa, ciertas formulaciones líquidas se pueden convertir, por ejemplo, por secado por aspersion, a un polvo que se usa para preparar formas de dosificación sólidas mediante procedimientos convencionales.

Las suspensiones, además del ingrediente activo, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina,

metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Los compuestos de esta invención también se pueden administrar por vía parenteral (por ejemplo por inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal). Para la administración parenteral, el agente activo se mezcla típicamente con un vehículo apropiado para administración parenteral incluyendo, a modo de ejemplo, soluciones acuosas estériles, solución salina, alcoholes de bajo peso molecular tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, gelatina, ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, y similares. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más antioxidantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes amortiguadores de pH, o agentes dispersantes. Estas formulaciones se pueden hacer estériles mediante el uso de un medio inyectable estéril, un agente esterilizante, filtración, irradiación, o calor.

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

Cuando se administran por inhalación usando un contenedor presurizado, las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente comprenderán el ingrediente activo y un propelente adecuado, tales como diclorodifluorometano,

triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. Además, la composición farmacéutica puede estar en la forma de una cápsula o cartucho (elaborada, por ejemplo, de gelatina) que comprende un compuesto de la invención y un polvo adecuado para usar en un inhalador de polvo. Las bases para polvos adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, lactosa o almidón.

Los compuestos de la invención también se pueden formular para administración tópica a la piel en forma de ungüento o crema. Las formulaciones de ungüentos son preparaciones semisólidas que tienen una base de un aceite y/o material graso que es típicamente transparente. Los materiales oleosos apropiados para usar en formulaciones de ungüentos incluyen vaselina (jalea de petróleo), cera de abejas, manteca de cacao, manteca de karité y alcohol cetilo. Los ungüentos pueden opcionalmente incluir adicionalmente emolientes y potenciadores de penetración, si se desea.

Las formulaciones de crema pueden prepararse como emulsiones que comprenden una fase oleosa y una fase acuosa, que típicamente comprende agua purificada. Los componentes de las formulaciones de crema pueden abarcar bases de aceite, por ejemplo, vaselina, aceites minerales, aceites vegetales o animales o triglicéridos, bases de crema, por ejemplo, alcoholes de lanolina, ácido esteárico o alcohol cetoestearílico, bases de gel, por ejemplo, alcohol polivinílico, solventes, por ejemplo, propilenglicol o polietilenglicol, emulsionantes, por ejemplo, polisorbatos, estearatos, por ejemplo, estearato de glicerilo, hidroxiestearato de octilo, estearato de polioxilo, éteres estearílicos de PEG, palmitato de isopropilo o monoestearato de sorbitán, estabilizadores, por ejemplo, polisacáridos o sulfito de sodio, emolientes (es decir, humectantes),

por ejemplo, triglicéridos de cadena media, miristato de isopropilo o dimeticona, agentes de refuerzo, por ejemplo, alcohol cetílico o alcohol estearílico, agentes antimicrobianos, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, ácido sórbico, diazolidinil urea o hidroxianisol butilado, potenciadores de la penetración, por ejemplo, N-metilpirrolidona, propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol o similares, y agentes quelantes, por ejemplo, edetato de disodio.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran las composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención.

Forma de dosificación sólida oral en comprimido

Un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se mezcla en seco con celulosa microcristalina, polivinil pirrolidona, y croscamelosa de sodio en una relación de 4:5:1:1 y se comprime en comprimidos para dar una unidad de dosificación por ejemplo de 5 mg, 20 mg o 40 mg de agente activo por comprimido.

Forma de dosificación oral en cápsula

Un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con celulosa microcristalina, polivinil pirrolidona, y croscamelosa de sodio en una relación de 4:5:1:1 por granulación húmeda y se carga en cápsulas de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa para dar una unidad de dosificación, por ejemplo de 5 mg, 20 mg o 40 mg de agente activo por cápsula.

Formulación líquida

Se forma una formulación líquida que comprende un compuesto de la invención (0,1 %), agua (98,9 %) y ácido ascórbico (1,0 %) por agregado de un compuesto de la invención a una mezcla de agua y ácido ascórbico.

Forma de dosificación oral con recubrimiento entérico

Un compuesto de la invención se disuelve en una solución acuosa que contiene polivinilpirrolidona y se usa para recubrir por aspersión a esferas de celulosa microcristalina o azúcar en una proporción de 1:5 p/p de agente activo:esferas y luego se aplica una ganancia de peso de aproximadamente 5 % de un recubrimiento entérico que comprende un copolímero acrílico, por ejemplo una combinación de copolímeros acrílicos disponibles bajo la marca comercial Eudragit-L® y Eudragit-S®, o hidroxipropilmetilcelulosa acetato succinato. Las esferas con recubrimiento entérico se cargan en cápsulas de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa para proveer una dosificación unitaria de, por ejemplo, 30 mg de agente activo por cápsula.

Forma de dosificación con recubrimiento entérico

Se aplica un recubrimiento entérico que comprende una combinación de Eudragit-L® y Eudragit-S®, o hidroxipropilmetilcelulosa acetato succinato a una forma de dosificación oral en comprimido o a una forma de dosificación oral en cápsula descrita previamente.

Formulación de ungüento para una administración tópica

Se combina un compuesto de la invención con vaselina blanca, propilenglicol, mono- y di-glicéridos, parafina, hidroxitolueno butilado y edetato de calcio y disodio en una proporción apropiada para proveer una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de ungüento para una administración tópica

Se combina un compuesto de la invención con aceite mineral, parafina, carbonato de propileno, vaselina blanca y cera blanca para proveer una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de crema para una administración tópica

Se combina aceite mineral con un compuesto de la invención, propilenglicol, palmitato de isopropilo, polisorbato 60, alcohol cetílico, monoestearato de sorbitán, estearato de polioxilo 40, ácido sórbico, metilparabeno y propilparabeno para formar una fase oleosa, la cual a su vez se mezcla exhaustivamente con agua para proveer una composición que contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de crema para una administración tópica

Una formulación de crema que comprende un compuesto de la invención, alcohol bencílico, alcohol cetílico, ácido cítrico anhidro, mono- y diglicéridos, alcohol oleílico, propilenglicol, cetostearyl sulfato de sodio, hidróxido de sodio, alcohol estearílico, triglicéridos y agua contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Formulación de crema para una administración tópica

Una formulación de crema que comprende un compuesto de la invención, alcohol cetostearylíco, miristato de isopropilo, propilenglicol, cetomacrogol 1000, dimeticona 360, ácido cítrico, citrato de sodio y agua purificada, con imidurea, metilparabeno y propilparabeno como conservantes, contiene entre 0,05% y 5% en peso del agente activo.

Utilidad

Se ha demostrado que los compuestos de la invención son potentes inhibidores de la familia de enzimas JAK: JAK1, JAK2, JAK3, y TYK2. La inhibición de la familia de enzimas JAK podría inhibir la señalización de muchas citoquinas proinflamatorias claves. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de JAK de la invención sean útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como colitis ulcerativa,, y otras enfermedades gastrointestinales inflamatorias tal como la enfermedad de Crohn y la colitis inducida por inhibidor inmune de puntos de control. Se espera que los presentes inhibidores JAK resulten de utilidad para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias y pruríticas de la piel y para el tratamiento de afecciones respiratorias tales como la rinitis alérgica, asma, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Enfermedad gastrointestinal inflamatoria

Además de proveer una potente inhibición de las enzimas JAK, los compuestos de la invención se diseñan para ser pobremente absorbidos para minimizar la exposición sistémica. Los compuestos seleccionados probados en ratas canuladas mostraron una baja biodisponibilidad oral. Además, los compuestos se diseñan para que tengan su efecto en el sitio de acción, por ejemplo, en el colon. Tal como se describe más adelante en los ensayos 6 y 7, el compuesto del Ejemplo 2 exhibió una biodisponibilidad oral en ratas de menos del 5 % aproximadamente y una relación de exposición en el colon a exposición en plasma luego de la administración oral mayor que aproximadamente 250.

La colitis inducida por oxazolona es un modelo experimental que tiene un parecido histológico con la colitis ulcerativa humana. Como se describe más

adelante, se demostró que el compuesto del Ejemplo 1, entre otros compuestos de la invención, tiene actividad en el modelo de colitis inducida por oxazolona en ratones. Además, cuando se prueba en un modelo de inmunosupresión en ratones, en donde se prueba que tiene actividad funcional sistémica, se demostró que el compuesto tiene un efecto mínimo de inmunosupresión a la misma dosis requerida para demostrar eficacia en el modelo de oxazolona. Por lo tanto, se demostró que el compuesto tiene actividad anticolítica sin exhibir efectos sistémicos en modelos preclínicos.

Se espera que una alta proporción de colon a plasma provea una actividad antiinflamatoria robusta, conducida a través del lumen sin efectos adversos asociados por vía sistémica. Se espera que tales compuestos sean útiles para una variedad de indicaciones inflamatorias gastrointestinales que incluyen, a título enunciativo no taxativo, colitis ulcerativa (proctosigmoiditis, pancolitis, proctitis ulcerativa y colitis de lado izquierdo), enfermedad de Crohn, colitis colagenosa, colitis linfocítica, enfermedad de Behcet, enfermedad celiaca, colitis inducida por inhibidor inmune en puntos de control, ileítis, esofagitis eosinofílica, colitis relacionada con enfermedad de huésped versus injerto, y colitis infecciosa. La colitis ulcerativa (Reimund y col., *J Clin Immunology*, **1996**, 16, 144-150), la enfermedad de Crohn (Woywodt y col., *Eur J Gastroenterology Hepatology*, **1999**, 11, 267-276), la colitis colagenosa (Kumawat y col., *Mol Immunology*, **2013**, 55, 355-364), la colitis linfocítica (Kumawat y col., **2013**), la esofagitis eosinofílica (Weinbrand-Goichberg y col., *Immunol Res*, **2013**, 56, 249-260), la colitis asociada a enfermedad de huésped versus injerto (Coghill y col., *Blood*, **2001**, 117, 3268-3276), la colitis infecciosa (Stallmach y col., *Int J Colorectal Dis*, **2004**, 19, 308-315), la enfermedad de Behcet (Zhou y col.,

Autoimmun Rev, **2012**, 11, 699-704), la enfermedad celiaca (de Nitto y col., *World J Gastroenterol*, **2009**, 15, 4609-4614), la colitis inducida por inhibidor inmune de puntos de control (por ejemplo, colitis inducida por inhibidor de CTLA-4; (Yano y col., *J Translation Med*, **2014**, 12,191), colitis inducida por inhibidor PD-1- o PD-L1 y la ileítis (Yamamoto y col., *Dig Liver Dis*, **2008**, 40, 253-259) se caracterizan por una elevación de los niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias. Como muchas citoquinas proinflamatorias señalizan a través de la activación de JAK, los compuestos que se describen en esta solicitud pueden ser capaces de reducir la inflamación y proveer un alivio de los síntomas.

En particular, se espera que los compuestos de la invención sean útiles para la inducción y el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerativa, y para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la colitis inducida por inhibidor inmune de puntos de control, y los efectos adversos gastrointestinales de la enfermedad de huésped versus injerto.

En un aspecto, por lo tanto, la invención provee un método para tratar una enfermedad inflamatoria gastrointestinal en un mamífero (por ejemplo, un humano), en donde el método comprende administrar al mamífero un compuesto de la invención o de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la invención.

La invención además provee un método para tratar colitis ulcerativa en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero un compuesto de la invención o una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la invención.

Cuando se usan para tratar la colitis ulcerativa, los compuestos de la invención típicamente se administrarán por vía oral en una dosis diaria individual o en múltiples dosis por día, a pesar de que se pueden usar otras formas de administración. La cantidad del agente activo que se administra por dosis, o la cantidad total que se administra por día, típicamente será determinada por un médico a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición a tratar, la ruta de administración seleccionada, el compuesto real administrado y su actividad relativa, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la severidad de los síntomas del paciente, y similares.

Se espera que las dosis adecuadas para tratar la colitis ulcerativa y otros trastornos inflamatorios gastrointestinales estén en el rango entre aproximadamente 1 y aproximadamente 400 mg/día de agente activo, incluyendo entre aproximadamente 5 y aproximadamente 300 mg/día y entre aproximadamente 20 y aproximadamente 70 mg por día de agente activo para un humano con un promedio de 70 kg.

Terapia de combinación

Los compuestos de la invención también pueden ser útiles en combinación con uno o más agentes que actúan mediante el mismo mecanismo o por mecanismos diferentes para efectuar el tratamiento de los trastornos inflamatorios gastrointestinales. Las clases de agentes útiles para la terapia de combinación incluyen, a título enunciativo no taxativo, aminosalicilatos, esteroides, inmunosupresores sistémicos, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-VLA-4, anticuerpos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$, agentes anti-bacterianos, y medicamentos antidiarreicos.

Los aminosalicilatos que se pueden usar en combinación con los presentes compuestos inhibidores de JAK incluyen, a título enunciativo no taxativo, mesalamina, osalazina y sulfasalazina. Los ejemplos de esteroides incluyen, a título enunciativo no taxativo, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, budesonida, beclometasona, y fluticasona. Los inmunosupresores sistémicos útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios incluyen, a título enunciativo no taxativo ciclosporina, azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina, y tacrolimus. Además, los anticuerpos anti-TNF α , que incluyen, a título enunciativo no taxativo, infliximab, adalimumab, golimumab, y certolizumab, se pueden usar en la terapia de combinación. Los compuestos útiles que actúan por otros mecanismos incluyen a los anticuerpos anti-VLA-4, tales como natalizumab, anticuerpos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$, tales como vedolizumab, agentes antibacterianos, tales como rifaximina, y agentes antidiarreicos, tales como loperamida. (Mozaffari y col. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2014**, *14*, 583-600; Danese, *Gut*, **2012**, *61*, 918-932; Lam y col., *Immunotherapy*, **2014**, *6*, 963-971.)

En otro aspecto, por lo tanto, la invención provee una combinación terapéutica para usar en el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales, en donde la combinación comprende un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para tratar trastornos inflamatorios gastrointestinales. Por ejemplo, la invención provee una combinación que comprende un compuesto de la invención y uno o más agentes que se seleccionan de aminosalicilatos, esteroides, inmunosupresores sistémicos, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-VLA-4, anticuerpos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$, agentes anti-bacterianos, y medicamentos antidiarreicos. El o

los agentes secundarios, cuando se incluyen, están presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir en cualquier cantidad que produzca un efecto terapéuticamente beneficioso cuando se administran conjuntamente con un compuesto de la invención.

Por lo tanto, también se provee una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para tratar trastornos inflamatorios gastrointestinales.

Además, en un aspecto metodológico, la invención provee un método para tratar trastornos inflamatorios gastrointestinales, en donde el método comprende administrar al mamífero un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para tratar trastornos inflamatorios gastrointestinales.

Cuando se usan en una terapia de combinación, los agentes se pueden formular en una composición farmacéutica individual, como se divulgó previamente, o bien los agentes se pueden proveer en composiciones separadas que se administran en forma simultánea o en momentos separados, por la misma ruta o por diferentes rutas de administración. Cuando se administran separadamente, los agentes se administran en un tiempo suficientemente corto como para proveer un efecto terapéutico deseado. Dichas composiciones se pueden envasar por separado o se pueden envasar juntas como un kit. Los dos o más agentes terapéuticos en el kit se pueden administrar por la misma ruta de administración o por diferentes rutas de administración.

Enfermedades inflamatorias de la piel

La dermatitis atópica, por ejemplo, ha sido asociada a los incrementos en el nivel de las citoquinas proinflamatorias que dependen de la vía JAK-STAT, particularmente IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN γ . Debido a que los compuestos de la invención ejercen una inhibición potente de las cuatro enzimas JAK, se espera que inhiban potentemente las citoquinas proinflamatorias características de la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias de la piel. En particular, el compuesto 1-(((1R,3s,5S)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1H-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidina-3-carbonitrilo, descrito en el ejemplo 2, presentó una IC₅₀ de 50 nM o menos para la inhibición de IL-4, IL-13 e IFN γ en los experimentos correspondientes a los estudios 4, 2 y 5, respectivamente. El compuesto también presentó un efecto dependiente de la dosis y la concentración en un modelo de dermatitis de contacto irritante inducida por TPA en ratones. Además, las formulaciones modelo del compuesto del ejemplo 2 en forma de cremas y ungüentos produjeron niveles dérmicos sostenidos durante al menos 2 días en ratones y al menos 7 días en cerdos miniatura, sin una exposición detectable en el plasma.

Se espera que los niveles dérmicos sostenidos de los inhibidores de JAK en ausencia de niveles sistémicos significativos den como resultado una actividad antiinflamatoria y antiprurítica local potente en la piel, sin efectos sistémicos adversos. Se espera que estos compuestos sean beneficiosos sobre diversas afecciones inflamatorias o pruríticas dérmicas, incluyendo, entre otras, dermatitis atópica, alopecia areata, vitíligo, linfoma cutáneo de células T, prurigo nodular, liquen plano, amiloidosis cutánea primaria localizada, pénfigoide bulloso, las manifestaciones cutáneas de la enfermedad del injerto

contra el huésped, penfigoide, lupus discoide, granuloma anular, liquen simple crónico, prurito vulvar/escrotal/perianal, liquen escleroso, neuralgia post herpética, lichen planopilaris y foliculitis decalvans. En particular, la dermatitis atópica (Bao et al., JAK-STAT, 2013, 2, e24137), la alopecia areata (Xing et al., Nat Med., 2014, 20, 1043-1049), el vitiligo (Craiglow et al., JAMA Dermatol., 2015, 151, 1110-1112), el linfoma cutáneo de células T (Netchiporouk et al., Cell Cycle, 2014, 13, 3331-3335), el prurigo nodular (Sonkoly et al., J. Allergy. Clin. Immunol., 2006, 117, 411-417), el liquen plano (Welz-Kubiak et al., J. Immunol. Res., 2015, ID:854747), la amiloidosis cutánea localizada primaria (Tanaka et al., Br. J. Dermatol., 2009, 161, 1217-1224), el pénfigoide bulloso (Feliciani et al., Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 1999, 12, 55-61) y las manifestaciones dérmicas de la enfermedad del injerto contra el huésped (Okiyama et al., J. Invest. Dermatol., 2014, 134, 992-1000) se caracterizan por incrementos en el nivel de determinadas citoquinas cuya señalización ocurre a través de la activación de JAK. Por consiguiente, los compuestos de la invención podrían ser útiles para aliviar la inflamación dérmica asociada a estas citoquinas o el prurito impulsado por ellas. En particular, se espera que los compuestos de la invención sean útiles para tratar la dermatitis atópica y otras enfermedades inflamatorias de la piel.

Por ende, en un aspecto, en la invención se provee un método para tratar una enfermedad inflamatoria en la piel de un mamífero (por ejemplo, un ser humano), que comprende aplicar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un vehículo farmacéutico sobre la piel del mamífero. En un aspecto, la enfermedad inflamatoria de la piel es la dermatitis atópica.

Los compuestos de la invención también pueden usarse en combinación con antibióticos para bacterias Gram positivas, por ejemplo, mupirocina o ácido fusídico, para tratar enfermedades inflamatorias de la piel. Por consiguiente, en un aspecto, en la invención se provee un método para tratar una enfermedad inflamatoria en la piel de un mamífero, que comprende aplicar un compuesto de la invención y un antibiótico para bacterias Gram positivas sobre la piel del mamífero. En otro aspecto, en la invención se provee una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, un antibiótico para bacterias Gram positivas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se ha demostrado que los compuestos de la invención son potentes inhibidores de las enzimas JAK1, JAK2, JAK3, y TYK2 en ensayos de unión enzimática y que tienen una potente actividad funcional sin citotoxicidad en ensayos celulares, como se describe en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sintéticos y biológicos se ofrecen para ilustrar la invención, y no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención. En los ejemplos siguientes, las siguientes abreviaturas tienen los significados que se dan a continuación, a menos que se indique otra cosa. Las abreviaturas que no se definen a continuación tienen sus significados aceptados en general.

ACN = acetonitrilo

CPME =ciclopentilo metil éter

d = día(s)

DIPEA = *N,N*-diisopropiletilamina

DMF = *N,N*-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

EtOAc = acetato de etilo

EtOH = alcohol etílico

h = hora(s)

HATU = hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio

IPA = alcohol isopropílico

MeOH = metanol

min = minuto(s)

NMP = *N*-metil-2-pirrolidona

RT = temperatura ambiente

TEA = trietilamina

THF = tetrahidrofurano

TFA = ácido trifluoroacético

Xantphos = 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

Xphos = díciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo

Xantphos = 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

Xphos = díciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo

Xphos Pd G2 = cloro (2-díciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenilo) [2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II)

Los reactivos y solventes se adquirieron de proveedores comerciales (Aldrich, Fluka, Sigma, etc.), y se usaron sin purificación adicional. El progreso de las mezclas de reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento analítica (anal. HPLC), y espectrometría de masa. Las mezclas de reacción se purificaron

como se describe específicamente en cada reacción; comúnmente las mismas se purificaron mediante extracción y otros métodos de purificación tales como cristalización dependiente de la temperatura y del solvente, y precipitación. Además, las mezclas de reacción se purificaron de rutina mediante cromatografía en columna o por HPLC preparativa, típicamente usando empaquetamientos de columna C18 o BDS y eluyentes convencionales. Las condiciones de HPLC preparativa típicas se describen a continuación.

La caracterización de los productos de reacción se llevó a cabo de rutina por espectrometría de masa y ^1H -RMN. Para el análisis por RMN, se disolvieron las muestras en solvente deuterado (tal como CD_3OD , CDCl_3 , o d_6 -DMSO), y se adquirieron los espectros de ^1H -RMN con un instrumento Varian Gemini 2000 (400 MHz) bajo condiciones de observación estándares. La identificación por espectrometría de masa de los compuestos se llevó a cabo mediante un método de ionización por electroaspersión (ESMS) con un instrumento Applied Biosystems (Foster City, CA) modelo API 150 EX o un instrumento Waters (Milford, MA) 3100, acoplados a sistemas de auto purificación.

A menos que se indique otra cosa, se usaron las condiciones siguientes para las purificaciones mediante HPLC preparativa.

Columna: C18, 5 μm 21,2 x 150 mm o C18, 5 μm 21 x 250 mm o C14 5 μm 21x150 mm

Temperatura de Columna: Temperatura Ambiente

Velocidad de flujo: 20,0 mL/min

Fases móviles: A = agua + 0,05 % de TFA

B = ACN + 0,05 % de TFA,

Volumen de inyección: (100-1500 µL)

Longitud de onda del detector: 214 nm

Los compuestos crudos se disolvieron en 1:1 agua:ácido acético a aproximadamente 50 mg/mL. Se llevó a cabo una prueba de escala analítica de 4 minutos usando una columna 2,1 x 50 mm C18 seguido por una corrida de escala preparativa de 15 o 20 minutos usando 100 µL de inyección con el gradiente basado en el % de retención de B de la corrida de prueba de escala analítica. Los gradientes exactos fueron dependientes de la muestra. Se verificaron las muestras con impurezas de corrida cercanas con una columna 21 x 250 mm C18 y/o una columna 21 x 150 mm C14 para una mejor separación. Las fracciones que contienen el producto deseado se identificaron mediante análisis por espectrometría de masas.

Condiciones de HPLC Analítica

Método A

Columna: LUNA C18 (2), 150 x 4,60 mm, 3 µm

Temperatura de columna: 37°C

Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

Volumen de inyección: 5 µL

Preparación de la muestra: Disolver en 1:1 ACN:agua

Fases móviles: A = agua:ACN:TFA (98:2:0,05)

B = agua:ACN:TFA (2:98:0,05)

Longitud de onda del detector: 250 nm

Gradiente: 32 min total (tiempo (min)/ % B): 0/2, 10/20, 24/90, 29/90, 30/2, 32/2

Método B

Columna: LUNA C18 (2), 150 x 4,60 mm, 3 μ m

Temperatura de columna: 37 °C

Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

Volumen de inyección: 10 μ L

Preparación de la muestra: Disolver en 1:1 ACN:agua

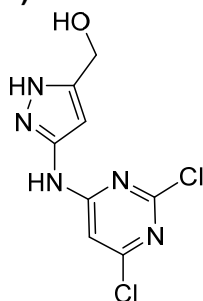
Fases móviles: A = Agua:ACN:TFA (98:2:0,05)

B = Agua:ACN:TFA (10:90:0,05)

Longitud de onda del detector: 254 nm

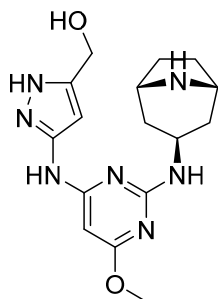
Gradiente: 35 min totales (tiempo (min)/ % B): 0/2, 20/25, 23/90, 26/90, 27/2, 35/2

Preparación 1: (3-((2,6-Dicloropirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol



A una mezcla de 2,4,6-tricloropirimidina (8,0 g, 43,7 mmol) y (3-amino-1*H*-pirazol-5-il)metanol (7,4 g, 65,4 mmol) en EtOH (80 mL) se agregó DIPEA (11,3 g, 87,2 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 20 °C por 12 h y se filtró para dar el intermediario del título (6,5 g, 57 % de rendimiento) como un sólido blanco. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₈H₇Cl₂N₅O 260,00 hallado 260,0.

Preparación 2: (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol



(a)

(1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-cloro-6-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8- carboxilato de tert-butilo

Una mezcla de (3-((2,6-dicloropirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (6,0 g, 23,1 mmol), (1*R*,3*s*,5*S*)-3-amino-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-carboxilato de tert-butilo (6,3 g, 27,7 mmol), y DIPEA (6,0 g, 46,2 mmol) en DMSO (60 mL) se agitó a 100 °C durante 12 h. La mezcla de la reacción se combinó con el producto de una corrida piloto a escala y se vertió en agua (800 mL). El precipitado se filtró y se secó al vacío. El residuo se recristalizó a partir de EtOAc (500 mL) y éter de petróleo (500 mL) para dar el intermediario del título (5,6 g, 50 % de rendimiento) como un sólido gris. Estructura confirmada por NMR.

(b)

(1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8- carboxilato de tert-butilo

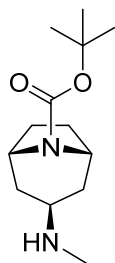
A una solución de metóxido de sodio (2,4 g, 44,5 mmol) en MeOH (30 mL) se agregó el producto del paso previo (2,0 g, 4,45 mmol) at 20 °C. La mezcla de la reacción se agitó en un tubo sellado at 100 °C por 8 h. La mezcla de la reacción se combinó con el producto de una corrida piloto a escala, se vertió en agua (30 mL), y se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 30 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se

concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (Daiso 250 x 50 mm 10 μ m, 80 mL/min, 30-55 % ACN + 0,1 % TFA/ACN) para dar el intermediario del título (0,7 g, 32 % de rendimiento) como un sólido blanco. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{21}H_{31}N_7O_4$ 446,24 hallado 446,2.

(c) (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol

Una solución del producto del paso previo (0,7 g, 1,57 mmol) en HCl 4 M en EtOAc (20 mL) se agitó a 20 °C por 2 h, y se concentró al vacío para dar la sal HCl del compuesto del título (0,6 g, 99 % de rendimiento) como un sólido blanco. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{16}H_{23}N_7O_2$ 346,19 hallado 346,2.

Preparación 3: (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(metilamino)-8-azabicyclo[3,2,1]octano-8-carboxilato de tert-butilo



(a) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octano-8-carboxilato de tert-butilo

Se agitó a temperatura ambiente una solución de (1*R*,3*s*,5*S*)-3-amino-8-azabicyclo[3,2,1]octano-8-carboxilato de tert-butilo (5,21 g, 23,00 mmol), DMF (115 mL), y trietilamina (6,41 mL, 46,0 mmol) por 15 min. Se agregó por goteo clorformato de bencilo (3,56 mL, 25,3 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 3 h, se detuvo con agua, y se extrajo con EtOAc (4 x 20 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 20 mL), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se

concentraron para dar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía de columna (120 g columna; 0-70% EtOAc en hexanos) para dar el intermediario del título como un aceite claro y espeso (3,79 g, 36 % de rendimiento; 79% de pureza). (m/z): $[M+H]^+$ calc para $C_{20}H_{28}N_2O_4$ 361,20 hallado 361,2.

(b) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(((benciloxi)carbonil)(metil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8- carboxilato de tert-butilo

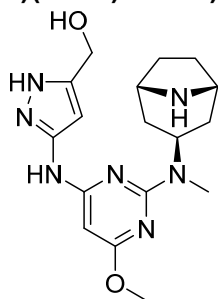
Una solución del producto del paso previo (2,99 g, 8,29 mmol) en DMF (41,5 mL) se enfrió a 0 °C y se agregó hidruro de sodio, 60 % dispersión en aceite mineral (0,398 g, 16,58 mmol) en una porción. La suspensión resultante se agitó a 0 °C por 15 min, y luego se agregó yodometano (1,03 mL, 16,58 mmol) por goteo y la mezcla turbia amarillo pálido se agitó a 0 °C por 15 min, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La mezcla de la reacción se detuvo con agua y se extrajo con EtOAc (4 x 20 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 20 mL), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron para dar un aceite transparente amarillo pálido, que se purificó mediante cromatografía de columna (80 g columna; 0-70% EtOAc en hexanos) para dar el intermediario del título como un aceite espeso, incoloro y transparente (2,07 g, 65 % de rendimiento; 97 % de pureza). (m/z): $[M+H]^+$ calcd para $C_{21}H_{30}N_2O_4$ 375,22 hallado 375,5.

(c) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(metilamino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-carboxilato de tert-butilo

A un recipiente de 100 mL se agregó paladio, 10 % en peso sobre carbono (0,577 g, 0,542 mmol). El material se expuso a nitrógeno y luego se

agregó lentamente por pipeta una solución del producto del paso previo (1,015 g, 2,71 mmol) en MeOH (54,2 mL). Se acopló un balón de gas de hidrógeno. El recipiente se evacuó y se llenó con hidrógeno tres veces antes de abrir completamente la atmósfera al gas H₂. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 16 h, se filtró a través de una almohadilla de Celite®, y se concentró para dar un aceite transparente, que se purificó mediante cromatografía de columna, 40 g columna; 0-100% MeOH en DCM) para dar el producto como un aceite traslúcido. La columna se lavó con 10:1 MeOH:TEA. El material filtrado se concentró para dar un aceite espeso y traslúcido con un sólido blanco que se disolvió en EtOAc, se filtró, se combinó con el producto de aceite traslúcido y se concentró para dar intermediario del título (0,559 g, 86 % de rendimiento) (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₃H₂₄N₂O₂ 241,18 hallado 241,3.

Preparación 4: (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol



(a) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-cloro-6-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-carboxilato de tert-butilo

Una solución de (3-((2,6-dicloropirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (200 mg, 0,77 mmol), (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(metilamino)-8-

azabicyclo[3,2,1]octan-8- carboxilato de tert-butilo (194 mg, 0,81 mmol) y TEA (0,29 mL, 1,92 mmol) se agitó en DMSO (5 mL) durante la noche a 60 °C. La mezcla de la reacción se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de fase inversa para dar el intermediario del título (143 mg, 0,31 mmol, 40 % de rendimiento), que se usó directamente en el siguiente paso.

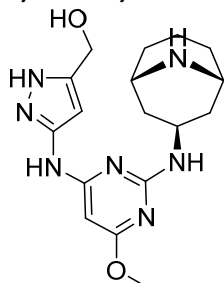
(b) (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-8-Azabicyclo[3,2,1]octan-3-il)(metil)amino)-6-cloropirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol

Al producto del paso previo (143 mg, 0,31 mmol) disuelto en ACN (3,0 mL) se agregó HCl 4 N en dioxano (1,156 mL 4,62 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 min. La mezcla de la reacción se concentró al vacío para dar la sal HCl de el intermediario del título el cual se usó sin purificación en el siguiente paso.

(c) (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol

A una solución agitada del producto del paso previo (112 mg, 0,280 mmol) en MeOH(5 mL) se agregó 50 % metóxido de sodio en MeOH (0,960 mL, 8,39 mmol). La mezcla de la reacción se calentó en un vial sellado a 80 °C durante la noche. La mezcla de la reacción se concentró al vacío y el residuo crudo se purificó por cromatografía de fase inversa para dar el producto del título (27 mg, 0,057 mmol, 20 % de rendimiento).

Preparación 5: (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol



(a) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-cloro-6-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo

A una mezcla de (3-((2,6-dicloropirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (3,7 g, 14,2 mmol) y (1*R*,3*s*,5*S*)-3-amino-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo (4,1 g, 17,0 mmol) en DMSO (37 mL) se agregó DIPEA (3,7 g, 28,4 mmol) bajo nitrógeno. La reacción se agitó a 120 °C por 12 h, se vertió en agua (80 mL), se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL), se secó, y se concentró para dar producto crudo, el cual se lavó con EtOAc (20 mL), para dar el intermediario del título (3,8 g, 56 % de rendimiento) como un sólido blanco.

(b) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo

Se realizaron cuatro reacciones en paralelo. Una mezcla del producto del paso previo (0,95 g, 2,0 mmol) en metóxido de sodio en MeOH (10 mL) se agitó a 120 °C por 3 h en un tubo sellado. La mezcla de la reacción se agregó a agua (50 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (30 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (Luna C18 250 x 50 mm 10 μm, ACN + 0,1 % TFA/ACN) para obtener el intermediario del

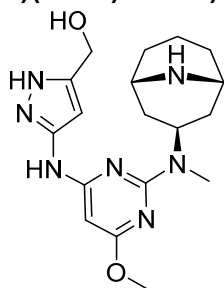
título (1,2 g producto combinado, 28 % de rendimiento) como un sólido marrón.

(*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₃₃N₇O₄ 460,26 hallado 460,3.

(c) (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol

Se agregó HCl 4 M en EtOAc (50 mL) al producto del paso previo (1,2 g, 2,5 mmol) La reacción se agitó a 25 °C por 2 h. El residuo se combinó con el producto de una preparación a escala 1,5 mmol y se concentró para dar el intermediario del título (2,0 g, 100 % de rendimiento) como un sólido amarillo claro. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₂₅N₇O₂ 360,43 hallado 360,4.

Preparación 6: (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-Azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol



(a) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-cloro-6-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo

A una mezcla de (3-((2,6-dicloropirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (6,5 g, 24,9 mmol), (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(metilamino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo (6,9 g, 27,4 mmol) en DMSO (80 mL) se agregó DIPEA (6,4 g, 49,8 mmol) bajo nitrógeno. La mezcla de la reacción se agitó a 120 °C por 8 h, se vertió en agua (80 mL), se extrajo con EtOAc (500 mL), se secó, y se concentró para dar el producto crudo. El producto crudo se combinó con el producto de una preparación separada a la

misma escala y se purificó mediante HPLC preparativa (Daiso 150 x 25 mm 5 μ m, 80 mL/min, 35-60 % ACN + 0,1 % TFA/ACN) para dar el intermediario del título (16,0 g, 64 % de rendimiento) como un sólido amarillo claro. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{22}H_{32}ClN_7O_3$ 478,23 hallado 478,2.

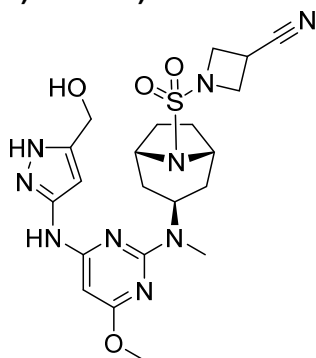
(b) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo

A una mezcla del producto del paso previo (2,0 g, 4,19 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó metóxido de sodio (2,2 g, 41,9 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 120 °C por 6 h en un tubo sellado por 12 h, se vertió en agua (100 mL), se diluyó con EtOAc (800 mL), se lavó con salmuera (50 mL), se secó, y se concentró para dar producto crudo. El producto crudo se combinó con el producto de una preparación separada a la escala 2 mmol y se purificó mediante HPLC preparativa (Synergi Max-RP, 250 x 50 mm 10 μ m, 80 mL/min, 25-50 % ACN + 0,1 % TFA/ACN) para dar el intermediario del título (2,1 g, 71 % de rendimiento) como un sólido blanco.

(c) (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-Azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol

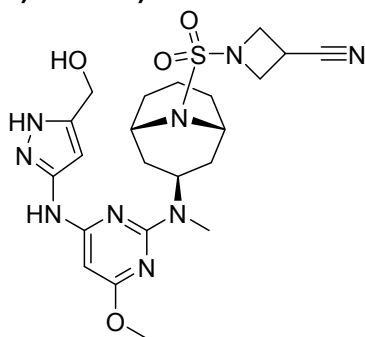
A una mezcla del producto del paso previo (2,1 g, 4,43 mmol) en EtOAc (20 mL) se agregó HCl 4 M en EtOAc (20 mL), y la reacción se agitó a 20 °C por 3 h y se concentró para dar la sal HCl del producto (2,0 g, 100 % de rendimiento) como un sólido blanco. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{18}H_{27}N_7O_2$ 374,22 hallado 374,1.

Ejemplo 1: 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(Hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo



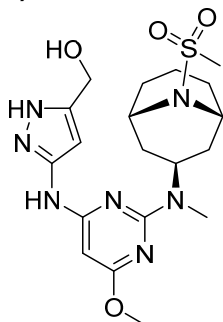
A una solución de (3-((2-((1*R*,3*s*,5*S*)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-3-il(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (15 mg, 0,042 mmol) en DMF (4,0 mL) se agregó DIPEA (0,022 mL, 0,125 mmol) seguido por 3-ciano-1-azetidinesulfonylcloruro (7,54 mg, 0,042 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se eliminó al vacío y el residuo crudo se purificó mediante HPLC de fase inversa para dar la sal TFA del compuesto del título (3,2 mg). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₉N₉O₄S 504,21 hallado 504,1.

Ejemplo 2: 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(Hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo



A una solución de HCl de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (150 mg, 0,402 mmol) y DIPEA (0,351 mL, 2,008 mmol) en DMF (3 mL) a 0 °C se agregó 3-ciano-1-azetidinesulfonilcloruro (72,5 mg, 0,402 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a 0 °C por 10 min y luego a temperatura ambiente por 15 h. La mezcla de la reacción se concentró al vacío para dar un líquido rojo que se purificó mediante HPLC preparativa para dar la sal TFA del compuesto del título (72,4 mg, 0,115 mmol, 28,5 % de rendimiento) como un sólido blanco. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₃₁N₉O₄S 518,22 hallado 518.

Ejemplo 3: (3-((6-metoxi-2-(metil((1*R*,3*s*,5*S*)-9-(metilsulfonil)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol

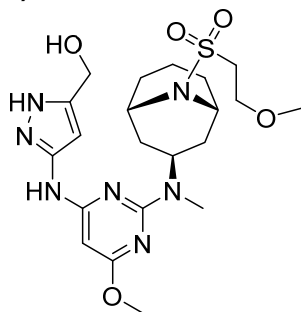


Una solución de HCl de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (250 mg, 0,669 mmol) en DMF (7,0 mL) se enfrió a 0 °C y se agregó DIPEA (0,35 mL, 2,008 mmol) en una porción seguido por cloruro de metansulfonilo (0,053 mL, 77 mg, 0,676 mmol) que se agregó por goteo. La mezcla de la reacción se agitó durante la noche, se disolvió en 1:1 ácido acético:agua (6 mL), se filtró, y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal TFA del

compuesto del título (94 mg, 31 % de rendimiento) como un polvo blanco.

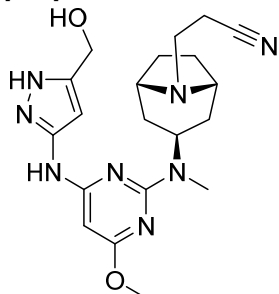
(*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₉H₂₉N₇O₄S 452,15 hallado 452,2.

Ejemplo 4: (3-((6-metoxi-2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-((2-metoxietil)sulfonil)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)pirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol



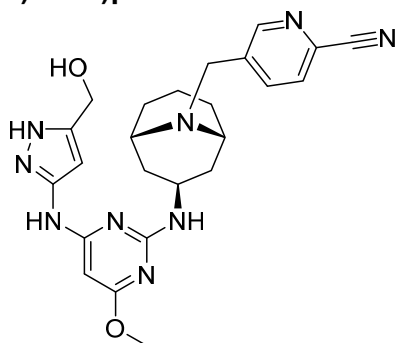
Una solución de HCl de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (250 mg, 0,703 mmol) en DMF (7,0 mL) se enfrió a 0 °C y se agregó DIPEA (0,35 mL, 2,008 mmol) en una porción seguido por agregado de cloruro de 2-metoxi-1-etanosulfonilo (111 mg, 0,676 mmol) por goteo. La mezcla de la reacción se agitó durante la noche, se disolvió en 1:1 ácido acético:agua (6 mL), se filtró, y se purificó mediante HPLC preparativa para dar la sal TFA del compuesto del título (41 mg, 12 % de rendimiento) como un sólido blanco. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₃₃N₇O₅S 496,23 hallado 496,2.

Ejemplo 5: 3-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-8-il)-propanonitrilo



A una solución de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-8-azabicyclo[3,2,1]octan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (15 mg, 0,042 mmol) en MeOH (4,0 mL) se agregó DIPEA (0,022 mL, 0,125 mmol) seguida por acrilonitrilo (2,70 μ L, 0,042 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se concentró al vacío y se purificó mediante HPLC de fase inversa para dar la sal TFA del compuesto del título (4,3 mg). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₈N₈O₂ 413,23 hallado 413,2.

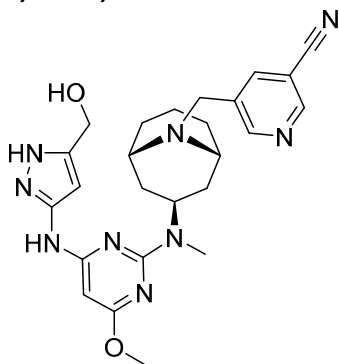
Ejemplo 6: 5-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)picolinonitrilo



Se agregó Diisopropilamina (0,032 mL, 0,225 mmol) (0,256 mL) a 0,15 M de solución de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)amino)-6-

metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (29,8 mg, 0,075 mmol) en DMF y la solución se removió para disolver todo el material. Se agregó a la solución 0,23 M de solución de 4-(clorometil)-picolinonitrilo) (0,5 mL, 34 mg, 0,113 mmol) en DMF y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó resina de poliestireno-tiofenol (0,115 g, 0,150 mmol), la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 h y se filtró. El recipiente de reacción se lavó con DMF (0,5 mL) y se combinaron los lavados, se concentró por evaporación por rotación, se disolvió en 1:1 ácido acético:agua, se filtró, y se purificó mediante HPLC de fase inversa para dar la sal TFA del compuesto del título (6,4 mg). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₂₉N₉O₂ 476,24 hallado 476,1.

Ejemplo 7: 5-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)metil)nicotinonitrilo

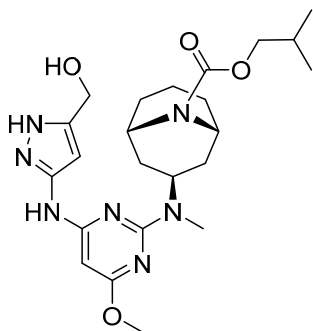


Una solución de HVL de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (20 mg, 0,054 mmol), 5-(bromometil)nicotinonitrilo (10,55 mg, 0,054 mmol) y carbonato de potasio (22,20 mg, 0,161 mmol) se agitó en DMF (6,0 mL) a 60 °C durante la noche. La mezcla de la reacción se concentró al vacío y se purificó mediante

HPLC de fase inversa para dar la sal TFA del intermediario del título (3,7 mg).

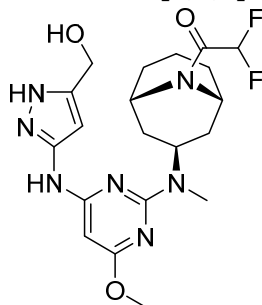
(*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₃₁N₉O₂ 490,26 hallado 490,2.

Ejemplo 8: (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de isobutilo



A una solución de (3-((2-((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol, HCl (25 mg, 0,061 mmol) y DIPEA (42,6 µL, 0,244 mmol) en DMF (305 µL) a 0 °C se agregó cloroformato de isobutilo (10 mg, 0,073 mmol) en DMF (305 µL) por goteo. La mezcla de la reacción se agitó a 0 °C por 5 min y luego se dejó alcanzar RT. Luego de 24 h, la mezcla de la reacción se concentró, se disolvió en 1:1 ACN:agua y se purificó mediante HPLC de fase inversa para dar la sal TFA del compuesto del título (6,4 mg). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₅N₇O₄ 474,28 hallado 474,2.

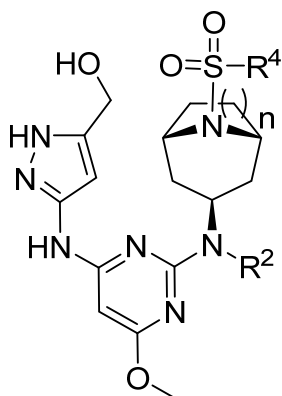
Ejemplo 9: 2,2-difluoro-1-((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)etan-1-ona



Se agregó HATU (0,029 g, 0,077 mmol) a una solución de 2,2-difluoroácido acético (6,72 mg, 0,070 mmol) en DMF (3 mL) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 5 min para preparar 0,14 M de solución del ácido activado. Se agregó una solución 0,14 M de ácido activado (0,5 mL, 0,070 mmol) a una solución de HCL de (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (29 mg, 0,070 mmol) y DIPEA (0,049 mL, 0,280 mmol) en DMF y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 min, se concentró al vacío y el residuo resultante se disolvió en 1:1 ácido acético:agua y se purificó mediante HPLC de fase inversa para dar la sal TFA del compuesto del título (3,9 mg). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₇N₇O₃ 452,21 hallado 452,1.

Los compuestos de las Tablas 1-3 se prepararon utilizando métodos sintéticos similares,.

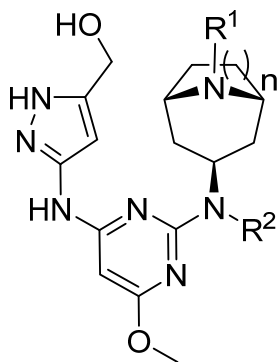
Tabla 1



Ex No.	n	R ²	R ⁴	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-1	1	H	azetidin-1-ilo	C ₁₉ H ₂₈ N ₈ O ₄ S	465,20	465
1-2	1	H		C ₂₀ H ₂₇ N ₉ O ₄ S	490,19	490
1-3	1	H	piridin-3-ilo	C ₂₁ H ₂₆ N ₈ O ₄ S	487,18	487,2
1-4	1	H	fenil	C ₂₂ H ₂₇ N ₇ O ₄ S	486,18	486,3
1-5	2	H	azetidin-1-ilo	C ₂₀ H ₃₀ N ₈ O ₄ S	479,21	479,1
1-6	2	H		C ₂₁ H ₂₉ N ₉ O ₄ S	504,21	504,1
1-7	2	H	5-fluoropiridin-3-ilo	C ₂₂ H ₂₇ FN ₈ O ₄ S	519,19	519,1
1-8	2	H	fenil	C ₂₃ H ₂₉ N ₇ O ₄ S	500,20	500,1
1-9	2	H	-C ₂ H ₅	C ₁₉ H ₂₉ N ₇ O ₄ S	452,20	452,1
1-10	2	H	-CH ₂ -ciclopropil	C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₄ S	478,22	478,1
1-11	2	H	piridin-3-ilo	C ₂₂ H ₂₈ N ₈ O ₄ S	501,20	501,1
1-12	2	- CH ₃	-(CH ₂) ₂ CN	C ₂₁ H ₃₀ N ₈ O ₄ S	491,21	491
1-13	2	- CH ₃	pirrolidin-1-ilo	C ₂₂ H ₃₄ N ₈ O ₄ S	507,24	507,2

Ex No.	<i>n</i>	R ²	R ⁴	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-14	2	- CH ₃	ciclopropil	C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₄ S	478,22	478,1
1-15	2	- CH ₃	piridin-3-ilo	C ₂₃ H ₃₀ N ₈ O ₄ S	515,21	515,1
1-16	2	- CH ₃	fenil	C ₂₄ H ₃₁ N ₇ O ₄ S	514,22	514,1
1-17	2	- CH ₃	azetidin-1-ilo	C ₂₁ H ₃₂ N ₈ O ₄ S	493,23	493,2
1-18	2	- CH ₃	-CH ₂ -ciclopropil	C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₄ S	492,23	492,2
1-19	2	- CH ₃	5-fluoropiridin-3-ilo	C ₂₃ H ₂₉ FN ₈ O ₄ S	533,20	533,1

Tabla 2



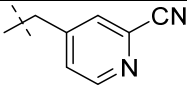
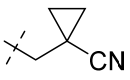
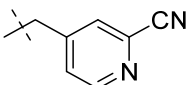
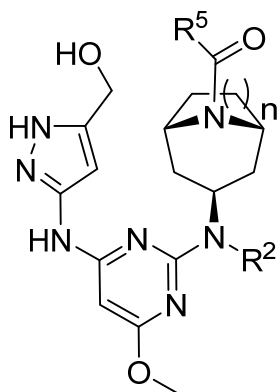
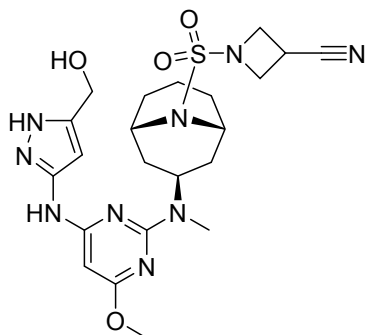
Ex No.	<i>n</i>	R ²	R ¹	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
2-1	1	H	-CH ₂ -piridin-4-ilo	C ₂₂ H ₂₈ N ₈ O ₂	437,23	437
2-2	2	H	-CH ₂ -piridin-4-ilo	C ₂₃ H ₃₀ N ₈ O ₂	451,25	451,2
2-3	2	H		C ₂₄ H ₂₉ N ₉ O ₂	476,24	476,2
2-4	2	H	-CH ₂ -piridin-3-ilo	C ₂₃ H ₃₀ N ₈ O ₂	451,25	451,2
2-5	2	- CH ₃	-(CH ₂) ₂ CN	C ₂₁ H ₃₀ N ₈ O ₂	427,25	427
2-6	2	- CH ₃		C ₂₃ H ₃₂ N ₈ O ₂	453,27	453
2-7	2	- CH ₃	-CH ₂ -piridin-4-ilo	C ₂₄ H ₃₂ N ₈ O ₂	465,27	465,1
2-8	2	- CH ₃		C ₂₅ H ₃₁ N ₉ O ₂	490,26	490,2

Tabla 3

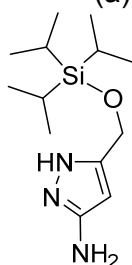


Ex No.	<i>n</i>	R ²	R ⁵	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
3-1	2	H	-CHF ₂	C ₁₉ H ₂₅ F ₂ N ₇ O ₃	438,20	438,1
3-2	2	- CH ₃	-O-isobutilo	C ₂₃ H ₃₅ N ₇ O ₄	474,28	474,2
3-3	2	- CH ₃	-OCH ₃	C ₂₀ H ₂₉ N ₇ O ₄	432,23	432,2
3-4	2	- CH ₃	morfolin-1-ilo	C ₂₃ H ₃₄ N ₈ O ₄	487,27	487,2
3-5	2	- CH ₃	-CH ₂ - ciclopropilo	C ₂₃ H ₃₃ N ₇ O ₃	456,26	456,2
3-6	2	- CH ₃	-CH ₃	C ₂₀ H ₂₉ N ₇ O ₃	416,23	416,1
3-7	2	- CH ₃	ciclopentilo	C ₂₄ H ₃₅ N ₇ O ₃	470,28	470,2
3-8	2	- CH ₃	ciclobutilo	C ₂₃ H ₃₃ N ₇ O ₃	456,26	456,2

Ejemplo 10: 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(Hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo



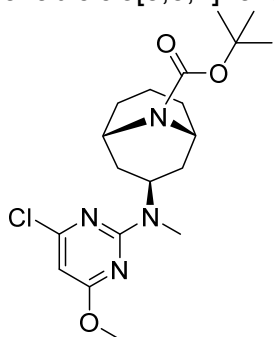
(a) 5-(((triisopropilsilil)oxi)metil)-1*H*-pirazol-3-amina (**3'**)



3'

A un recipiente de 100 mL se agregó (3-amino-1*H*-pirazol-5-il)metanol (5,8 g, 51,3 mmol), 1-metil-2-pirrolidinona (58,0 mL) e imidazol (4,54 g, 66,7 mmol) seguido por cloruro de triisopropilsililo (11,95 mL, 56,4 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 22 °C durante la noche y luego se agregaron EtOAc (145 mL) y agua (145 mL). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (145 mL) y salmuera (15 %, 100 mL), se secó sobre Na₂SO₄, y se evaporó bajo presión reducida para dar el intermediario del título (13,33 g, 49,5 mmol, 96 % de rendimiento) HPLC Método A Tiempo de retención 19,00 min.

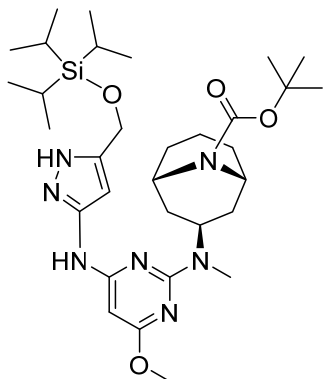
(b) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-cloro-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-c carboxilato de tert-butilo (**9'**)



9'

A una mezcla de 2,4-dicloro-6-metoxipirimidina (20 g, 112 mmol) y (1*R*,3*s*,5*S*)- 3-(metilamino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo (36,9 g, 145 mmol) en THF (300 mL) se agregó DIPEA (39,0 mL, 223 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a 20-25 °C durante la noche. Se agregó adicionalmente (1*R*,3*s*,5*S*)-3-(metilamino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo (4,26 g, 16,76 mmol) y la mezcla de la reacción se calentó a 55 °C, se agitó por 2,5 h, se enfrió a temperatura ambiente y se agitó por 2 d. Se agregó heptano (400 mL) durante 30 min y la mezcla de la reacción se filtró. La fase líquida se azeotropó con IPA (300 mL, y luego 200 mL) a aproximadamente 200-300 mL, se agitó a 5 °C durante la noche, y se filtró para dar el intermediario del título (29,2 g, 71,4 mmol, 63,9 % de rendimiento). HPLC Método A Tiempo de retención 28,27 min.

(c) (1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-metoxi-6-((5-(((triisopropilsilil)oxi)metil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-carboxilato de tert-butilo (**7'**)



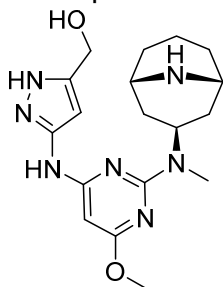
7'

A un recipiente de 250 mL se agregó el producto del paso previo (**9'**) (8 g, 20,16 mmol), el producto de paso (a) (**3'**) (6,79 g, 25,2 mmol), Cs₂CO₃ (13,13 g, 40,3 mmol), Xphos Pd G2 (0,793 g, 1,008 mmol) y XPhos (0,480 g, 1,008 mmol), la mezcla de la reacción se desgasificó tres veces y se agregó 1,4-dioxano (80 mL) y agua (8,00 mL) para dar una suspensión. La mezcla de la reacción se desgasificó tres veces bajo vacío y nitrógeno y se calentó a 100 °C, se refluxó durante la noche, y se enfrió a 35 °C. Se agregó sílice funcionalizada con tioles SiliaMetS® (4 g) y la mezcla de la reacción se calentó a 65 °C, se agitó por 2 h, se enfrió a 50 °C y se filtró a través de Celite® (5 g). Se agregaron agua (200 mL) y acetato de isopropilo (200 mL), las capas se separaron, y la capa orgánica se lavó con 20 % NaHSO₃. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas se separaron nuevamente y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (300 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron para dar producto crudo (aproximadamente 20 g). Se agregó metanol (50 mL) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con metanol (10 mL) para eliminar el sólido y dar el compuesto del título como una

solución de metanol la cual se usó directamente en el siguiente paso. HPLC

Método A: Tiempo de retención 16,05 min.

(d) 3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (**1**)



1

Se agregó a un recipiente de 250 mL el producto crudo del paso previo (**7'**) en metanol (50 mL) (12,68 g, 20,136 mmol) y 3 M HCl en CPME (67,1 mL, 201 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 h, y se filtró para dar la sal 3HCl cruda del compuesto del título (4,8 g, 9,94 mmol, 49,4 % de rendimiento).

Se agregó a un recipiente la sal 3 HCl cruda precedente (2 g, 4,14 mmol) seguida por agua (30 mL) y Sílice funcionalizada con tioles SiliaMetS 40 % p/p (0,8 g, 4,14 mmol) y la mezcla de la reacción se calentó a 65 °C, se agitó por 16 h, se filtró a través de Celite y se lavó con agua (1,5 mL). Se agregó acetona (120 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se filtró, se lavó con acetona (10 mL) y se secó al vacío a 50 °C para dar la sal 3 HCl purificada del compuesto del título (1,05 g, 2,175 mmol, 52,5 % de rendimiento). HPLC Método A: Tiempo de retención 10,09 min.

(e) 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(Hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidin-3-carbonitrilo

A un vial se agregaron el producto del paso previo (**1**) (0,83 g, 1,719 mmol) y NMP (8,3 mL), seguido por TEA (1,44 mL, 10,31 mmol). La mezcla de la reacción se agitó por 5-10 min. Se agregó cloruro de 3-Cianoazetidin-1-sulfonilo (0,466 g, 2,58 mmol) a 22 °C. Luego de 2 h, se agregó agua (25 mL) durante 30 min y la mezcla de la reacción se agitó por 22 h. La mezcla de la reacción se filtró y se lavó con agua (2 mL) para dar el producto del título (0,9 g, 1,704 mmol, 99 % de rendimiento) como un sólido blanco. HPLC Método A: Tiempo de retención 16,18 min.

Ejemplo 11: Forma cristalina I 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo

A un recipiente de 100 mL se agregó 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((3-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-5-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo (1 g, 1,932 mmol) y DMF (3,00 mL) seguido por acetona (4 mL). Luego se agregó agua (6 mL) durante 5 min y la mezcla de la reacción se agitó durante la noche y se filtró, y el sólido se lavó con agua y acetona, y se secó por 30 min para dar el compuesto del título (0,94 g, 1,816 mmol, 94 % de rendimiento). HPLC Método A: Tiempo de retención 16,30 min.

Ejemplo 12: Forma Cristalina I 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo

A un recipiente de 20 L se agregaron (3-((2-(((1*R*,3*s*,5*S*)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-metoxipirimidin-4-il)amino)-1*H*-pirazol-5-il)metanol (**1**) (1,20 kg, 2,69 mol), NMP (4,8 kg) y TEA (1,36 kg, 13,45

mol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 h. A continuación, se agregó NMP (2,4 kg) y la mezcla de la reacción se agitó y se enfrió a 5-10 °C durante aproximadamente 1 h. Se agregó cloruro de 3-Cianoazetidín-1-sulfonilo (0,58 kg, 3,23 mol) en tres lotes, que se agregaron cada 0,5 h y la mezcla de la reacción se agitó por 2 h y se calentó a temperatura ambiente. Se agregó metanol (4,2 kg), y la mezcla de la reacción se agitó por 0,5 h. Se agregó agua (21,6 kg) durante 3 h y la mezcla de la reacción se agitó por 0,5 h y se filtró. El sólido se enjuagó con metanol (1,0 kg) para dar el compuesto del título crudo (1,33 kg) del cual se disolvió 1,20 kg en NMP (3,6 kg). Se agregó acetona (3,8 kg), la solución se filtró y el material filtrado se calentó a 45-55 °C con agitación. Se agregó agua (6,6 kg) durante 6 h y la mezcla se agitó, se enfrió a 25-30 °C y se filtró. El sólido se enjuagó con 4:5,5 de acetona:agua (1,5 L) y se secó para dar el compuesto del título (1,21 kg, 99 % de pureza, 85 % de rendimiento) HPLC Método B: Tiempo de retención 15,23 min. El producto se micronizó usando un proceso de molido a chorro de aire a la siguiente distribución de tamaño de partícula: $X_{10} = 0,70 \mu\text{m}$, $X_{50} = 2,17 \mu\text{m}$, y $X_{90} = 6,15 \mu\text{m}$, donde X_n se define como el porcentaje de partículas menor que n %.

Ejemplo 13: 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidín-3-carbonitrilo Forma cristalina II

A un recipiente se agregaron 1-(((1*R*,3*s*,5*S*)-3-((4-((5-(Hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidín-3-carbonitrilo (16 g, 30,9 mmol) y DMF (160 mL) y la mezcla de la reacción se filtró. Se agregó agua (480 mL) a la solución durante

30 min y la mezcla de la reacción se calentó a 65 °C, se agitó durante la noche, se enfrió a temperatura ambiente, se agitó por 20 h, y se filtró. El sólido se secó durante la noche para dar el intermediario del título (11,8 g, 22,80 mmol, 73,8 % de rendimiento). HPLC Método A: Tiempo de retención 16,19 min.

Ejemplos 14-16: Propiedades de las formas sólidas de la invención

Se analizaron muestras de la Forma I y de la Forma II base libre cristalina de 1-(((1*R*,3*S*,5*S*)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1*H*-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3,3,1]nonan-9-il)sulfonil)azetidin-3-carbonitrilo de los Ejemplos 12 y 13 respectivamente, mediante difracción de rayos X en polvo (PXRD) calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico s (TGA), y sorción dinámica de humedad (DMS).

Ejemplo 14 Difracción de rayos X en polvo

Se obtuvo el patrón de difracción de rayos X en polvos de las Figuras 1 y 5 con un difractómetro de rayos X Bruker D8-Advance usando radiación Cu-*K* α ($\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$) con una potencia de salida de 45 kV y corriente de 40 mA. El instrumento se operó en la geometría Bragg-Brentano con incidente, divergencia, y rendijas de dispersión ajustadas para maximizar la intensidad en la muestra. Para la medida, se presionó suavemente una pequeña cantidad de polvo (entre 5 y 25 mg) sobre un soporte para muestra para formar una superficie suave y se sometió a exposición con rayos X. Las muestras se escanearon en modo 2θ - 2θ entre 2° y 40° en 2θ con un tamaño de paso de 0,02° y una velocidad de escaneo de 0,30°/segundo por paso. La adquisición de datos se controló mediante el programa de computación para medida Bruker DiffracSuite y se analizó mediante el programa de computación Jade (versión 7.5.1). El instrumento se calibró con un corindón estándar, en un ángulo dos-

theta $\pm 0,02^\circ$. Las posiciones de los picos y espaciamentos- d de dos-theta PXRD observados se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente para la forma cristalina I y la forma cristalina II. Se compararon las posiciones pico dos-theta del material micronizado de la Forma I listado en la Tabla 4, con las posiciones pico de una muestra sin micronizar preparada por el mismo proceso sintético. La diferencia máxima observada en las posiciones pico dos theta fue 0,04 grados.

Tabla 4: Datos PXRD para la Forma cristalina I

2-Theta	d(Å)	Área	A %
8,89	9,94	460823	100
10,64	8,31	75783	16,4
10,99	8,05	116893	25,4
12,99	6,81	153914	33,4
13,44	6,59	156394	33,9
14,54	6,09	66952	14,5
14,76	6,00	85164	18,5
15,02	5,89	133090	28,9
15,74	5,63	59537	12,9
16,25	5,45	75492	16,4
16,47	5,38	85726	18,6
20,16	4,40	443759	96,3
20,39	4,35	207159	45,0
20,93	4,24	66277	14,4
21,81	4,07	52296	11,3
22,22	4,00	79031	17,1
23,36	3,81	62926	13,7
23,56	3,77	92923	20,2
24,99	3,56	70165	15,2
25,27	3,52	124788	27,1
26,25	3,39	98075	21,3
26,84	3,32	77303	16,8

Tabla 5: Datos PXRD para la forma cristalina II

2-Theta	d(Å)	Área	A %
8,87	9,96	342177	100
10,64	8,31	61376	17,9
11,01	8,03	86511	25,3
12,88	6,87	105843	30,9
13,47	6,57	107366	31,4
14,51	6,10	45973	13,4
14,72	6,01	45739	13,4
15,04	5,88	77441	22,6
15,58	5,69	32094	9,4
16,51	5,36	48996	14,3
16,88	5,25	18790	5,5
19,02	4,66	23117	6,8
20,00	4,44	190640	55,7
20,42	4,35	63067	18,4
20,73	4,28	56902	16,6
21,67	4,10	26834	7,8
22,30	3,98	47801	14
22,93	3,87	20999	6,1
23,32	3,81	40192	11,7
25,28	3,52	57929	16,9
25,99	3,43	28870	8,4

Ejemplo 15: Análisis térmico

Se llevó a cabo una Calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un módulo TA Instruments Model Q-100 con un controlador Thermal Analyst. Se recogieron datos y se analizaron usando TA Instruments Thermal Analysis. Una muestra de cada forma cristalina se pesó con precisión en una bandeja de aluminio cubierta. Después de un período de equilibrio isotérmico de 5 minutos a 5 ° C, la muestra se calentó usando una rampa de calentamiento lineal de 10 °C/min entre 0 °C y 300 °C. En las Figuras 2 y 6A se muestra un termograma DSC representativo de las forma I y Forma II de la base libre cristalina de la invención, respectivamente.

Las mediciones de análisis termogravimétrico (TGA) se realizaron usando un módulo TA Instruments Model Q-50 equipado con capacidades de alta resolución. Se recolectaron los datos usando un controlador TA Instruments Thermal Analyst y se analizaron utilizando software de TA Instruments Universal Analysis. Una muestra pesada se colocó en una bandeja de platino y fue escaneada con una velocidad de calentamiento de 10 °C desde temperatura ambiente hasta 300 °C. Las cámaras de balance y horno se purgaron con flujo de nitrógeno durante el uso. En las Figuras 3 y 7 se muestra un trazo representativo de TGA de la forma I y Forma II.

Ejemplo 16: Evaluación de sorción dinámica de humedad

La medida de sorción dinámica de humedad (DMS) se realizó usando un sistema de microbalanza atmosférica VTI, SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se usó una muestra pesada y la humedad fue el valor más bajo posible (cercano a 0% de HR) al comienzo del análisis. El análisis de DMS consistió en un paso inicial de secado (0% de HR) durante 120 minutos, seguido por dos ciclos de sorción y desorción con una tasa de barrido de 5 % de HR/paso en un

rango de humedad entre 5 % de HR y 90 % de HR. La corrida de DMS se realizó de manera isotérmica a 25°C. Un trazo DMS representativo de la Forma I y Forma II base libre cristalina de la invención se muestra en las Figuras 4 y 8, respectivamente.

Ensayos biológicos

Los compuestos de la invención han sido caracterizados con uno o más de los siguientes ensayos biológicos.

Ensayo 1: Ensayo bioquímico de quinasas JAK y no blanco

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

Los compuestos diluidos de manera serial se preincubaron con cada una de las cuatro enzimas JAK y el sustrato en microplacas de 384 pocillos blancos (Corning) a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente se agregó ATP para iniciar las reacciones de quinasa en un volumen total de 10 µL, con DMSO 1%. Las concentraciones de enzima final para JAK1, 2, 3 y Tyk2 son 4,2 nM, 0,1 nM, 1 nM, y 0,25 nM respectivamente; las correspondientes concentraciones Km de ATP usadas son 25 µM, 3 µM, 1,6 µM, y 10 µM; mientras que la concentración del sustrato es 200nM para los cuatro ensayos. Las reacciones de quinasa se dejaron proceder durante 1 hora a t temperatura ambiente antes de agregar 10 µL de preparación de EDTA (concentración final 10 mM) y anticuerpo Tb-anti-pSTAT1 (pTyr701) (Life Technologies, concentración final 2 nM) en solución amortiguadora de dilución TR-FRET (Life

Technologies). Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1h antes de ser leídas en el lector EnVision (Perkin Elmer). Las señales de relación de emisión (520 nm/495) se registraron y se utilizaron para calcular los valores de inhibición porcentual en base a los controles con DMSO y de fondo.

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

Los compuestos de ensayo que tienen un valor mayor de pKi en cada uno de los cuatro ensayos de JAK muestran una inhibición más grande de la actividad de JAK. Los compuestos de la invención evaluados en este ensayo típicamente exhibieron valores de pKi entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 10,3

Se desarrolló un panel de ensayos de tirosina quinasas no blanco (ABL1, Flt3, RET, FGFR2, NTRK1TrkA, y pDGFR β) usando una metodología similar, con enzimas recombinantes obtenidas de Life Technologies y sustratos peptídicos biotinilados sintetizados en AnaSpec. Todos los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con una concentración final de ATP de 100 μ M. Los reactivos de detección, incluyendo el anticuerpo Eu-anti-fosfotirosina (pY20) y SureLight APC-SA, se adquirieron de Perkin Elmer. Se registraron las señales de relación de emisión (665nm/615nm) y se utilizaron para el análisis de los datos, y los resultados finales se expresaron como pIC_{50} . Los

compuestos seleccionados ensayados en este ensayo exhibían típicamente valores plC_{50} de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6,5.

Ensayo 2: Ensayo celular de potencia de JAK : Inhibición de IL-13

Se evaluó la potencia de los compuestos de prueba para inhibir la citoquina interleuquina-13 (IL-13) dependiente de JAK midiendo la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 (IL-13, R&D Systems) en células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 (ATCC).

El anticuerpo anti-STAT6 (Cell Signaling Technologies) se conjugó a esferas aceptoras AlphaScreen (Perkin Elmer), mientras que el anticuerpo anti-pSTAT6 (pTyr641) (Cell Signaling Technologies) se biotinilizó usando EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific).

Se cultivaron células HT-29 a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5% en medio McCoy's 5a Modified (ATCC) suplementado con FBS 10% (Hyclone), penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL (Life Technologies), y GlutaMAX 2 mM (Life Technologies). En el día 1 del ensayo, se sembraron las células con una densidad de 7.500 células/pocillo en placas de 384 pocillos blancos recubiertos con poli-D-lisina (Corning) con 25 µL de medio, y se dejaron adherir durante la noche en el incubador. En el día 2 del ensayo, se eliminó el medio y se reemplazó con 12 µL de solución amortiguadora de ensayo (solución salina balanceada de Hank/HBSS, HEPES 25mM, y albúmina sérica bovina/BSA 1 mg/ml) conteniendo respuestas a las dosis de los compuestos de ensayo. Los compuestos se diluyeron serialmente en DMSO y luego se diluyeron otras 1000 veces en medio para llevar la concentración final de DMSO a 0,1%. Las células se incubaron con los compuestos de ensayo a 37°C durante 1 h, y luego se agregaron 12 µL de IL-13 precalentada (12 ng/ml

en solución amortiguadora de ensayo) como estímulo. Después de incubar a 37°C durante 30 min, se eliminó la solución amortiguadora de ensayo (que contiene el compuesto e IL-13), y se agregaron 10 μ L de solución amortiguadora de lisis celular (HEPES 25 mM, SDS 0,1%, NP-40 1%, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1,3 mM, EGTA 1 mM, y se suplementó con inhibidores de proteasas Complete Ultra mini y PhosSTOP de Roche Diagnostics). Las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 30min antes del agregado de los reactivos de detección. Primero se agregó una mezcla de biotina-anti-pSTAT6 y esferas aceptoras conjugadas con anti-STAT6 y se incubó a temperatura ambiente durante 2h, seguido por el agregado de esferas donantes conjugadas con estreptavidina (Perkin Elmer). Después de un mínimo de 2 h de incubación, las placas de ensayo se leyeron en el lector de placas EnVision. Se registraron las señales de luminiscencia AlphaScreen y se utilizaron para calcular los valores de inhibición porcentual en base a los controles con DMSO y de fondo.

Para el análisis de respuesta a la dosis, se graficaron los datos de inhibición porcentual con respecto a las concentraciones del compuesto, y determinándose los valores de IC_{50} a partir de un modelo de ajuste robusto de 4 parámetros con el programa de computación Prism. Los resultados se expresaron como el logaritmo negativo del valor de IC_{50} , pIC_{50} .

Los compuestos de ensayo que tienen un valor mayor de pIC_{50} en este ensayo muestran una inhibición mayor de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13. Los compuestos de la invención estudiados en este ensayo exhiben típicamente valores de pIC_{50} entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,8.

Ensayo 3: Ensayo de citotoxicidad JAK

Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad/citotoxicidad celular luminiscente CellTiter-Glo en células (ATCC) de epitelio pulmonar de humano BEAS-2B bajo condiciones de cultivo normales.

Las células se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ 5% en medio DMEM 50%/F-12 50% (Life Technologies) suplementado con FBS 10% (Hyclone), penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL (Life Technologies), y GlutaMAX 2 mM (Life Technologies). En el día 1 del ensayo, las células se sembraron con una densidad de 500 células/pocillo en placas blancas de cultivo de tejido de 384 pocillos (Corning) con 25 µL de medio, y se dejaron adherir durante la noche en el incubador. En el día 2 del ensayo, se agregaron 5 µL del medio que contiene las respuestas a dosis de los compuestos de ensayo, y se incubó a 37°C durante 48h. Posteriormente se agregaron 30 µL de solución de detección CellTiter-Glo (Promega), se mezcló en un agitador orbital durante 5 min, y se incubó durante 10 min adicionales antes de ser leído en un lector EnVision. Se registraron las señales de luminiscencia y se calcularon los valores como por ciento del control con DMSO.

Para el análisis de la respuesta a dosis, se graficaron los datos como porcentual del control con DMSO respecto a las concentraciones del compuesto para derivar las curvas de respuesta a la dosis por conexión con líneas de cada punto de datos. La concentración a la cual cada curva cruza el umbral de 15% de inhibición se define como CC₁₅. Los resultados se expresan como el logaritmo negativo del valor de CC₁₅, pCC₁₅.

Se espera que los compuestos de ensayo que exhiben un valor menor de pCC_{15} en este ensayo tengan una menor probabilidad de provocar citotoxicidad. Los compuestos de la invención evaluados en este ensayo típicamente exhibieron valores de pCC_{15} entre menos de 5 y aproximadamente 6.

Resultados del ensayo *in vitro*

Todos los compuestos de los Ejemplos 1 a 9 y Tablas 1 a 3 se ensayaron en uno o más de los ensayos descritos precedentemente. Dado que se encontró y se comprendió que la potencia de la enzima JAK1 era predictiva de la potencia celular descrita en el Ensayo 2, la caracterización de la enzima de ciertos compuestos se limitó a la enzima JAK1.

En la tabla 6 siguiente, para los ensayos de las enzimas JAK1, JAK 2, JAK3, y TYK2, A representa un valor de $pK_i \geq 10$ ($K_i \leq 0,1$ nM), B representa un valor de pK_i entre 9 y 10 (K_i entre 1 nM y 0,1 nM), C representa un valor de pK_i entre 8 y 9 (K_i entre 10 nM y 1 nM), y D representa un valor de pK_i entre 7,5 y 8 (K_i entre 31,6 nM y 10 nM). Para el ensayo de potencia en células THP-1 A representa un valor de $pEC_{50} \geq 7,5$ ($EC_{50} \leq 32$ nM), B representa un valor de pEC_{50} entre 6,7 y 7,5 (EC_{50} entre 200 nM y 32 nM), y C representa un valor de pEC_{50} entre 6 y 6,7 (EC_{50} entre 1 μ M and 200 nM).

Tabla 6

Ejemplo Número	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	HT-29 (pIC₅₀)
1	A	A	C	B	B
2	A	A	B	B	B
3	B	A	C	B	B

Ejemplo Número	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	HT-29 (pIC₅₀)
4	B	A	C	B	B
5	B	B	D	C	C
6	B				
7	A	A	B	B	B
8	B	B	C	B	B
9	B	B	D	B	B
Tabla 1					
1-1	C				B
1-2	B				C
1-3	C				C
1-4	D				
1-5	B				B
1-6	A				B
1-7	B				
1-8	A				A
1-9	B				B
1-10	B				
1-11	B				B
1-12	B	B	C	B	
1-13	A	A	B	B	A
1-14	B	A	C	B	A
1-15	B	A	C	B	B

Ejemplo Número	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	HT-29 (pIC₅₀)
1-16	B	B	C	B	B
1-17	B	A	C	B	A
1-18	B				
1-19	B				A
Tabla 2					
2-1	C				C
2-2	B				B
2-3	B				B
2-4	B				B
2-5	B	B	D	C	
2-6	B	B	C	B	
2-7	B				B
2-8	B				B
Tabla 3					
3-1	B				
3-2	B	B		B	
3-3	B	B		C	
3-4	B	B		B	
3-5	B	B		B	
3-6	B	B		C	
3-7	B	B		B	
3-8	B	B		B	

Estudio 4. Estudio de la potencia celular de las JAK: inhibición de pSTAT6 estimulado con IL-4 en células T CD3+

Se determinó la potencia de los compuestos evaluados en la inhibición de la fosforilación de STAT6 estimulada por interleuquina-4 (IL-4) en células T positivas para CD3 (CD3+) entre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre humana completa (Stanford Blood Center) usando una citometría de flujo. Debido a que la señalización de la IL-4 ocurre a través de las JAK, este estudio provee una medida de la potencia celular de las JAK.

Las células T CD3+ se identificaron usando un anticuerpo anti-CD3 conjugado con ficoeritrilina (PE, clon UCHT1, BD Biosciences), mientras que se usó un anticuerpo anti-pSTAT6 conjugado con flúor Alexa 647 (pY641, clon 18/P, BD Biosciences) para detectar la fosforilación de STAT6.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre completa humana de donantes saludables usando un gradiente de ficoll. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37°C en RPMI (Life Technologies) combinado con 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (FBS, Life Technologies), Glutamax 2 mM (Life Technologies), HEPES 25 mM (Life Technologies) y Pen/Strep 1X (Life Technologies). Las células se sembraron a razón de 250000 por cavidad en el medio (200 µl), se cultivaron durante 1 hora y se resuspendieron en el medio del estudio (50 µl, RPMI combinado con 0,1% de albúmina de suero bovino (Sigma), Glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X), junto con diversas concentraciones de los compuestos que se deseaba evaluar. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO, y luego se diluyeron otras 500 veces (hasta alcanzar una concentración final para el estudio de 2x) en el

medio del estudio. Los compuestos evaluados (50 μ l) se incubaron con las células a 37°C, con 5% de CO₂ durante 1 hora, a lo que siguió la adición de 50 μ l de IL-4 (R&D Systems, concentración final: 20 ng/ml) en el medio del estudio precalentado durante 30 minutos. Después de aplicar la estimulación con citoquinas, las células se fijaron con una solución de fijación precalentada (100 μ l, BD Biosciences) durante 10 minutos a 37°C, con 5% de CO₂, se lavaron dos veces con un amortiguador para FACS (1 m, FBS al 2% en DPBS) y se resuspendieron en 1000 μ l de un amortiguador Perm III (BD Biosciences) enfriado en hielo durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con un amortiguador para FACS y se resuspendieron en 100 μ l de un amortiguador para FACS que contenía anticuerpos anti-CD3 con PE (dilución 1:50) y anti-pSTAT6 con flúor Alexa 647 (dilución 1:5) durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con un amortiguador para FACS y se analizaron en un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences).

Para determinar la potencia inhibitoria de los compuestos evaluados en respuesta a la IL-4, se midió la intensidad media de la fluorescencia (MFI) de pSTAT6 en células T CD3⁺. La IC₅₀ se calculó analizando las curvas de inhibición de la MFI en función de la concentración de cada compuesto. Los resultados expresaron como pIC₅₀ (logaritmo decimal negativo de la IC₅₀, media $\pm$ desviación estándar). El compuesto del ejemplo 2 presentó una pIC₅₀ de aproximadamente 7,3 en este estudio.

Estudio 5. Estudio de la potencia celular de las JAK: inhibición de pSTAT1 inducida por IFN γ

Se determinó la potencia de los compuestos evaluados en la inhibición de la fosforilación de STAT1 estimulada por interferón gamma (IFN γ) en monocitos positivos para CD14 (CD14+) derivados de sangre humana completa (Stanford Blood Center) usando una citometría de flujo. Debido a que la señalización del IFN γ ocurre a través de JAK, este estudio provee una medida de la potencia celular de las JAK.

Los monocitos se identificaron usando un anticuerpo anti-CD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, clon RM052, Beckman Coulter), mientras que se usó un anticuerpo anti-pSTAT1 conjugado con flúor Alexa 647 (pY701, clon 4a, BD Biosciences) para detectar la fosforilación de STAT1.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre completa humana de donantes saludables usando un gradiente de ficoll. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con 5% de CO $_2$ a 37°C en RPMI (Life Technologies) combinado con 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (FBS, Life Technologies), Glutamax 2 mM (Life Technologies), HEPES 25 mM (Life Technologies) y Pen/Strep 1X (Life Technologies). Las células se sembraron a razón de 250000 por cavidad en el medio (200 μ l), se cultivaron durante 1 hora y se resuspendieron en el medio del estudio (50 μ l, RPMI combinado con 0,1% de albúmina de suero bovino (Sigma), Glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X), junto con diversas concentraciones de los compuestos que se deseaba evaluar. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO, y luego se diluyeron otras 1000 veces en el medio para llevar la concentración final del DMSO hasta 0,1%. Los compuestos evaluados se incubaron con las células a 37°C, con 5% de CO $_2$

durante 1 hora, a lo que siguió la adición de IFN precalentado² (R&D Systems) en el medio (50 μ l), en una concentración final de 0,6 ng/ml durante 30 minutos. Después de aplicar la estimulación con citoquinas, las células se fijaron con una solución de fijación precalentada (100 μ l, BD Biosciences) durante 10 minutos a 37°C, con 5% de CO₂, se lavaron dos veces con un amortiguador para FACS (1 ml, BSA al 1% en PBS), se resuspendieron en una mezcla 1:10 de anticuerpos anti-CD14 con FITC con un amortiguador para FACS (100 μ l) y se incubaron a 4°C durante 15 minutos. Las células se lavaron una vez y se resuspendieron en un amortiguador Perm III (BD Biosciences) enfriado con hielo (100 μ l) durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con un amortiguador para FACS y se resuspendieron en una mezcla 1:10 de anticuerpos anti-pSTAT1 con flúor Alexa 647 con un amortiguador para FACS (100 μ l) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavaron dos veces con un amortiguador para FACS y se analizaron en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences).

Para determinar la potencia inhibitoria de los compuestos evaluados, se midió la intensidad media de la fluorescencia (MFI) de pSTAT1 en monocitos CD14+. La IC₅₀ se calculó analizando las curvas de inhibición de la MFI en función de la concentración de cada compuesto. Los resultados expresaron como pIC₅₀ (logaritmo decimal negativo de la IC₅₀, media $\pm$ desviación estándar). El compuesto del ejemplo 2 presentó una pIC₅₀ de aproximadamente 7,6 en este estudio.

Ensayo 6: Determinación de absorción en ratas canuladas

Se determinó la biodisponibilidad oral ($F\%$), fracción absorbida ($F_a\%$) y fracción que se escapa a la depuración hepática ($F_h\%$) en ratas Sprague Dawley de los dos estudios siguientes:

(1) farmacocinética en ratas luego de una dosis IV del compuesto de ensayo: Luego de la dosificación IV, se recolectaron muestras de plasma típicamente entre las 0 y 6 hr. Se determinaron los niveles de fármaco usando un método de LC-MS-MS. Los niveles de fármaco resultantes se usaron para calcular los parámetros farmacocinéticos IV: AUC IV y dosis IV.

(2) Se dosificaron por vía oral ratas que habían sido canuladas en su vena portal (PV) y también en su vena yugular (JV) con el compuesto de ensayo. Luego de la dosificación oral, se recolectaron muestras de plasma típicamente entre las 0 y 6 hr de la vena portal y de la vena yugular. Se determinaron los niveles de fármaco usando un método de LC-MS-MS. Los niveles de fármaco resultantes se usaron para calcular los siguientes parámetros farmacocinéticos: AUC PO PV, AUC PO JV, y Dosis PO.

Con el uso de datos derivados de los estudios precedentes, se calculó la biodisponibilidad oral $F\%$, y las cantidades $F_a\%$ y $F_h\%$ a partir de las siguientes fórmulas:

$$F\% = (AUC\ PO\ JV / AUC\ IV) * (Dosis\ IV / Dosis\ PO) * 100$$

$$F_a\% = (AUC\ PO\ PV / AUC\ IV) * (Dosis\ IV / Dosis\ PO) * 100$$

$$F_h\% = AUC\ PO\ JV / AUC\ PO\ PV$$

en donde:

AUC PO JV = Área bajo la curva luego de la dosis oral y plasma recolectado de la vena yugular

AUC PO PV = Área bajo la curva luego de la dosis oral y plasma recolectado de la vena portal

AUC IV = Área bajo la curva luego de una dosis intravenosa

Dosis IV = dosis intravenosa en mg/kg

Dosis PO = Dosis oral en mg/kg

En este ensayo se evaluaron los compuestos de los ejemplos 1-4 que exhibieron una biodisponibilidad oral ($F\%$) menor que aproximadamente 25%. En particular, todos los compuestos de los Ejemplos 1-, 2 y 4 exhibieron valores de $F\%$ menores que aproximadamente 5%. Además, los compuestos de los ejemplos 1 y 2 exhibieron una absorción en la vena porta ($F_a\%$) inferior a aproximadamente 25 % mientras que los compuestos de los ejemplos 3 y 4 exhibieron valores $F_a\%$ superiores al 40 %.

Ensayo 7: Farmacocinética en colon de ratas

El compuesto de ensayo se formuló en metil-celulosa 0,5 % en agua y se dosificó mediante sonda oral a 3,2 mg/kg y 100 mg/kg ratas Sprague Dawley. A diferentes puntos en el tiempo (típicamente 0,5, 1, 3, 6, 24 hr) posteriores a la dosificación, se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardiaca y se extirparon los colon intactos de las ratas. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 x g durante 15 min para recolectar plasma. Los colon se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) helada, se pesaron, y se homogeneizaron en una dilución de 1:10 en PBS. Se determinaron los niveles en plasma y colon del compuesto de ensayo mediante análisis por LC-MS respecto a estándares analíticos contruidos en una curva estándar en la matriz de ensayo. Se determinó la proporción de colon a plasma como la proporción del AUC del colon al AUC del plasma en $\mu\text{g hr/g}$. El compuesto del

ejemplo 2 exhibió una proporción de colon a plasma en exceso de aproximadamente 250 a 5 mg/kg y en exceso de aproximadamente 1200 a 100 kg.

Ensayo 8: modelo de ratón de colitis inducida por oxazolona

La colitis inducida por oxazolona es un modelo experimental que tiene un parecido histológico con la colitis ulcerativa en humanos (Heller y col. Immunology, 2002, 17, 629-638). En el ensayo se usaron ratones BALB/C adultos de Harlan. En el día 1, los animales se anestesiaron levemente con isoflurano y se eliminó cuidadosamente el pelo entre los hombros antes de aplicar lentamente oxazolona (4%, 150 µL, formulación 4:1 acetona: aceite de oliva) o solución vehículo para la sensibilización en piel. Siete días después de la sensibilización en piel, los ratones se sometieron a ayuno durante la noche, se anestesiaron por inhalación con isoflurano, y se insertó cuidadosamente una jeringa de 1 mL equipada con un catéter 3.5-F, cargada con solución de oxazolona, 4 cm dentro del colon del ratón. Luego de la inserción, se inyectaron 50 µL muy lentamente (durante 30 segundos usando una bomba de inyección) de la solución de oxazolona (1%, formulación 1:1 etanol:agua) en el colon. El catéter se extrajo y los ratones se mantuvieron verticalmente (cabeza abajo) durante 2 min para asegurar que toda la solución de oxazolona permaneciera dentro del colon. El tratamiento con fármaco (PO, BID o TID) o vehículo se inició un día antes del enfrentamiento intrarectal (IR) con oxazolona. Dos días después del enfrentamiento intrarectal con oxazolona, se evaluó el Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI) mediante investigadores ciegos al tratamiento para cada ratón de acuerdo con la puntuación de criterios: puntuación de consistencia de deposiciones (0, normal; 2, ligera; 4, diarrea),

puntuación de sangrado manifiesto (0, ausencia; 2, impregnado con sangre; 4, presencia), y puntuación de pérdida de peso (0, ninguno; 1, entre 1% y 5%; 2, entre 5% y 10%; 3, entre 10% y 20%; 4, más del 20%); DAI = promedio de (puntuación de consistencia de deposiciones + puntuación de sangrado manifiesto + puntuación de pérdida de peso).

Los compuestos seleccionados de la invención se evaluaron en el ensayo. La eficacia en el modelo se evidencia por una disminución en la puntuación de DAI en comparación con la puntuación de los animales tratados con vehículo. Los compuestos de los ejemplos 2 y 4, exhibieron una disminución estadísticamente significativa en la puntuación de DAI en comparación con los animales tratados con vehículo en el modelo de oxazolona a una dosis de 1, 3, y/o 10 mg/kg BID, mientras el compuesto del ejemplo 1 no exhibió una disminución estadísticamente significativa a la dosis de hasta 10 mg/kg BID evaluada en el ensayo.

Ensayo 9: Efectos de inmunosupresión en células asesinas naturales (NK) esplénicas de ratón

La depleción de células esplénicas de ratón es un modelo experimental de inmunosupresión (Kudlacz y col., *Am. J. of Transplantation*, **2004**, 4, 51-57). El compuesto del Ejemplo 1 se evaluó en el modelo de células esplénicas de ratón siguiendo el mismo paradigma de tratamiento que el usado en el modelo de colitis inducida por oxazolona (Ensayo 8).

Para el estudio se usaron ratones Balb/C adultos macho (entre 12 y 14 semanas de edad) de Harlan. Se dosificó el compuesto (1, 10 y 100 mg/kg, BID) y tofacitinib (30 y 60 mg/kg, BID) como control positivo por vía oral durante tres días a ratones sin tratamiento previo. Se recolectaron los bazo 1 h

después de la última dosis y se aplastaron inmediatamente para realizar una tinción de subtipo celular. Antes de la fijación, se incubaron anticuerpos marcados con fluoróforo para CD19 (FITC; células B), CD3e (PE; todas las células T) y DX5 (APC; células NK) con muestras de esplenocitos de cada animal para permitir el análisis % de subtipo múltiple, simultáneo en el citómetro de flujo. El número total de células de bazo para cada animal se midió mediante un contador de células automatizado manual Scepter™ 2.0.

El número absoluto de las poblaciones de subtipo de linfocitos (por ejemplo, células esplénicas B, T y NK) se calculó a partir del porcentaje de cada subtipo multiplicado por las células totales de bazo para cada animal. Se usó un ANOVA de una vía, con prueba *post hoc* de Dunnett, para comparar el número de linfocitos esplénicos de los grupo con vehículo y compuesto de ensayo. El nivel α se ajustó en $p < 0,05$. Los datos se presentaron como la media $\pm$ SEM para cada grupo.

El control positivo, tofacitinib (30 y 60 mg/kg; PO, BID), disminuyó de manera dependiente de la dosis y significativamente el recuento de células NK esplénicas. En el mismo estudio, los recuentos de células NK esplénicas no fueron afectados por el compuesto del Ejemplo 2 a dosis PO (BID) de hasta 100 mg/kg (la máxima dosis ensayada). No se observó efecto del tratamiento para las poblaciones de células B y T con ningún compuesto.

Estos datos, en conjunto con la dosis mínima de 1 mg/kg que provocó un efecto anticolítico significativo en el modelo de ratón de colitis inducida por oxazolona (Ensayo 8), permite que se calcule un índice terapéutico funcional de >100 para el compuesto del Ejemplo 2.

Estudio 10. Farmacocinética dérmica en piel de ratón y cerdo miniatura

El objetivo de este estudio fue determinar la farmacocinética epidérmica, dérmica y plasmática de un compuesto evaluado después de una exposición de 24 horas en piel intacta de ratón o cerdo miniatura.

El compuesto preparado en el ejemplo 12, 1-(((1R,3s,5S)-3-((4-((5-(hidroximetil)-1H-pirazol-3-il)amino)-6-metoxipirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)sulfonyl)azetidina-3-carbonitrilo, se formuló a razón de 0,5% (p/p) en una crema o un ungüento como se describe en la tabla 7, como la formulación A o la formulación B, respectivamente.

Veinticuatro horas antes del tratamiento, se rasuró el cabello de la parte posterior de ratones Balb/c macho de 25 g para exponer un área de al menos 6 cm² (aproximadamente 10% de la superficie corporal), y en un experimento separado, se expuso un área de al menos 450 cm² (aproximadamente 10% de la superficie corporal) de cerdos miniatura Gottingen de 10 kg. En el punto de tiempo cero, después de aplicar anestesia con isoflurano, se aplicó el compuesto evaluado sobre la parte posterior de los ratones o los cerdos miniatura en una dosis de 25 µl/cm². La piel se cubrió con un recubrimiento adhesivo para evitar la pérdida del compuesto en la jaula o en el lecho.

Después de 24 horas de exposición, las partes posteriores se lavaron suavemente con agua y jabón para eliminar el fármaco no absorbido y se secaron. Inmediatamente después del lavado, se extrajo sangre mediante una punción cardíaca de los ratones o una venopunción en los cerdos miniatura. Se removió la piel externa (estrato córneo) usando una cinta adhesiva decapante. Después de exponer la epidermis, se realizó una biopsia por punción de 0,5

cm. La epidermis y la dermis se separaron, se pesaron y se congelaron instantáneamente. Se obtuvieron muestras similares 48 horas después del tratamiento en los ratones y 48 horas, 94 horas y 168 horas (7 días) después del tratamiento en los cerdos miniatura.

Las muestras de epidermis y dermis se homogeneizaron en agua en una dilución de 1:10 (p/v), usando un homogenizador ultrasónico Covaris. Las muestras se extrajeron con 3 volúmenes de acetonitrilo y se cuantificaron en función de una curva de referencia mediante análisis de LC-MS. En función de los parámetros farmacocinéticos del AUC_{0-t} en el plasma, la epidermis y la dermis que se detallan en la tabla 8 más adelante, se concluyó que hubo una exposición significativa al compuesto en las capas de la epidermis y la dermis, mientras que la exposición en el plasma fue insignificante en los ratones y fue inferior al límite de cuantificación en los cerdos miniatura.

Tabla 7

Formulación A		Formulación B	
Compuesto del Ejemplo 12	0,5%	Compuesto del Ejemplo 12	0,5%
Ácido esteárico	5%	Octilhidroxiestearato	5%
Cetostearil Alcohol	5%	C8-C10 Triglicérido	5%
Isopropil Palmitato	4%	Vaselina (Jalea de Petrolato)	79,5%
Octilhidroxiestearato	2%	N-Metilpirrolidona	10%
BRIJ S2 (PEG 2 Estearil Éter)	1,08%		
BRIJ S20 (PEG 20 Estearil Éter)	6,92%		
N-Metilpirrolidina	10%		
PEG400	10 %		
RO Agua	55,5%		

Tabla 8

	Plasma AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	Epidermis AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{g}$)	Dermis AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{g}$)
Ratón Formulación A	0,014	718	61
Ratón Formulación B	0,006	2830	296
Cerdo miniatura Formulación A	<0,001	988	71
Cerdo miniatura Formulación B	<0,001	4030	114

Estudio 11. Modelo de dermatitis de contacto irritante inducida por TPA tópico en ratones

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto antiinflamatorio en un modelo de dermatitis aguda con compuestos evaluados sobre afecciones inflamatorias cutáneas como la dermatitis atópica (Dong et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2013, 344, 436-446).

La aplicación tópica dérmica de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato de éster de forbol (TPA) en ratones provoca una respuesta inflamatoria que se caracteriza por edema y afluencia de neutrófilos en la fase temprana (2-24 horas) y por la proliferación de células epidérmicas en la fase posterior (24-48 horas, Griffiths et al., Agents and Actions, 1988, 25, 344-351). Se sometieron ratones Balb/c hembra a un tratamiento tópico con un vehículo (DMSO/acetona 1:7) o 20 μL de una solución de TPA (2,5 μg) en el vehículo en cada oreja. 30

minutos antes y 15 minutos después del tratamiento con TPA, se aplicó tópicamente sobre cada oreja el vehículo o el compuesto del ejemplo 2 en dosis de 30, 100, 300, 1000 ó 3000 μg en el vehículo. Se evaluó el grado de inflamación en función del cambio en el grosor de la oreja 6 horas después del tratamiento con TPA. El compuesto del ejemplo 2 ejerció una inhibición dependiente de la dosis y la concentración del incremento inducido por TPA en el grosor de la oreja. El efecto estadísticamente significativo máximo fue una inhibición de 41%, observada con la dosis de 1000 μg .

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a los aspectos o las formas de realización específicas de la misma, las personas con experiencia en la técnica comprenderán que es posible realizar cambios o sustituciones por equivalentes sin apartarse del espíritu verdadero y alcance de la invención. . Adicionalmente, en la medida permitida por los estatutos y reglamentaciones de patentes aplicables, todas las publicaciones, patentes, y documentos de patente citados precedentemente en la presente se incorporan a modo de referencia a la presente en su totalidad, como si cada una se incorporase a modo de referencia.